

UFRRJ
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E FLORESTAIS

TESE

Identificação de madeiras nativas por DNA *Barcode*

Kelly Carla Almeida de Souza Borges

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E FLORESTAIS

IDENTIFICAÇÃO DE MADEIRAS NATIVAS POR DNA *BARCODE*

KELLY CARLA ALMEIDA DE SOUZA BORGES

Sob a orientação do professor
Roberto Carlos Costa Lelis

e Co-orientação da professora
Evânia Galvão Mendonça

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Produtos Florestais

Seropédica, RJ
Julho de 2016

575.46

B732i

T

Borges, Kelly Carla Almeida de Souza, 1982-
Identificação de madeiras nativas por DNA
Barcode/ Kelly Carla Almeida de Souza Borges
- 2016.

84 f.: il.

Orientador: Roberto Carlos Costa Lelis.
Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Ciências Ambientais e
Florestais.

Bibliografia: f. 63-73.

1. Madeira - Teses. 2. Madeira -
Identificação - Teses. 3. Processamento da
madeira - Teses. 4. Madeira serrada -
Secagem - Teses. I. Lelis, Roberto Carlos
Costa, 1965-. II. Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Ambientais e Florestais. III.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E FLORESTAIS

KELLY CARLA ALMEIDA DE SOUZA BORGES

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Produtos Florestais.

TESE APROVADA EM: 13/07/2016



Roberto Carlos Costa Lelis. Prof. Dr. UFRRJ
(Orientador)



Arie Fitzgerald Blank. Prof. Dr. UFS



Graciela Inês Bolzon de Muniz. Profª. Drª. UFPR



Rodrigo Studart Corrêa. Prof. Dr. UnB



Rosilei Aparecida Garcia. Profª. Drª. UFRRJ

*Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Nada sei....
Todo mundo ama um dia todo mundo chora,
Um dia a gente chega, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz.*

Almir Sater / Renato Teixeira

DEDICATÓRIA

*Ao meu marido Marcio Borges, por cada incentivo, por estar sempre ao meu lado, não apenas dizendo e mostrando o que eu quero e, sim, o que eu preciso.
Muito obrigada por tudo. Amo você.*

AGRADECIMENTOS

A Deus: Pai nosso que estás no céu, santificado seja o Vosso nome. Venha a nós o Vosso Reino. Seja feita a Vossa vontade, assim na Terra como no Céu. O pão nosso de cada dia nos dai hoje. Perdoai as nossas ofensas assim como nós perdoamos a quem nos tem ofendido. E não nos deixeis cair em tentação, mas livrai-nos do mal! Só com muita fé em Deus para chegar ao fim desse projeto e concretizar esse sonho, aproveito para agradecer à Nossa Senhora Aparecida, minha santinha querida,

Aos meus pais Wilson e Janice, sem vocês, em todos os aspectos, eu não chegaria aqui!

A minha melhor amiga e irmã Suelen pelo incentivo de sempre,

Ao professor Heber dos Santos Abreu, in memoriam, que foi meu orientador da iniciação científica ao doutorado, por acreditar na minha força de vontade para conduzir todos os projetos que fizemos juntos e permitir que eu conhecesse o que é fazer pesquisa de verdade,

A professora e amiga Evânia Galvão Mendonça, por aceitar meu convite de co-orientação e estar do meu lado literalmente, da bancada às correções finais,

Ao professor e amigo Roberto Carlos Costa Lelis que assumiu minha orientação em um momento muito difícil, sempre disposto a ajudar e com uma humildade presente no coração de poucos,

A professora Sônia Regina de Souza e ao Professor Leandro Azevedo, ambos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, só tenho a dizer MUITO OBRIGADA MESMO e ainda acho que não é o suficiente,

As minhas amigas Suely Dias, Priscilla Moredjo e Ana Alice Tavares porque Deus coloca uns anjos em nossos caminhos com nomes de Bolsistas de Iniciação Científica, e aos colegas dos Laboratórios de Nutrição Mineral de Plantas, de Química da Madeira e Anatomia da Madeira,

A amiga Keiti Roseani por trazer as madeiras do Acre,

As minhas amigas Natalia Dias e Vanessa Coelho,

Ao técnico José Carlos, valeu Zé,

A minha chefe Claudia Regina (ICCE- SPD) pelo apoio nas inúmeras trocas de plantão para conduzir os experimentos,

A Stephanie Choi, da Macrogen, por todas as dúvidas tiradas desde o envio das amostras até as análises do sequenciamento,

A todos que me ajudaram,

MUITO OBRIGADA DO FUNDO DO MEU CORