

PATRÍCIA CRISTINA LEMOS GOMES BAROM

VARIABILIDADE E COESÃO GENÉTICA EM POPULAÇÕES RELICTUAIS DE
Cattleya lobata Lindl. (ORCHIDACEAE), ESPÉCIE ENDÊMICA DA MATA
ATLÂNTICA

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Botânica como requisito parcial à conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Viviane da Silva Pereira
Co-orientador: Prof. Dr. Eric de Camargo Smidt

CURITIBA
2010

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e proteção.

Aos meus amados pais, João e Ana Maria pela dedicação, carinho e educação, que fizeram de mim uma pessoa melhor.

Ao meu amado esposo Wilian Carlos pela compreensão e amor.

Ao meu amado irmão Rodrigo, Elisângela, Carolina e Valentina, que mesmo longe sempre mandaram boas energias pela internet. A todos os amigos e amigas pela compreensão do meu afastamento.

Aos professores Viviane da Silva Pereira e Eric de Camargo Smidt, pela dedicação, orientação, confiança e “puxões de orelha”, que promoveram meu crescimento profissional.

Às amigas e colegas do Laboratório de Filogenia e Genética de Conservação de Plantas, em especial a Elaine Lopes Pereira Nunes pela parceria durante todas as etapas de execução deste trabalho e revisão do abstract, a Carolina Coelho Scherer e Mônica Bolson pelas ajudas e amizade. À Professora Élide Pereira dos Santos pela permissão de uso do Laboratório Multiusuário do Departamento de Botânica – UFPR.

À PETROBRAS-CENPES, pelo auxílio-financeiro do projeto CORES, coordenado pelo pesquisador Cláudio Nicoletti de Fraga (Instituto de Pesquisa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro). À equipe de escalada do projeto CORES responsável pela coleta e envio das amostras foliares processadas neste trabalho.

RESUMO

Cattleya lobata é uma espécie de orquídea endêmica do estado do Rio de Janeiro, que está em risco de extinção. Esta espécie normalmente é rupícola e ocorre em afloramentos rochosos, conhecidos como inselbergues. Neste estudo, marcadores moleculares ISSR foram utilizados para acessar informações ecológicas e evolutivas, afim de que se possam traçar planos de manejo e conservação para a espécie. Foram amostrados 88 indivíduos de cinco populações localizadas nos municípios do Rio de Janeiro e de Niterói, abrangendo toda a distribuição geográfica da espécie. Foram necessários testes de diferentes protocolos de extração para obtenção de DNA total de boa qualidade. Dos 20 *primers* de ISSR testados, cinco apresentaram melhor resolução de amplificação e polimorfismo. Esses *primers* geraram 84 fragmentos, sendo 98,81% destes polimórficos ao nível específico e, 73,81% a 90,48% em nível populacional. Foram encontrados altos níveis de variabilidade genética ($H_e = 0,271$; $I = 0,396$). A distância genética de Nei variou de 0,017 a 0,070 mostrando alta similaridade entre as populações. Através da AMOVA, pode-se observar que a maior parte da variabilidade encontra-se dentro das populações (93%) e uma baixa estruturação genética foi encontrada (Φ_{ST} foi 0,067). As análises Bayesianas mostraram que devido a essa baixa estruturação populacional, as cinco populações amostradas pertencem ao mesmo *pool* gênico, caracterizando um único contingente populacional. Assim, a reintrodução ou transferência de material genético (indivíduos, pólen ou sementes) pode ser oriundo de qualquer uma das populações analisadas sem que haja comprometimento no estoque genético das mesmas visto que as populações analisadas possuem alta variabilidade genética e pouca diferenciação entre elas.

Palavras-chave: Genética da conservação, espécie microendêmica, marcador dominante, Orchidaceae

ABSTRACT

Cattleya lobata is an endemic endangered orchid species from Rio de Janeiro State. This species is rupicolous and usually grows on rocky outcrops, also named as inselbergs. In this study, ISSR markers were used to access ecological and evolutive information, so that management and conservation plans can be proposed. 88 individuals from five populations were sampled in the cities of Rio de Janeiro and Niterói, covering the entire geographical distribution of the species. Different DNA extraction protocols were tested until high quality total DNA was obtained. From the 20 ISSR primers tested, five showed better amplification resolution and polymorphism. These primers generated 84 fragments, being 98.81% polymorphic at the specific level, and 73.81% to 90.48% at the population level. There were high levels of genetic variability ($H_e = 0.271$, $I = 0.396$). Nei's genetic distances ranged from 0.017 to 0.070, showing high similarity between populations. Through AMOVA, it was observed that most of the variability is found within populations (93%), moreover low genetic structure was found (Φ_{ST} was 0.067). The Bayesian analysis showed that due to the low population structure, all the populations sampled belong to same gene pool, characterizing a single population contingent. So that, reintroduction or transference of genetic material (individuals, pollen or seeds) can be originated from any of the analyzed populations, without compromise the genetic stock, since the studied populations showed high genetic variability and little differentiation between them.

Key-words: Conservation genetics, endemic species, dominant marker, Orchidaceae

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	07
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
2.1 Populações e amostragem.....	13
2.2 Extração de DNA.....	15
2.3 Aplicação do marcador molecular e PCR.....	17
2.4 Análise dos dados.....	18
3 RESULTADOS.....	20
3.1 Extração de DNA.....	20
3.2 Aplicação do marcador molecular e PCR.....	22
4 DISCUSSÕES.....	25
REFERÊNCIAS.....	30
ANEXOS.....	39

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade do mundo, possuindo entre 15 a 20% do total de espécies do planeta distribuídas entre diversos tipos de ecossistemas (MYERS *et al.* 2000). Portanto, foi incluído no grupo dos países detentores de megadiversidade. Alguns dos ecossistemas brasileiros, como a Mata Atlântica, foram muito mais degradados que outros ao longo da história de ocupação do território nacional. Porém, ainda assim esse ecossistema apresenta uma riquíssima biodiversidade (CAMARGO *et al.* 2002). Dentro deste contexto, o complexo vegetacional da Mata Atlântica foi incluído entre os 25 *hotspots* de diversidade biológica no mundo. Sendo considerado um dos mais ricos e ameaçados ecossistemas devido ao seu estado de conservação, à alta diversidade biológica e ao alto grau de endemismos de plantas vasculares e vertebrados (MYERS *et al.* 2000).

Como consequência de cinco séculos de ocupação desordenada, sabe-se que extensas áreas da Mata Atlântica foram reduzidas com perda significativa da diversidade biológica em grande escala. Essa ocupação foi iniciada com o extrativismo do pau-brasil, estendido posteriormente para outras espécies de importância comercial e, no último século, pelo avanço das fronteiras urbanas, agrícolas e pecuárias (FONSECA 1992). Embora os diferentes dados sobre a superfície total remanescente da Mata Atlântica sejam divergentes, estima-se que esse valor deva compreender entre 5 a 15% da cobertura original deste bioma, distribuídos a resíduos florestais disjuntos e floristicamente empobrecidos. Apesar destes valores alarmantes, este ecossistema continua sendo importante área de distribuição de uma série de espécies endêmicas, como o caso das orquídeas (PEIXOTO *et al.* 2002).

Em virtude deste processo de forte redução de áreas nativas, diversas espécies vegetais apresentam-se hoje com distribuição fragmentada, possivelmente após ocorrerem extinções locais com o desaparecimento de muitas populações desconhecidas. E, com a diminuição e fragmentação dessas populações, uma das consequências é perda definitiva de estoques de variabilidade genética de muitas espécies nativas deste bioma (MURCIA 1996).

Desde os estudos originais de *hotspots*, a necessidade de se definir prioridades para a conservação dos organismos tem norteado diferentes projetos

onde a meta final comumente é identificar as áreas mais importantes para a conservação e fazer isso a uma escala prática para programar ações conservacionistas. Para tanto, a maioria dos estudos nesta área tem utilizado uma mesma abordagem básica: mapas de distribuição de espécies para identificar um conjunto de localidades que contenham um maior número de espécies em uma menor área geográfica. Entretanto, tais estratégias não contemplam adequadamente o reconhecimento de outros fatores biológicos e geográficos extremamente relevantes para definição do *status* da conservação das diferentes espécies ao longo da sua distribuição.

O intenso debate e a busca por estratégias para a conservação da biodiversidade do planeta, ao longo das últimas décadas, têm trazido alternativas aplicáveis e passíveis de serem adotadas por instituições de pesquisa no Brasil. Os programas de conservação devem ser guiados pela biologia da espécie em estudo e a dinâmica populacional, bem como a genética de espécies raras são áreas chave da pesquisa em conservação biológica (FALK & HOLSINGER 1991). Assim, para determinar satisfatoriamente ações práticas de conservação e manejo com a finalidade de assegurar a preservação de espécies, é importante que se tenham estimativas do tamanho efetivo e da variabilidade genética das populações. Esses pontos são fundamentais para a avaliação da situação atual das populações e detecção de casos onde a sua manutenção pode estar sendo comprometida. Da mesma forma, é fundamental que se compreenda a estrutura e história destas populações, investigando a existência de partições demográficas através de sua distribuição (MORITZ 1995) e caracterizando a distribuição hierárquica da diversidade genética (EXCOFFIER *et al.* 1992).

Com estudos empregando um marcador de DNA altamente variável e que pode ser transmitido por fluxo polínico, pode-se simultaneamente estimar o fluxo gênico gamético recente entre as populações e estimar o nível de endogamia. Também pode se investigar a variabilidade genética das populações e como é a partição desta variabilidade, tendo um conjunto de dados amplo para elaboração de um diagnóstico do *status* da espécie na natureza. Segundo, Berg & Hamrick (1997), a caracterização da variabilidade genética pode ser feita a partir de medidas de diversidade genética intrapopulacional e interpopulacional. Essas medidas podem ser estimadas a partir de dados de marcadores moleculares, como a porcentagem de locos polimórficos, o índice de fixação e a heterozigosidade esperada.

O marcador molecular ISSR (*Intersimple sequence repeats*) acessa informações genéticas que ajudam à compreensão dos aspectos abordados acima. Este marcador pertence à classe dos marcadores dominantes e foi desenvolvido por Zietkiewicz e colaboradores em 1994. Tal marcador consiste em *primers* que se ligam a regiões de microssatélites amplificando as regiões de interesse localizadas entre pontos de anelamento do iniciador. Além do alto polimorfismo, as principais vantagens do ISSR estão: a ausência da necessidade do conhecimento da sequência do DNA previamente, baixo custo, facilidade de manipulação, abundante ao longo do genoma e de evolução rápida (ESSELMAN *et al.* 1999; SHEN *et al.* 2006). Essa técnica tem se mostrado útil em estudos da diversidade genética populacional e biologia evolutiva (REDDY *et al.* 2002).

Além da confiabilidade, marcadores ISSR tem sido utilizados para espécies de Orchidaceae por fornecer dados para análise de aspectos evolutivos (ALMEIDA *et al.* 2009; CRUZ 2007; GAO & YANG 2006; PEREIRA *et al.* 2008; SILVA *et al.* 2008; SMITH *et al.* 2002; WALLACE 2004; WANG *et al.* 2009). Através destes dados, pode-se avaliar o *status* de conservação das populações naturais e sugerir se as espécies estudadas estão em vias de extinção, por exemplo. Conseqüentemente, estas informações são muito úteis para escolher estratégias de manejo e conservação das espécies, principalmente as raras e que sofrem grande pressão antrópica.

No Brasil, estudos realizados nesta linha têm demonstrado grande importância (e.g., BORBA *et al.* 2007a; BORBA *et al.* 2007b; SILVA-PEREIRA *et al.* 2007; SMIDT *et al.* 2006), principalmente para as espécies endêmicas de distribuição restrita e ameaçadas de extinção, como as *Cattleya* da Mata Atlântica que possuem alto valor comercial e atrativo ornamental. Esses estudos possibilitam a compreensão da extensão dos impactos causados pelo uso e devastação descontrolados de populações naturais de plantas.

Ao longo dos dois últimos anos uma equipe coordenada pelo pesquisador Claudio Nicoletti de Fraga (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro), através do projeto CORES – Conservação de Orquídeas Ameaçadas de Extinção (Petrobrás – Cenpes) trabalhou intensamente na busca de populações naturais remanescentes de espécies de Orchidaceae em risco de extinção, segundo a lista de espécies em extinção da flora brasileira publicada pelo IBAMA em 1992. Tal projeto objetivou definir a área de distribuição atual e resgatar informações sobre

coleta e manutenção de exemplares em coleções amadoras, tendo reunido um importante conjunto de dados sobre distribuição geográfica, tamanho das populações relictuais, estrutura demográfica, estratégias de polinização e reprodutiva de algumas das oito espécies mais criticamente ameaçadas de *Cattleya* (*C. grandis*, *C. jongheana*, *C. lobata*, *C. perrinii*, *C. schilleriana*, *C. tenebrosa*, *C. virens*, *C. xanthina*). Dentre as orquídeas contempladas pelo Projeto CORES destaca-se a *Cattleya lobata* Lindl., uma espécie fortemente ameaçada de extinção e endêmica da Mata Atlântica.

Dentro de Orchidaceae, o gênero *Cattleya* possui grande valor ornamental com cerca de 50 espécies (VAN DEN BERG 2005; WITHNER 1988). O Brasil possui 28 espécies do gênero, sendo 23 endêmicas (PABST & DUNGS 1975, 1977). As *Cattleyas* são, em geral, polinizadas principalmente por abelhas através de mecanismo de engodo (DRESSLER 1981; VAN DER PIJL & DODSON 1966). Tal mecanismo consiste em flores com características morfológicas e químicas que sinalizam um dado recurso floral que de fato não é produzido. Os atrativos florais, tais como a forma das flores, cor ou perfume, são associados pelos polinizadores como uma recompensa comestível (ROY & WIDMER 1999). Dessa forma, a polinização cruzada é estimulada, já que o agente polinizador procura outras flores na tentativa de coletar o recurso. Segundo Stort & Martins (1980), a polinização cruzada é o tipo de reprodução que apresentou maior número de sementes viáveis para *Cattleya*, comparada à autopolinização. A auto-incompatibilidade, em geral, é rara nas orquídeas (VAN DER PIJL & DODSON 1966).

Após quatro décadas de sua descrição por Lindley (1848), *C. lobata* foi transferida para o gênero *Laelia*, onde foi mantida por muito tempo. A partir da publicação da primeira filogenia molecular para Subtribo Laelinae, utilizando dados do genoma nuclear (ITS), a espécie foi transferida para o gênero *Sophranitis* (VAN DEN BERG *et al.* 2000). Baseando-se apenas em resultados de filogenia, alguns autores transferiram-na para os gêneros *Hadrolaelia*, *Brasilaelia* e posteriormente para *Chironiella*, entre os anos de 2002 e 2006. Essas alterações foram pouco aceitas na comunidade científica. Atualmente com novos dados de filogenia utilizando fragmentos do DNA plastidial, a espécie foi novamente inserida no gênero *Cattleya*, como descrito originalmente (VAN DEN BERG 2008).

Devido a sua beleza, há muito tempo *Cattleya lobata* tem sido extraída da natureza por colecionadores, sem qualquer critério ou preocupação com o risco de

desaparecerem definitivamente da natureza (CONSTANTINO & FRAGA 2005). De fato, suas características chamam a atenção, pois suas flores possuem coloração rosa púrpura predominante nas pétalas (que medem 4,5 x 7,3cm) e sépalas (medindo 2 x 7,5cm). O labelo possui uma coloração púrpura mais intensa, com sua entrada branca ou esverdeada. A planta mede de 60 a 70 cm de altura e produz mais de cinco flores por haste floral, cada uma com até 15 cm de diâmetro (WITHNER 1988) (FIGURA 1). Podem habitar paredões verticais expostos a altas intensidades luminosas podendo também ocorrer, raramente, em ambientes sombreados, como observado por Saddi (2008). São plantas rupícolas, mas podem ocorrer em epifitismo.

Aparentemente, *Cattleya lobata* é mais uma espécie polinizada por engodo, já que a produção de néctar não foi observada (FRAGA *et al.* dados não publicados). Além disso, há o compartilhamento de uma série de características florais com outras espécies de *Cattleya* brasileiras (FREIRE & FRAGA 2010; STORTI 2007; SMIDT *et al.* 2006).



FIGURA 1 - *Cattleya lobata* Lindl. NA POPULAÇÃO DO PICO DOS QUATRO, GÁVEA, RIO DE JANEIRO (FOTO: CLÁUDIO N. FRAGA)

Cattleya lobata é uma espécie considerada microendêmica da Mata Atlântica, com distribuição geográfica restrita a alguns inselbergues litorâneos da cidade do Rio de Janeiro e de Niterói (SADDI 2008) (FIGURA 2). Devido ao hábito rupícola, esta espécie apresenta populações disjuntas já que os inselbergues são descontínuos. Inselbergues são montanhas de origem graníticas ou de gnaisse, do

Pré-Cambriano, com aproximadamente mais de 50 milhões de anos que podem ocorrer isoladas ou formando aglomerados. Essas montanhas ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais, como por exemplo, Austrália, Índia, Estados Unidos, diversos países africanos, Venezuela, Bolívia e Brasil (POREMBSKI *et al.* 1997). No Brasil, os inselbergues ocorrem do Nordeste até o Rio Grande do Sul. Na cidade do Rio de Janeiro, essas montanhas possuem altitudes que variam de 150 a 1000 m, como o Pão de Açúcar (MEIRELLES *et al.* 1999).

Segundo Porembski (2007), os inselbergues se comportam como ilhas, já que possuem isolamento espacial e ecológico atuando como barreira para dispersão e migração, favorecendo um ecossistema com flora e fauna característica e especializada (BARBARÁ *et al.* 2008). Porém, as áreas com essas montanhas encontram-se muito degradadas ou ameaçadas, principalmente aquelas inseridas em biomas como, por exemplo, a Mata Atlântica (MARTINELLI 2007).



FIGURA 2 – INSELBERGUE NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO – PÃO DE AÇÚCAR (FOTO: SADDI 2008)

O arcabouço de aspectos biológicos e de exploração de *Cattleya lobata* tratada pelo Projeto Cores, aliado ao conhecimento detalhado da amplitude de distribuição das populações, nos possibilita questionar: (1) Qual é o nível de variabilidade e estruturação genética intra e inter-populacional apresentado por esta

espécie? (2) Quantos contingentes populacionais podem ser detectados e qual o nível de estruturação genética dos contingentes atuais? (3) Os resquícios de populações naturais isoladas e fragmentadas, resultantes da intensa coleta durante muitas décadas, podem estar depauperados geneticamente? (4) Qual o potencial de sobrevivência e regeneração das populações naturais que se pode prever com base no cenário genético atual de cada espécie?

Consideramos, portanto, que somente com respostas mais criteriosas sobre o *status* de conservação genética das populações naturais e suas relações históricas poderão ser indicadas boas estratégias para a conservação e manejo desta espécie de orquídea ameaçada de extinção na natureza, uma vez que qualquer intervenção nessas populações sem este panorama prévio poderá interferir negativamente nessas populações relictuais acelerando o processo de extinção.

O objetivo deste trabalho foi investigar a variabilidade genética e o nível de estruturação genética das populações de *Cattleya lobata*, ao longo de toda a sua distribuição geográfica. Com isso, pode-se determinar se existe indicativo de isolamento entre as populações relictuais por interrupção do fluxo gênico ou alternativamente, a coesão e similaridade genética entre as subpopulações persistem nas condições atuais. Outro objetivo deste trabalho foi o de detectar os possíveis contingentes populacionais e avaliar as condições para o estabelecimento de estratégias de conservação e/ou manejo dessa espécie. Para a realização dessas investigações foi necessário um estudo de extrações de DNA dessa espécie, já que sua oxidação é bastante rápida.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 POPULAÇÕES E AMOSTRAGEM

Uma vez que a espécie alvo da pesquisa é fortemente ameaçada de extinção, no momento da coleta a equipe responsável por esta etapa se preocupou em não remover plantas inteiras de nenhuma localidade para a execução deste trabalho. Portanto, foram coletados apenas fragmentos de folhas de 88 indivíduos de cinco populações de *C. lobata* em diferentes regiões na cidade do Rio de Janeiro e Niterói, abrangendo toda a distribuição desta espécie microendêmica (TABELA 1 e FIGURA 3). Essas populações situam-se em alto de montanhas de origem granítica,

conhecidas como inselbergues, com altitudes variando de 224 a 649 metros. Das populações amostradas, quatro encontram-se em áreas de intenso turismo, sendo três no Complexo da Gávea (Pico dos Quatro, Pedra Bonita, Agulhinha da Gávea) e uma no Pão de Açúcar (lado direito da via de escalada Galote). As populações do Complexo da Gávea e de Niterói (Alto Mourão - final da trilha para o cume e início da via de escalada da face sudoeste) encontram-se em Unidades de Conservação (Parque Nacional da Tijuca e Parque Estadual da Serra da Tiririca, respectivamente).

Há cerca de três anos, foram coletadas amostras dessas plantas e armazenadas em sílica-gel. Devido ao estado de conservação dos fragmentos foliares, foram necessários testes de extração de DNA para a obtenção de um produto final mais puro. Entre os meses de janeiro a março de 2010 foram recoletados de 13 a 25 indivíduos por população. Portanto, o material estocado compreende plantas armazenadas em sílica-gel em temperatura ambiente por período que variou de um a três anos. Além das plantas frescas que foram armazenadas em geladeira em temperatura de 4°C por no máximo dois dias até serem processadas, de modo que pudéssemos extrair amostras de DNA total a partir de fragmentos foliares ainda frescos.

TABELA 1 - POPULAÇÕES DE *Cattleya lobata* COM DISTRIBUIÇÃO RESTRITA A COSTA DO RIO DE JANEIRO, USADAS NESTE ESTUDO

localização	código	coordenadas geográficas	N	Alt
RJ – Rio de Janeiro - Complexo Pedra da Gávea, Pico dos Quatro	PQ	23°0'20,2"S/43°17'18,1"W	25	224
RJ – Rio de Janeiro - Complexo Pedra da Gávea, Pedra Bonita	PB	22°59'18,9"S/43°17'1,4"W	17	649
RJ – Rio de Janeiro - Complexo Pedra da Gávea, Agulhinha da Gávea	AG	22°16'34,6"S/43°16'34,6"W	15	505
RJ – Rio de Janeiro - Pão de Açúcar	PA	22°57'11,6"S/43°10'5"W	18	307
RJ – Niterói - Alto Mourão,	AM	22°58'22,3"S/43°1'13,7"W	13	414

NOTA: N = número de indivíduos amostrados, Alt = altitude das populações (metros).

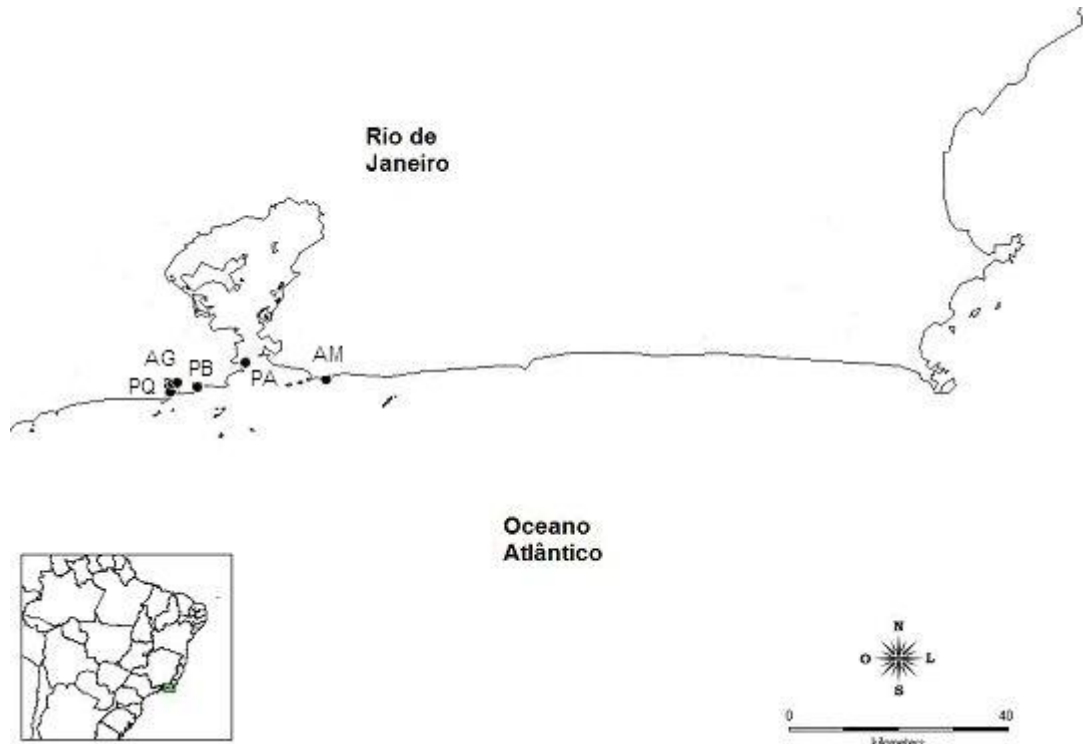


FIGURA 3 - POPULAÇÕES DE *Cattleya lobata* ANALISADAS NESTE ESTUDO, LOCALIZADAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, SUDESTE DO BRASIL (PQ: PICO DOS QUATRO, AG: AGULHINHA DA GÁVEA, PB: PEDRA BONITA, PA: PÃO DE AÇÚCAR e AM: ALTO MOURÃO - NITERÓI).

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Foram necessárias adequações aos protocolos de extração uma vez que amostras de folhas frescas recoletadas recentemente apresentaram rápida oxidação durante a maceração. Outro fator para tais adequações foi o estado de preservação das amostras armazenada em sílica-gel, o que compromete a preservação do DNA. Esse processo de adequação de protocolos foi necessário para o melhor desempenho da utilização de marcadores moleculares ISSR, já que são ferramentas sensíveis a DNA de baixa qualidade ou amostras que contenham contaminantes em excesso, como os fenóis.

Para isso, foram testados oito métodos de extração (ASIF & CANNON 2005; COTA-SÁNCHEZ *et al.* 2006; FERNANDÉZ *et al.* 2000; LIM *et al.* 1997; LIMA *et al.* 2007; NOVAES *et al.* 2009; RIBEIRO & LOVATO 2007; RIBEIRO & LOVATO 2007 com modificações), além do protocolo usualmente utilizado de Doyle & Doyle (1990), vide anexo 1.

A escolha desses métodos foi baseada no desempenho descrito na literatura e nos reagentes diferentes dos utilizados habitualmente no laboratório. Os protocolos testados apresentam variações em quantidades de reagentes ou adição de outras substâncias. Estas modificações incluem a utilização de solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), o qual constitui um detergente que rompe as membranas celulares liberando o conteúdo celular, associado a outros agentes tamponantes e antioxidantes. Esses testes foram realizados durante um programa de estágio voluntário no primeiro semestre de 2010 em que se pode aperfeiçoar a extração de DNA e adquirir as primeiras noções de manipulação de ferramentas moleculares.

Para todos os testes foram utilizadas cerca de 50mg de tecido foliar e, em cada método escolhido, foram utilizadas quatro amostras de material seco em sílica e quatro amostras de material fresco, totalizando oito amostras por protocolo.

Após a extração do DNA, todas as amostras foram submetidas à eletroforese para verificar a presença do material genômico em gel de agarose 1% em Tampão TE 1X com volume de 150mL. As amostras foram aliqüotadas a 2 μ L e coradas com 3 μ L de azul de bromofenol, sendo aplicadas no gel de agarose para a eletroforese, em cuba horizontal com tampão TAE 1X, com voltagem de 220V por 25 minutos, posteriormente corado em solução de brometo de etídeo por 30 minutos e fotografado sob luz ultravioleta.

O DNA genômico extraído pelos protocolos testados foi submetido à quantificação em NanoDrop 3300 (Thermo Scientific), utilizando o comprimento de onda (λ) da radiação adequado à análise de ácidos nucléicos.

A qualidade do DNA das amostras foi testada via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com *primers* de marcadores moleculares ISSR e cpDNA, para verificar se as amostras amplificariam fragmentos de diferentes regiões. Os testes de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado em brometo de etídeo. As amostras de DNA foram armazenadas em freezer -20°C até a sua utilização nas reações de PCR e posteriormente, transferidas para ultrafreezers (-80°C). Esse armazenamento permanente está sendo realizado no banco de DNA total da Universidade Federal do Paraná (DNAUPCB), onde as amostras são mantidas como patrimônio público, assim como adotado na maioria dos bancos de DNA como o do RBG Kew, Universidade Estadual de Feira de Santana e Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

2.3 APLICAÇÃO DO MARCADOR MOLECULAR E PCR

Foi testada a aplicabilidade de 23 *primers* ISSR através de gradientes de temperatura e variações nas concentrações de magnésio, DNA e *Taq* DNA polimerase. Dentre os *primers* testados, cinco apresentaram melhor resolução de amplificação e polimorfismo, sendo então selecionados para o estudo (TABELAS 2 e 3). Além desses cinco *primers* utilizados, outros seis estão em fase de padronização e em breve serão aplicados às populações de *C. lobata*.

Para cada um dos cinco *primers* escolhidos, a temperatura de anelamento foi ajustada a fim de melhorar a resolução de leitura no gel. As amostras do DNA genômico foram, então, usadas para amplificação através da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) seguindo o protocolo básico para um volume final de 20µL, contendo: tampão TE 1X, MgCl₂ a 3mM, dNTPs a 0,2mM, *primer* a 0,4µM, 1,5 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e DNA genômico. Para a amplificação dos fragmentos foram padronizadas temperaturas e o programa que incluem etapas de desnaturação inicial a 94°C por 1,5 min, seguido de 36 ciclos de amplificação a 94°C por 40 segundos para a desnaturação, intervalos de 47° a 50°C por 45 segundos para o anelamento, 72°C por 1,5 minuto para a extensão, seguindo, após a etapa de ciclagem, uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

TABELA 2 - *PRIMERS* DE ISSR TESTADOS E UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS GENÔMICOS DE *Cattleya lobata*

Nome do primer	Sequência do primer	T °C	NF (FP%)
Manny	(CAC) ₄ RC	50	22 (92,73)
Mao	(CTC) ₄ RC	50	16 (68,75)
Dat	(GA) ₇ RG	50	16 (82,50)
UBC898	(CA) ₆ -RY	47	16 (73,75)
UBC899	(CA) ₆ RG	50	14 (77,14)
OMAR	(GAG) ₄ -RC	50	-
JOHN	(AG) ₇ YC	50	-
UBC827	(AC) ₈ G	50	-
UBC840	(GA) ₈ YT	50	-
UBC844	(CT) ₈ RC	50	-

continuação			
UBC880	GGAGAGGAGAGGAGA	50	-
UBC886	VDVCTCTCTCTCTCTCT*		
total	-	-	84 (80,00)

NOTA: Temperatura de anelamento (T °C), número de fragmentos polimórficos (NF) e porcentagem de fragmentos polimórficos (FP); Y = C ou T; R = A ou G; *Nomenclatura IUB para bases degeneradas "V" = A+C+G e "D" = A+T+G.

TABELA 3 - PRIMERS DE ISSR TESTADOS SEM ÊXITO NA AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS GENÔMICOS DE *Cattleya lobata*

Nome do primer	Sequência do primer	T °C
CHRIS	(CA) ₇ YG	50, 53 e 56
GOOFY	(GT) ₇ YG	50
TERRY	(GTG) ₃ GGTGRC	50
BECKY	(CA) ₇ YC	50
UBC808	(AG) ₈ C	50
UBC813	(CT) ₈ T	50
UBC814	(CT) ₈ A	50
UBC848	(CA) ₈ RG	50
UBC866	(CTC) ₆	50
UBC901	(GT) ₆ -YR	47, 50, 51, 53 e 56
UBC902	(GT) ₆ -AY	50, 53 e 56

NOTA: Temperaturas de anelamento testadas (T °C); Y = C ou T; R = A ou G

Todas as etapas da extração de DNA, testes de *primers* e aplicação do marcador molecular, foram realizadas no Laboratório de Filogenia e Genética da Conservação de Plantas, com o apoio também do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular, no departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná.

2.4 ANÁLISE DOS DADOS

Para investigar a variabilidade e a estrutura genética das populações foram empregados marcadores dominantes altamente variáveis como os ISSRs. Os locos

de ISSRs foram codificados visualmente como presença (1) ou ausência (0) de uma banda para a construção de uma matriz de fenótipos. Locus considerados pouco confiáveis foram excluídos da análise. Foram consideradas homólogas todas as bandas de tamanho molecular em um mesmo *primer* (WILLIAMS *et al.* 1993). Essa matriz de fenótipos foi utilizada no suplemento GenAEx 6.3 do Excel® (PEAKALL & SMOUSE 2006), para a geração de dados como a porcentagem de locus polimórficos (P), diversidade genética utilizando índice de Shannon (I) e Heterozigosidade esperada (H_e).

Para verificar se os agrupamentos de populações formam uma estrutura hierarquizada em grupos de montanhas, uma matriz de distâncias euclidianas quadradas foi construída a partir da matriz de fenótipos ISSR. Esta matriz foi submetida a uma análise de variância molecular (AMOVA), utilizando o programa suplemento GenAEx 6.3. A AMOVA foi utilizada para quantificar a proporção da diversidade genética intraespecífica atribuída à diferença interpopulacional. Através da AMOVA foi também produzida uma matriz de Φ_{ST} entre todos os pares de populações. A partir das distâncias de Nei par a par de todas as populações, calculadas pelo GenAEx 6.3, foi construída uma árvore utilizando *neighbour-joining* através do programa PAUP (SWOFFORD 2003), e o dendrograma foi visualizado através do TREEVIEW (PAGE 1996), conforme Hollingsworth & Ennos (2004).

Adicionalmente, foi conduzida análise Bayesiana a partir de simulações de Monte Carlo e Cadeia de Markov (MCMC) para avaliar a estrutura populacional, utilizando genótipos multilocus dos indivíduos amostrados, para detecção de grupos genéticos (K) prováveis, assumindo o modelo de populações mistas utilizando o programa STRUCTURE 2.2 (FALUSH *et al.* 2007) para marcadores dominantes. Nesta abordagem foi possível acessar as probabilidades posteriores de clusters de populações estruturadas e probabilidade de cada indivíduo pertencer à população amostrada ou apresentar origem externa (HOLSINGER *et al.* 2002, HOLSINGER & WALLACE 2004, LARSON *et al.* 2004). O número de populações estabelecidas (K) foi de $K = 1$ a $K = 5$ com 10 execuções independentes para cada valor de K . Cada corrida teve 300.000 interações de Monte Carlo e Cadeia de Markov (MCMC), com um período inicial burn-in de 50.000 interações.

3 RESULTADOS

3.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Após o processo de extração de DNA através dos métodos testados, as amostras foram submetidas à eletroforese, para verificar a presença de material genético. Através desse processo foi possível identificar a presença de DNA em sete dos nove protocolos testados (FIGURA 4). O método cujo material genético foi revelado com maior intensidade, para plantas frescas e secas em sílica, foi o proposto por Novaes *et al.* (2009). Esse mesmo método foi o que gerou amostras de DNA mais limpas segundo as medições em NanoDrop. O DNA extraído por este protocolo e amplificado a partir de *primers* de ISSR resultou em bandas mais nítidas com amostras frescas comparado ao protocolo padrão (FIGURAS 5 e 6).

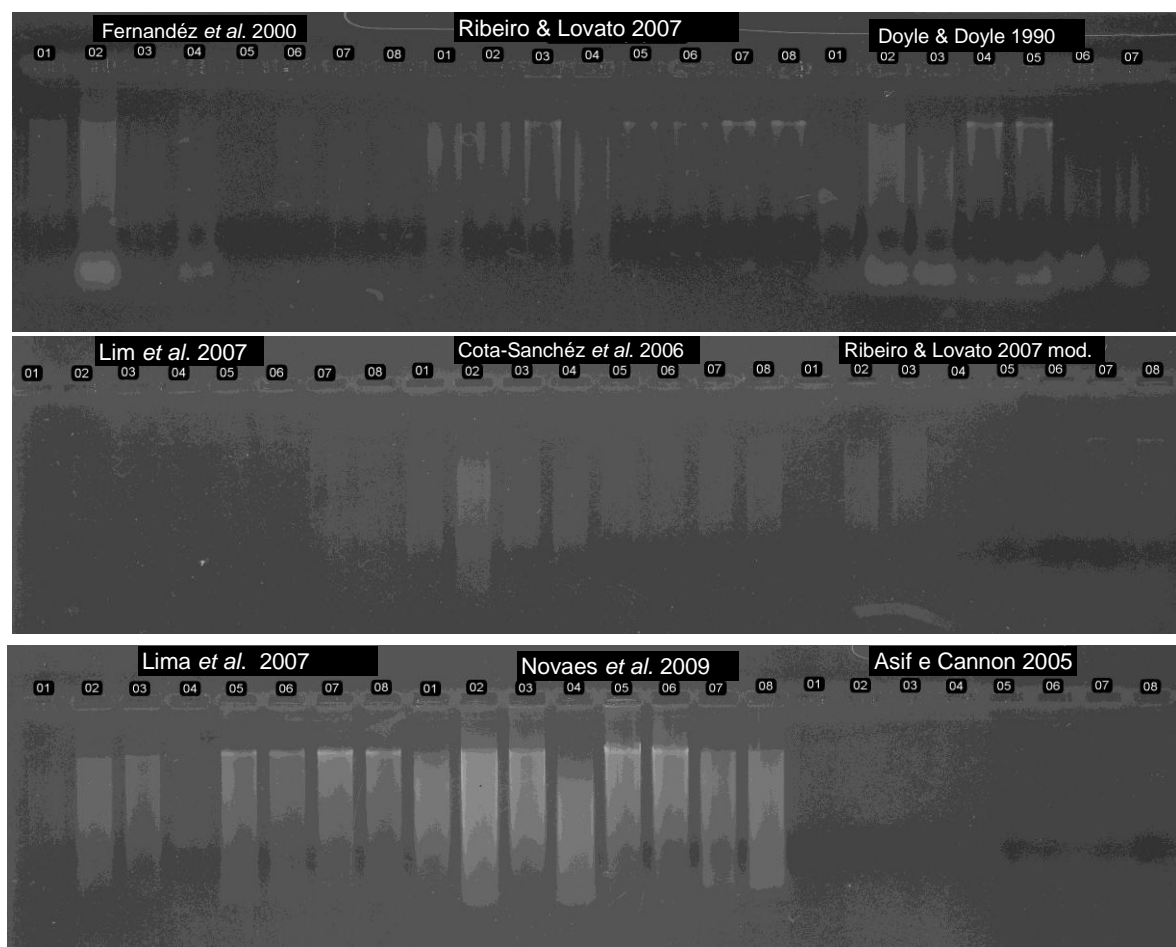


FIGURA 4 - ELETROFORESE DE DNA TOTAL DOS PROTOCOLOS TESTADOS

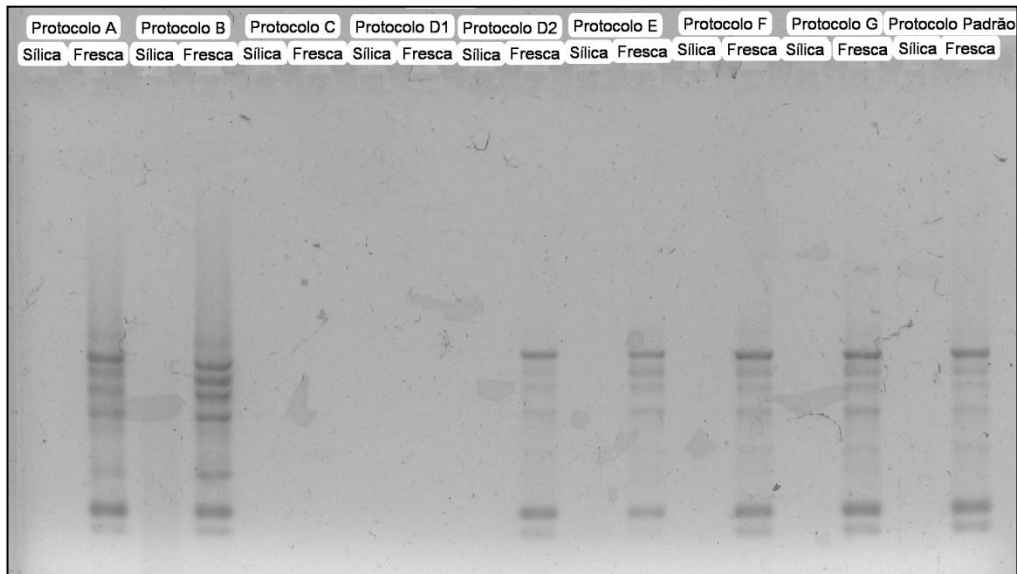


FIGURA 5 - PCR COM *PRIMER* ISSR – UBC 898

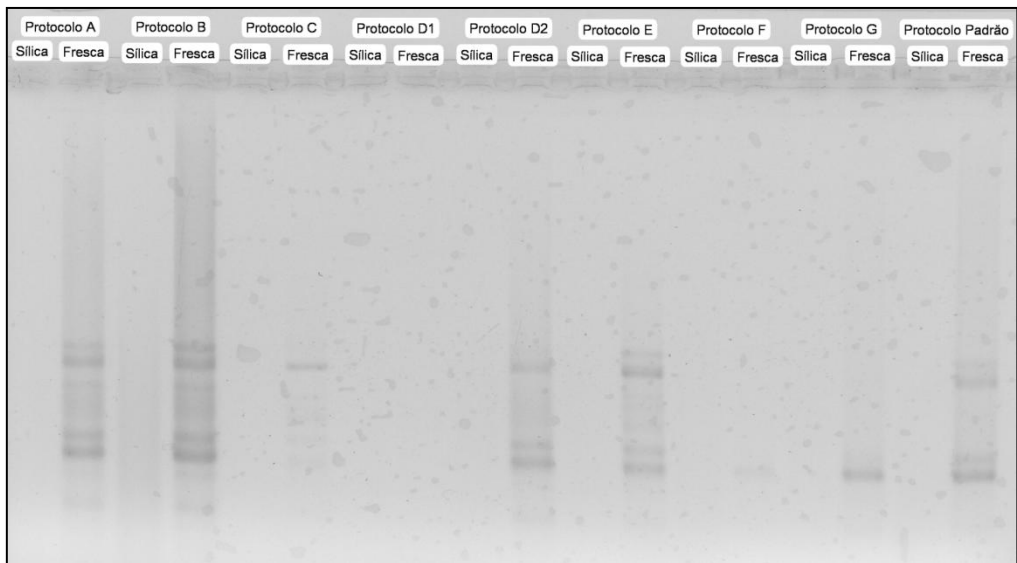


FIGURA 6 - PCR COM *PRIMER* ISSR – UBC 901

Para a amplificação de regiões específicas de sequências nucleotídicas de cpDNA o método de extração proposto por Ribeiro & Lovato (2007, com modificações), foi o único protocolo igualmente eficiente para folhas frescas e folhas armazenadas em sílica (FIGURA 7).

Para esse estudo, que em um primeiro momento houve a urgência de amostras de DNA limpas, devido à utilização de marcadores moleculares sensíveis a

contaminantes, foi escolhido o protocolo descrito por Novaes *et al.* (2009), cuja descrição encontra-se no anexo 1.



FIGURA 7 - PCR COM cpDNA – psbD-trnT

3.2 APLICAÇÃO DO MARCADOR MOLECULAR E PCR

Os cinco *primers* usados neste estudo resultaram em 84 loci com boa resolução. O *primer* MANNY resultou 22 fragmentos, enquanto que UBC899 resultou em 14 fragmentos. Os *primers* MAO, DAT e UBC898 resultaram cada um em 16 loci. Esses fragmentos variaram de 100 a 1800 bp (TABELA 2). Além dos cinco *primers* mencionados, John, Omar, UBC827, UBC840, UBC848, UBC880 e UBC 886 estão sendo testados e serão empregados nas populações de *C. lobata*, aumentando o conjunto de dados.

Do total de fragmentos, cinco foram exclusivos, sendo três da população PQ (Pico dos Quatro), uma da população PA (Pão de Açúcar) e outra da população AM (Alto Mourão). Na população PQ, dois *loci* estavam presentes em dois indivíduos cada um e um dos *locus* presente em apenas um indivíduo. Na população PA, o *locus* privativo esteve presente em três indivíduos. E na população AM, o único *locus* exclusivo estava presente em apenas dois indivíduos.

No nível específico, 98,81% dos *loci* foram polimórficos e no nível populacional o polimorfismo variou de 73,81% (população AG – Agulhinha da Gávea) a 90,48% (população PQ) (TABELA 4).

TABELA 4 – PARÂMETROS DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE CINCO POPULAÇÕES DE *Cattleya lobata*, LOCALIZADAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL, BASEADOS EM 84 LOCI DE ISSR

População	<i>P</i> (%)	<i>I</i> (± DP)	<i>UH_e</i> (± SD)
PQ	90,48%	0,432 (±0,026)	0,292 (±0,020)
PB	79,76%	0,386 (±0,029)	0,265 (±0,022)
AG	73,81%	0,368 (±0,029)	0,252 (±0,021)
PA	76,19%	0,398 (±0,028)	0,272 (±0,021)
AM	79,76%	0,396 (±0,027)	0,272 (±0,021)
Média	80,00%	0,396 (±0,013)	0,271 (±0,009)
Nível de espécie	98,81%	0,454 (±0,024)	0,301 (±0,018)

NOTA: *P* = porcentagem de *loci* polimórficos; *I* = Índice de diversidade de Shannon; *UH_e* = heterozigiosidade esperada. Desvio padrão em parênteses. Código das populações, ver TABELA 1

A heterozigiosidade esperada para a espécie e o índice de Shannon foram 0,301 e 0,454 respectivamente. As populações mostraram alta variabilidade, com médias de *H_e* e *I* igual a 0,271 e 0,396 respectivamente. A população AG teve o menor nível de diversidade (*H_e* = 0,252, *I* = 0,368) e a população PQ teve o maior nível de diversidade (*H_e* = 0,292, *I* = 0,432) (TABELA 4).

As populações do Complexo da Gávea estão distribuídas em três picos diferentes – Pico dos Quatro, Pedra Bonita e Agulhinha da Gávea. Portanto a distância entre essas populações é menor se comparadas às populações do Pão de Açúcar e do Alto Mourão (Niterói). A menor distância está entre as populações PB e AG (0,833km). Enquanto que a maior distância geográfica está entre as populações AM e PQ (27,663km) (TABELA 5).

De modo geral, quando comparadas par a par, as populações apresentaram alta similaridade entre si. A maior identidade genética ocorreu entre as populações PQ e PB (Pedra Bonita) (0,983). Enquanto que a menor identidade (0,932) ocorreu entre as populações AG e AM, sendo esta última localizada no município de Niterói e a população mais distante do Complexo da Gávea. (TABELA 5).

TABELA 5 – MATRIZ DE DISTÂNCIA GENÉTICA MÉDIA (“UNBIASED GENETIC DISTANCE”, NEI, 1978) EM CINCO POPULAÇÕES DE *Cattleya lobata*, A PARTIR DE DADOS DE ISSR (DIAGONAL ABAIXO) E MATRIZ DE DISTÂNCIA GEOGRÁFICA (EM QUILOMETROS) ENTRE AS ÁREAS DAS POPULAÇÕES DE RIO DE JANEIRO (PQ, PB, AG e PA) E NITERÓI (AM) DE *Cattleya lobata* (DIAGONAL ACIMA); CÓDIGO DAS POPULAÇÕES, TABELA 1

População	PQ	PB	AG	PA	AM
PQ	0,000	1,952	2,550	13,624	27,663
PB	0,017	0,000	0,833	12,477	27,006
AG	0,023	0,031	0,000	11,648	26,225
PA	0,032	0,029	0,022	0,000	15,267
AM	0,055	0,065	0,070	0,058	0,000

Com base nas distâncias genéticas, foi elaborada uma árvore de *Neighbor-joining*. Apesar da população de Niterói ser a mais distante do Complexo da Gávea e do Pão de Açúcar, não há uma significativa distância genética entre as populações (FIGURA 8). Portanto, pode-se observar que as populações do Complexo da Gávea e Pão de Açúcar são geneticamente semelhantes à população AM em Niterói.

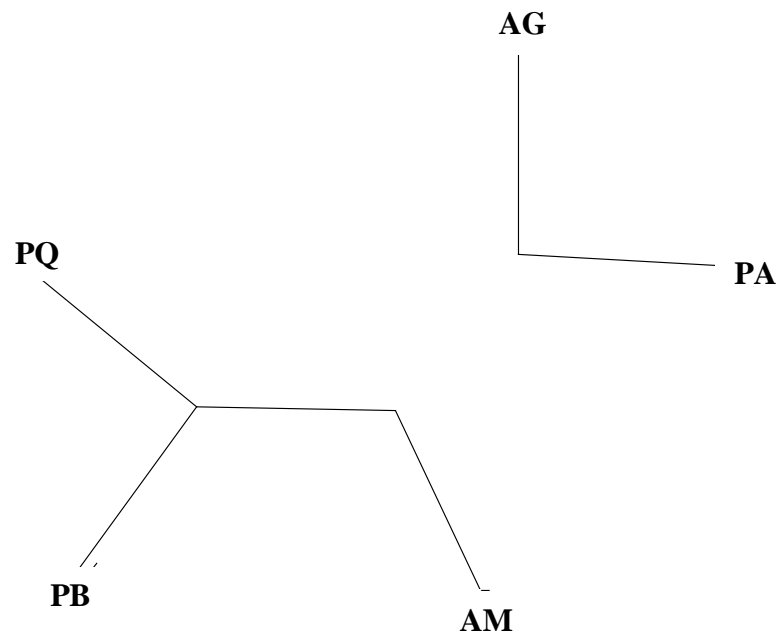


FIGURA 8 – ÁRVORE DE NEIGHBOR-JOINING DAS CINCO POPULAÇÕES DE *C. lobata* CONSTRUÍDA UTILIZANDO A MATRIZ DE DISTÂNCIA GENÉTICA DE NEI (1978; "UNBIASED GENETIC DISTANCE"). CÓDIGO DAS POPULAÇÕES, VER TABELA 1

A análise da distribuição da variabilidade genética de modo hierarquizado através da AMOVA indicou uma alta variação dentro das populações, abrangendo 93% de toda a variabilidade encontrada para a espécie, enquanto que a variação genética observada entre as populações representou apenas 7% do total. O índice de Φ_{ST} foi 0,067 demonstrando baixa estruturação genética entre as populações.

TABELA 5 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) PARA CINCO POPULAÇÕES DE *Cattleya lobata*, NOS INSELBERGUES DA MATA ATLÂNTICA NO RIO DE JANEIRO, SUDESTE DO BRASIL

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componente de variação	% variação total	P-value
Entre populações	4	118,822	29,706	7%	<0.000
Dentro das populações	83	1094,575	13,188	93%	<0.000
Total	87	1213,398		100%	

Através das análises Bayesianas, foi possível detectar um único contingente populacional (FIGURA 9), ou seja, as cinco populações amostradas pertencem a uma grande população.



FIGURA 9 – RESULTADO DAS ANÁLISES BAYESIANAS ATRAVÉS DO SOFTWARE STRUCTURE, INDICANDO UMA ÚNICA POPULAÇÃO DENTRO DA DISTRIBUIÇÃO DE *Cattleya lobata*.

4 DISCUSSÃO

Devido à rápida oxidação dos fragmentos foliares de *Cattleya lobata*, foi necessário o estudo preliminar de diferentes métodos para a extração do material genético, já que a qualidade das amostras é fundamental para o bom desempenho

de marcadores moleculares ISSR. Assim, o método proposto por Novaes *et al.* (2009), teve um bom desempenho ao extrair DNA de boa qualidade de plantas frescas, verificado com as quantificações em NanoDrop e pelos testes de PCR utilizando *primers* ISSR. A extração e armazenamento de DNA de alta qualidade são importantes não só para este estudo, cujo principal objetivo é conhecer a variabilidade genética de *C. lobata*, mas para trabalhos futuros que poderão ser executados com outras ferramentas moleculares, como os marcadores de sequência que podem acessar os processos históricos dessa espécie.

Aparentemente a intensa coleta e a ação antrópica foram fatores que contribuíram para a redução no número de indivíduos de *Cattleya lobata* (CONSTANTINO & FRAGA 2005). Consequentemente, essa redução leva à perda de variabilidade genética e diminuição da capacidade adaptativa às mudanças ambientais (YOUNG & BOYLE 2000). Portanto, este estudo se faz necessário por abordar a diferenciação e estruturação genética de populações naturais desta espécie, o que é fundamental para a escolha de estratégias para conservação e manejo.

De modo geral, podem ser encontrados baixos níveis de variabilidade genética em espécies endêmicas ou que apresentam populações com distribuição disjunta, ocupando habitats fragmentados ou isolados. Tais populações isoladas muitas vezes com tamanhos reduzidos estão mais susceptíveis a perdas progressivas da variabilidade genética devido aos efeitos de endogamia e deriva genética (HARTL & CLARK 1997). Porém, algumas espécies de orquídeas rupícolas de campos rupestres na Serra do Espinhaço, muitas das quais com características geográficas como descrito anteriormente, apresentam de moderados a altos níveis de variabilidade genética (BORBA *et al.* 2001, 2007a, 2007b; AZEVEDO *et al.*, 2007 e RIBEIRO *et al.*, 2008).

Os *primers* de ISSR revelaram de moderados a altos níveis de polimorfismo nas populações de *C. lobata* ($P = 80\%$) e no nível específico ($P = 98,81\%$). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos de outras orquídeas como *Cattleya elongata* Barb. Rodr. ($P = 52,10$ a $61,34\%$) (CRUZ 2007), *Cattleya tenuis* Campacci & P.L.Vedovello ($P = 43$ a 79%) (BORBA *et al.* 2007a), *Laelia speciosa* ($P = 68,8\%$ a $81,3\%$) (ÁVILA-DÍAZ 2007), *Dendrobium officinale* Kimura et Migo ($P = 73,3$ a $89,5\%$) (SHEN, 2006) e *Cymbidium goeringii* ($P = 88,2\%$) (XIAOHONG 2007) e, também, com outras monocotiledôneas como *Vellozia gigantea* ($P = 88,8\%$)

(LOUSADA, no prelo). Esses resultados de polimorfismo aliados aos dados de heteroziguidade e ao índice de diversidade de Shannon podem nos indicar o nível de variabilidade existente em determinada espécie. Aspectos biológicos como sistemas polinização, reprodução e dinâmica populacional determinam diferentes padrões da variabilidade genética para diferentes grupos de plantas (NYBOM & BARTISH 2000).

Neste estudo foram encontrados altos níveis de heteroziguidade esperada e índice de Shannon ($H_e = 0,271$; $I = 0,396$), o que também indicam alta diversidade genética. Esse perfil de variação está acima dos resultados obtidos com marcadores RAPD em trabalhos revisados por Nybom & Bartish (2000), quando comparados os níveis médios encontrados para espécies endêmicas, perenes e que compartilham características reprodutivas semelhantes.

O fato de esta espécie ser encontrada raramente como epífita pode ser um indício de que no passado essa espécie tenha ocorrido sob o hábito epifítico em matas de encostas localizadas entre os afloramentos rochosos. Portanto, possivelmente poderia haver uma distribuição mais contínua entre os picos das montanhas e que, atualmente, encontremos apenas indivíduos rupícolas, refugiados nos afloramentos devido ao extrativismo e degradação destas matas entre os afloramentos. Assim, a alta variabilidade genética encontrada nas populações de *C. lobata* pode nos indicar que, embora as populações encontradas atualmente sejam formadas possivelmente por poucos indivíduos sobreviventes de populações mais amplas no passado, reproduções cruzadas, mesmo que raras, podem ter sido a regra nas últimas gerações, mantendo os níveis de variabilidade genética intrapopulacional.

Além disso, a significativa proporção de ocorrência de reprodução vegetativa, sendo o crescimento clonal por brotamento decisivo para o aumento em área das touceiras pode garantir a conservação da variabilidade genética ao longo do tempo já que um mesmo genótipo pode permanecer por várias gerações (AZEVEDO *et al.* 2007).

Com base nas observações de Fraga *et al.* (dados não publicados) e nas semelhanças quanto à biologia floral e aspectos reprodutivos com diferentes espécies de *Cattleya* anteriormente estudadas, como *C. tenuis* e *C. elongata* (SMIDT *et al.* 2006), e outros grupos relacionados em Laellinae (e.g. BORBA & BRAGA 2003; SILVA-PEREIRA *et al.* 2007; FREIRE & FRAGA 2010), é bastante

provável que *C. lobata* também tenha polinização por engodo, sendo seus vetores abelhas com alta capacidade de forrageamento em longas distâncias. Orquídeas polinizadas por engodo normalmente apresentam baixo sucesso de polinização, principalmente devido à baixa frequência de polinizadores efetivos (ZIMMERMAN & AIDE 1989), o que conseqüentemente, acarreta muitas vezes em uma baixa frutificação (BORBA & BRAGA 2003). As condições ambientais (radiação solar, ventos e tempestades) em que se encontra *C. lobata*, pode ser um agravante à baixa frutificação (FRAGA, dados não publicados).

Esta ideia é bastante debatida na literatura a partir da hipótese proposta por Dressler (1981) de que a polinização por engodo pode reduzir significativamente a geitonogamia (transferência de pólen entre as flores de uma inflorescência). Promovendo assim, o fluxo de pólen a longas distâncias, o que favorece a fecundação cruzada, aumentando a variabilidade genética. Deste modo, o sistema de atração floral por engodo pode influenciar o comportamento dos polinizadores, aumentando o sucesso reprodutivo e fluxo gênico dentro e entre populações, modelando os processos evolutivos em uma série de espécies de orquídeas (TREMBLAY *et al.* 2005).

Neste mesmo sentido, tem sido considerado quase consenso que as minúsculas sementes de orquídeas dispersas pelo vento podem atuar como um fator importante no fluxo gênico, onde a chegada de novos indivíduos migrantes em populações distantes funcione como eficiente força coesiva entre populações geograficamente isoladas (ALCÂNTARA *et al.* 2006; DRESSLER 1981; AZEVEDO *et al.*, 2002).

Coutto *et al.* (no prelo) em estudos de simulação de dispersão pelo vento demonstram que as sementes de *C. lobata* percorrem longas distâncias. Tais resultados corroboram o padrão de alta similaridade genética encontrada entre todas as populações estudadas indicando que a dispersão de sementes nesta espécie pode garantir o fluxo gênico entre as populações isoladas nos diferentes inselbergs. Assim como para outras espécies quando há a dispersão de sementes para populações já estabelecidas, o nível de variação dentro da população tende a aumentar e a diferença entre a estrutura genética das diferentes populações tende a diminuir (MARTINS 1987), promovendo uma homogeneização entre as populações e manutenção do pool gênico.

Os resultados da análise hierárquica da variância molecular indicam que a maior parte da variação genética de *C. lobata* está concentrada dentro das populações (93%). Resultados semelhantes foram encontrados por Almeida *et al.* (2009) quando foi testada a variabilidade de populações de *Encyclia dichroma* (Lindl.) Schltr. e *E. ghillanyi* Pabst. Cruz (2007), também encontrou alta variação dentro das populações de *Cattleya elongata* Barb. Rodr., assim como Xiaohong (2007) para populações de *Cymbidium goering* e Sharma *et al.* (2000) para *Pterostylis gibbosa*, demonstrando que o perfil genético encontrado neste estudo parece ser bem distribuído na família Orchidaceae.

O resultado de Φ_{ST} (0,067) indica uma baixa diferenciação genética entre as populações e, portanto, ausência de estrutura genética que possa ser encontrada ao longo da distribuição geográfica da espécie. Baixos níveis de estruturação genética também foram encontrados em estudos com outras orquídeas de hábito epifítico como *Oncidium hookeri* (ALCÂNTARA *et al.* 2006) e *Laelia speciosa* (ÁVILA-DÍAZ & OYAMA 2007). Bem como em espécies endêmicas de campos rupestres no nordeste brasileiro, como *Sophronitis sincorana* e *C. elongata* (BORBA *et al.* 2007b, CRUZ 2007). Para espécies como *C. lobata*, que apresenta populações restritas aos afloramentos rochosos e encontram-se distribuída de forma disjunta entre as montanhas, num sistema próximo ao que se poderia considerar ilhas continentais, seria esperado apresentar uma maior estruturação. Apesar disso, as cinco populações apresentam pouca distância genética entre si. As populações do Complexo da Gávea com relação à população de Alto Mourão são as mais distantes geograficamente. E, apesar disso, geneticamente estão muito próximas.

O fato de estas plantas serem perenes e com ciclo de vida longo pode indicar que as populações restantes atualmente sejam apenas relictos de populações amplas e ligadas entre si por floresta entre os afloramentos, o que pode explicar a pouca diferenciação entre as populações atuais. A degradação florestal entre estes afloramentos, através da ocupação da cidade do Rio de Janeiro e Niterói, pode ser um evento muito recente (cerca de 400 anos) quando visto sob o ponto de vista de tempo de geração desta espécie. Tais argumentos são ainda fortalecidos pelos dados de alta variabilidade genética e coesão populacional sugerindo que as populações remanescentes são amostras isoladas de um mesmo contingente populacional mais antigo.

Apesar da alta variabilidade genética e a baixa estruturação entre as populações, *C. lobata* corre grandes riscos de extinção devido ao número reduzido de indivíduos por população e à rápida devastação florestal ao longo dos anos. Através dos resultados encontrados neste estudo, pode-se identificar apenas um contingente populacional, confirmado pelas análises Bayesianas, já que as populações possuem poucas diferenças genéticas entre si. Assim, o arcabouço de informações genéticas deste estudo permite, segundo o método e a amostragem utilizados, apontar que em futuros planos de manejo seja possível a reintrodução ou transferência de material genético (indivíduos, pólen ou sementes) oriundos de qualquer uma das populações analisadas sem que haja comprometimento no estoque genético das mesmas visto que as populações analisadas possuem alta variabilidade genética e pouca diferenciação entre elas.

REFERÊNCIAS

- Alcântara, S.; Semir, J.; Solferini, V. N. Low genetic structure in an epiphytic Orchidaceae (*Oncidium hookei*) in the Atlantic Rainforest of South-eastern Brazil. **Annals of Botany**, Exeter, v. 98, n. 6, p. 1207-1213, 2006.
- Almeida, P. R. M.; Góes-Neto, A.; van den Berg, C. Variabilidade genética em populações de *Encyclia dichroma* (Lindl.) Schltr. e *E. ghillanyi* Pabst (Laeliinae, Orchidaceae). In: Congresso Brasileiro de Genética, 55, 2009, Águas de Lindóia. **Anais do Congresso**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, p. 220, 2009.
- Asif, M. J.; Cannon, C. H. DNA extraction from processed wood: A case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*). **Plant Molecular Biology Reporter**, Tucson, v. 23, p. 185-192, 2005.
- Ávila-Díaz, I.; Oyama, K. Conservation genetics of na endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). **American Journal Botany**, St. Louis, v. 94, n. 2, p. 184-193, 2007.
- Azevedo, M. T. A.; Borba, E. L.; Semir, J.; Solferini, V. N. Very high genetic variability in Neotropical myophilous orchids. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 153, p. 33-40, 2007.

Azevedo, M. T. A.; Solferini, V. S.; Semir, J. Variabilidade genética e relações interespecíficas em *Bulbophyllum* (Orchidaceae). In: Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, X, 2002, Campinas. **Caderno de Resumos do Congresso**. Campinas: UNICAMP, p. 63, 2002.

Barbará, T.; Lexer, C.; Martinelli, G.; Mayo, S.; Fay, M. F.; Heuertz. Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculate*, *A. glaziouana* and *A. regina* (Bromeliaceae). **Heredity**, Londres, v. 101, p. 285-296, 2008.

Berg, E. E.; Hamrick, J. L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal of Forest Research**, New Westminster, v. 27, n. 3, p. 415-424, 1997.

Borba, E. L.; Braga, P. I. S. Biologia reprodutiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 541-549, 2003.

Borba, E. L.; Felix, J. M.; Solferini, V. N.; Semir, J. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 88, p. 419-428, 2001.

Borba, E. L.; Funch, R. R.; Ribeiro, P. L.; Smidt, E. C.; Silva-Pereira, V. Demografia, variabilidade genética e morfológica e conservação de *Cattleya tenuis* (Orchidaceae), espécie ameaçada de extinção da Chapada Diamantina. **Scientibus Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 7, n. 3, p. 211-222, 2007a.

Borba, E. L.; Funch, R. R.; Ribeiro, P. L.; Smidt, E. C.; Silva-Pereira, V. Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophranitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, [S.l.], v. 267, p. 129-146, 2007b.

Camargo, A.; Capobianco, J. P. R.; Oliveira, J. A. P. **Meio ambiente Brasil: avanços e obstáculos pós-Rio-92**. São Paulo: Estação Liberdade, 2002.

Constantino, P. & Fraga, C. N. Conservation strategy for *Laelia lobata* (Lindl.) H.J. Veitch: the most endangered orchid of Rio de Janeiro. **Selbyana**, Sarasota, v. 26, n. 12, p. 85-88, 2005.

Cota-Sánchez, J. H.; Remarchuk, K.; Ubayasena, K. Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. **Plant Molecular Biology Reporter**, Tucson, v. 24, p. 161-167, 2006.

Coutto, A. A. B.; Silva, M. G. A. J.; Santos, I. A.; Constantino, P. **Uso de simulações numéricas do vento na determinação das trajetórias de dispersão das sementes de *Cattleya lobata* Lindl. (Orchidaceae)**. No prelo.

Cruz, D. T. **Variabilidade genética e morfológica em populações de *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae) na Chapada Diamantina, Bahia**. 67 p. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2007.

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, [S.l.], v. 12, p. 13-15, 1990.

Dressler, R. L. **The orchids: natural history and classification**. Cambridge: Harvard University Press, 1981.

Esselman, E. J.; Jianqiang, L.; Crawford, D. J.; Windus, J. L.; Wolfe, A. D. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 8, p. 443-451, 1999.

Excoffier, L.; Smouse, P. E.; Quattro, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491, 1992.

Falk, D. A.; Holsinger, K. E. **Genetics and conservation of rare plants**. New York: Oxford University Press, 1991.

Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, Vancouver, 2007. STRUCTURE v.2.2. Disponível em: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>, acessado em 20/10/2010.

Fernández, J. F.; Sork, V. L.; Gallego, G.; López, J.; Bohorques, A.; Tohme, J. Cross-Amplification of microsatellite loci in a Neotropical *Quercus* species and standardization of DNA extraction from mature leaves dried in silica gel. **Plant Molecular Biology Reporter**, Tucson, v. 18, p. 397a-397e, 2000.

Fonseca, G. A. B. Biodiversity. In: **Ecology in Brazil: myths and realities**. Rio de Janeiro: Editora Jornal do Brasil, 1992.

Fraga, C. N. Plano de ação para conservação de *Cattleya lobata*. Rio de Janeiro, dados não publicados.

Freire, L. S. R.; Fraga, C. N. Ecologia reprodutiva de *Cattleya perrinii* Lindl. (Orchidaceae: Laelinae), como ferramenta para conservação da espécie. In: Congresso Nacional de Botânica, 61, 2010, Manaus. **Anais do Congresso**. Manaus: Sociedade Botânica do Brasil, 2010. CD-ROM.

Gao, L.; Yang, B. Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on ISSR analysis. **Biodiversity Science**, Pequim, v. 14, n. 03, p. 250-257, 2006.

Hartl, D. L.; Clark, A. G. **Principles of population genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1997.

Hollingsworth, P. M.; Ennos, R. A. Neighbour-joining trees, dominant markers and population genetic structure. **Heredity**, Londres, v. 92, p. 490–498, 2004.

Holsinger, K. E.; Lewis, P. O.; Dey, D. K. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 11, p. 1157–1164, 2002.

Holsinger, K. E.; Wallace, L. E. Bayesian approaches for the analysis of population genetic structure: an example from *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 13, p. 887-894, 2004.

Larson, S. R.; Jones, T. A.; Jensen, K. B. Population structure in *Pseudoroegneria spicata* (Poaceae: Triticeae) modeled by Bayesian clustering of AFLP genotypes. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 91, n. 11, p. 1789–1801, 2004.

Lim, S. H.; Liew, C. F.; Lim, C. N.; Lee, Y. H.; Goh, C. J. A simple and efficient method of DNA isolation from orchid species and hybrids. **Biologia Plantarum**, República Tcheca, v. 41, n. 2, p. 313-316, 1997.

Lima, R. S. N.; Santos, C. A. F.; Rodrigues, M. A.; Batista, P. P. **Ajustes no protocolo de extração CTAB 2X para extração de DNA em diversas espécies vegetais**. Petrolina: Embrapa Semiárido, p. 147-151, 2007. Disponível em: <http://www.cpatas.embrapa.br/public_eletronica/downloads/OPB1580.pdf>. Acesso em: 20/04/2010.

Lousada, J. M.; Borba, E. L.; Ribeiro, K. T.; Ribeiro, L. C.; Lovato, M. B. Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with landscape in Espinhaço Range, southeastern Brazil: implications for conservation. **Genetica**, Netherland, in press.

Martinelli, G. Mountain biodiversity in Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 587-597, 2007.

Martins, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “*in situ*”. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 35, p. 71-78, 1987.

Meirelles, S. T.; Pivello, V. R.; Joly, C. A. The vegetation of granite rock outcrops in Rio de Janeiro, Brazil, and the need for its protection. **Environmental Conservation**, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 10-20, 1999.

Moritz, C. Uses of molecular phylogenies for conservation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences**, Londres, v. 349, p. 113–118, 1995.

Murcia, C. Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. In: Schellas, J.; Greenberg, R. (ed). **Forest patches in tropical landscapes**. Island Press, Washington, 1996.

Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, Londres, v. 403, p. 853-858, 2000.

Novaes, R. M. L.; Rodrigues, J. G.; Lovato, M. B. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 86-96, 2009.

Nybom, H.; Bartish, I. V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, [S.l.], v. 3, p. 93-144, 2000.

Pabst, G. F. J.; Dungs, F. **Orchidaceae Brasiliensis**, v. 1. Hildesheim: Brücke-Verlag. 1975.

Pabst, G. F. J.; Dungs, F. **Orchidaceae Brasiliensis**, v. 2. Hildesheim: Brücke-Verlag. 1977.

Page, R. D. M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computational and Applied Biosciences**, Inglaterra, v. 12, p. 357–358, 1996.

Peakall, R., Smouse, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Vancouver, v. 6, p. 288-295, 2006.

Peixoto, A. L.; Rosa, M. M. T. da; Silva, I. M. Caracterização da Mata Atlântica. In: Sylvestre, S. L. S. & Rosa M. M. T. (Ed.). **Manual Metodológico para Estudos Botânicos na Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Editora Universitária Rural, 2002. p. 09-23.

Pereira, K. F. R.; Malafaia, C. B.; Silva, T. D.; Almeida, C. M. A.; Silva, A. G. Diversidade Genética em uma população de *Epidendrum cinnabarium* Salzm. Ex Lindl. (Orchidaceae) provenientes de inselbergue utilizando marcador molecular. In: *Congresso Nacional de Botânica*, 59, Natal. **Anais do Congresso**. Natal: Sociedade Botânica do Brasil, p. 31, 2008.

Porembski, S. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 579-586, 2007.

Porembski, S., Seine, S. R., Barthlott, W. Inselberg vegetation and the biodiversity of granite outcrops. In: **Granite Outcrops Symposium**, 1996. Journal of the Royal Society of Western Australia, Welshpool, v. 80, p. 193-199, 1997.

Reddy, M. P.; Sarla, N.; Siddiq, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, [S.l.], v. 128, n. 1, p. 9 – 17, 2002.

Ribeiro, P. L.; Borba, E. L.; Smidt, E. C.; Lambert, S. M.; Schnadelbach, A. S.; van den Berg, C. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum*

(Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. **Plant Systematics and Evolution**, [S.l.], v. 270, p. 109-137, 2008.

Ribeiro, R. A.; Lovato, M. B. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 1, p. 173-187, 2007.

Roy, B. A.; Widmer, A. Floral mimicry: a fascinating yet poorly understood phenomenon. **Trends in Plant Science** [S.l.], v. 4, n. 8, p. 325–330, 1999.

Saddi, E. M. **Orchidaceae dos Afloramentos Rochosos da Pedra da Gávea, Parque Nacional da Tijuca, Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado em Botânica), Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro, 2008.

Silva, J. R. S. S.; van den Berg, C. Variabilidade populacional de *Cattleya pfisteri* (Pabst & Senghas) van der Berg (Orchidaceae), Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. In: Congresso Nacional de Botânica, 59, Natal. **Anais do Congresso**. Natal: Sociedade Botânica do Brasil, p. 64, 2008.

Silva-Pereira, V.; Smidt, E. C.; Borba, E. L. Isolation mechanisms between two sympatric *Sophronitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. **Plant Systematics Evolution**, [S.l.], v. 269, p. 171-182, 2007.

Sharma, I. K.; Clements, M. A.; Jones, D. L. Observations of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa* R. Br. (Orchidaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, [S.l.], v. 28, n. 7, p. 651-663, 2000.

Shen, J.; Ding, X.; Liu, D.; Ding, G.; He, J.; Li, X.; Tang, F.; Chu, B. Intersimple Sequence Repeats (ISSR) Molecular Fingerprinting Markers for Authenticating Populations of *Dendrobium officinale* KIMURA et MIGO. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 29, n. 3, p. 420-422, 2006.

Smidt, E. C.; Silva-Pereira, V.; Borba, E. L. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to North-eastern Brazil. **Plant Species Biology**, [S.l.], v. 21, p. 85-91, 2006.

Smith, J. L.; Hunter, K. L.; Hunter, R. B. Genetic variation in the terrestrial orchid *Tripularia discolor*. **Southeastern Naturalist**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 17-26, 2002.

Stort, M. N. S.; Martins, P. S. Autopolinização e polinização cruzada em algumas espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae). **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 32, p. 1080-1084, 1980.

Storti, E. F. **Dinâmica populacional e biologia reprodutiva de *Cattleya eldorado* Linden (Orchidaceae)**. Tese (Doutorado em Botânica). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, 2007.

Swofford, D. L. **PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)**. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2003.

Tremblay, R. L.; Ackerman, J. D.; Zimmerman, J. K.; Calvo, R. N. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. **Biological Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 84, p. 1–54, 2005.

van den Berg, C. *Cattleya*. In: Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W. & Rasmussen, F. N. (Eds.). **Genera Orchidacearum**, v. 4. Oxford: Oxford University Press, p. 213-217, 2005.

van den Berg, C. New combinations in the genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). **Neodiversity**, Feira de Santana, v. 3, p. 3-12, 2008.

van den Berg, C.; Higgins, W. E.; Dressler, R. L.; Whitten, W. M.; Soto Arenas, M.; Culham, A. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. **Lindleyana**, Londres, v.15, p. 96-114, 2000.

van der Pijl, L.; Dodson, C.H. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. Florida: Coral Gables, University of Miami, 1966.

Xiaohong, Y.; Li, G.; Bo, Y. Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on Inter-simple sequence repeats analysis. **Frontiers of Biology in China**, [S.l.], v. 2, n. 4, p. 419-424, 2007.

Wallace, L. E. A comparison of genetic variation and structure in the allopolyploid *Platanthera huronensis* and its diploid progenitors, *Platanthera aquilonis* and *Platanthera dilatata* (Orchidaceae). **Canadian Journal of Botany**, Guelph v. 82, n. 2, p. 244–252, 2004.

Wang, H. Z.; Feng, S. G.; Lu, J. J.; Shi, N. N.; Liu, J. J. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Scientia Horticulturae**, [S.l.], v. 122, n. 3, p. 440-447, 2009.

Williams, J. G. K.; Hanafey, M. K.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods on Enzymology**, San Diego, v. 218, p. 704–740, 1993.

Withner, C. L. The Cattleyas. In: Withner, C. L. **The Cattleyas and their relatives**. Portland: Timber Press, 1988.

Young, A.; Boyle, T. Forest fragmentation. In: Young, A., Boyle, T., Boshier, D. (Ed). **Forest conservation genetics**. Melbourne: CISRO, p. 123-132, 2000.

Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, [S.l.], v. 20, p. 176-183, 1994.

Zimmerman, J. K.; Aide, T. M. Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. **American Journal Botany**, St. Louis, v. 76, p. 67-73, 1989.

ANEXO 1 – PROTOCOLOS ESCOLHIDOS PARA OS TESTES DE EXTRAÇÃO DE DNA

Cota-Sánchez *et al.* (2006)

As amostras foram maceradas em 750µL de tampão de extração (50mL de 1M tris-HCl, pH 8; 140mL de 5M de NaCl; 50mL de 0,25 de EDTA pH 8; 10g de CTAB) e 3µL de β-mercaptoetanol. Após a maceração, as amostras foram incubadas em banho-maria a 55-60°C por 2 horas e 30 minutos e invertidas a cada 15 minutos. Foi adicionado 700µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico) (24:1), homogeneizadas e centrifugadas a 11000rpm por 12 minutos. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para novo microtubo e adicionados 0,33 volumes de isopropanol gelado e estocado por 1 hora a -20°C. As amostras foram centrifugadas a 11000rpm por 10 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. Esse processo envolvendo o isopropanol foi repetido e o pellet foi ressuscitado com 200µL de água milliQ e 2µL de RNase (10mg/mL) e incubado por 30 minutos a 37°C. Foi adicionado 20µL de acetato de sódio 2,5M e 500µL de etanol gelado 95% e estocado a -20°C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 11000rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 1mL de etanol 70% e centrifugado por 4 minutos. Após a secagem, o pellet foi ressuscitado com 200µL de água milliQ.

Lima *et al.* (2007)

As amostras foram maceradas em 950µL de tampão de extração (500mM Tris-HCl pH 8, 1,4M NaCl, 0,2% CTAB (p/v), 2% β-mercaptoetanol, 20mM EDTA). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 60°C por 30 minutos, sendo homogeneizadas a cada 10 minutos e esfriadas. Foi adicionado 700µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico) (24:1) nas amostras e centrifugadas por 10 minutos a 6000rpm. Houve a formação de duas fases e a fase aquosa foi transferida para outros tubos e acrescentado 480µL de álcool isopropílico. As amostras seguiram para incubação em gelo por 30 minutos e a uma nova centrifugação por 10 minutos a 11000rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco a temperatura ambiente e diluído em 200 µL de água MilliQ. Decorridas 24 horas, foi adicionados 20µL de RNase e incubado em banho-maria a 37°C por 30 minutos, seguindo para armazenamento.

Novaes et al. (2009)

As amostras foram maceradas em 1mL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8, 1.4 M NaCl, 0,20 mM EDTA pH 8.0, 2% CTAB, PVP 2%), 20µL β-mercaptoetanol e 35µL proteinase K (1mg/mL). Após a moagem foram adicionados mais 35µL de SDS 20% e incubado por 60 minutos a 60°C. As amostras foram resfriadas e homogeneizadas com 600µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico) (24:1) por 5 minutos, seguindo para centrifugação a 12000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo e adicionado 140µL de CTAB 10% e 280µL de 5M NaCl, homogeneizando por 5 minutos. Essa última etapa foi repetida, seguindo para incubação overnight a -20°C em isopropanol gelado. As amostras foram centrifugadas a 12000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado três vezes com etanol 70% e dissolvido em 30µL de água MilliQ e 10µg/mL de RNase por 2 horas a 37°C.

Ribeiro & Lovato (2007) (com β-mercaptoetanol e com DTT)

As amostras foram maceradas em 1mL de tampão de extração (100mM acetato de sódio, pH 4,8; 100mM EDTA, pH 8; 500mM NaCl; 100mM β-mercaptoetanol, 2% PVP, pH5,5) e 60µL de proteinase K e incubadas por 1 hora a 55°C. Foi adicionados 70µL de SDS (sulfato de sódio dodecil) e incubado por 1 hora a 55°C. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos e o sobrenadante transferido a um novo tubo e adicionados 133,33µL de acetato de potássio 5M e incubadas por 30 minutos a -20°C. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos e o sobrenadante transferido a um novo microtubo e adicionado 333µL de isopropanol e incubado overnight a -20°C. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante retirado. O pellet foi dissolvido em 200µL de água milliQ e adicionado 100µL de NaCl 5M e 600µL de etanol absoluto gelado e incubado por 30 minutos a -20°C. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos e o pellet dissolvidos em 200µL de água milliQ. O RNA foi precipitado com 133,3µL de LiCl 8M gelado e incubado por 1 hora a -20°C. O RNA foi recuperado por centrifugação por 15 minutos e transferido o sobrenadante a outro microtubo. Ao precipitado de DNA foi adicionado 0,6 volume de isopropanol e incubado a -20°C por 1 hora. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos e o pellet lavado com etanol 70% e centrifugados por 5 minutos. O pellet foi seco e dissolvido em 200µL de água miliQ.

Fernandéz et al. (2000)

As amostras foram maceradas em 1mL de tampão de extração (10mM tris-HCl, pH 8; 20mM EDTA pH 8; 0,7M NaCl; 0,4M LiCl; 1% CTAB; 1% PVP-40 e 2% β -mercaptoetanol) e incubadas a 65°C por 15 minutos. Foram adicionados 750 μ L de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico) (24:1), invertidas e centrifugadas por 10 minutos a 14000rpm. Foram transferidos 600 μ L do sobrenadante para outro tubo e o DNA foi extraído novamente com 600 μ L de CIA. Foram adicionados 500 μ L de isopropanol gelado e centrifugado a 14000rpm por 5 minutos e descartado o sobrenadante. Os pellets foram lavados duas vezes com etanol 70% e secos em temperatura ambiente. Os pellets foram ressuspensos em 500 μ L de água milliQ e reprecipitados com 500 μ L de isopropanol gelado e 50 μ L de acetato de sódio 3M. As amostras foram centrifugadas a 14000rpm por 15 minutos e o pellet foi lavado com 1mL de etanol, seco em temperatura ambiente e ressuspensado em 100 μ L de água milliQ.

Asif & Cannon (2005)

As amostras foram maceradas em 1mL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 mM NaCl, 3% CTAB, 20 mM EDTA pH 8.0, 1% polyvinylpyrrolidone, 0.2% β -mercaptoetanol) e incubadas em banho-maria a 65°C por 2 horas. As amostras foram resfriadas e emulsificadas com 600 μ L de CIA, seguindo para centrifugação a 5000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo. Essa etapa foi repetida. Foi adicionado isopropanol gelado e as amostras foram incubadas a -40°C overnight. As amostras seguiram para centrifugação a 5000rpm por 20 minutos a 4°C e o pellet lavado em 1mL de tampão de lavagem (etanol 76% e 10mM acetato de amônio). A lavagem foi repetida por duas vezes e o pellet seco em temperatura ambiente. Novamente o pellet foi lavado duas vezes com etanol 70% e seco em temperatura ambiente.

Lim et al. (1998)

As amostras foram maceradas em 60 μ L de PVP (10mg/cm³) e 600 μ L de tampão de extração (10mM Tris-HCl pH8; 50mM EDTA pH8; 500mM NaCl e 100mM mercaptoetanol), seguido por 40 μ L de SDS 20%. Os tubos foram invertidos por alguns minutos e incubados por 10 minutos a 65°C. Foram adicionados 1/10 volume

de acetato de potássio 5M (pH 5,2) e incubados em gelo por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10000g por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado e adicionado 400µL de isopropanol, seguindo para incubação a -20°C por 1 hora. As amostras foram novamente centrifugadas a 10000g por 15 minutos a 4°C e ressuspendido em 200µL de água milliQ e 1µL de RNase A (10mg/cm³) e incubadas a 37°C por 30 minutos. Foi adicionado 600µL de fenol:clorofórmio (1:1), misturado e centrifugado a 10000g por 5 minutos a 4°C. A fase aquosa foi removida e repetida a extração com fenol:clorofórmio. Foram adicionados 70µL de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de etanol 100%, as amostras foram incubadas a -20°C por 1 hora e centrifugadas a 10000g por 10 minutos a 4°C. O pellet foi lavado com etanol 70%, seco e dissolvido em 25µL de água milliQ.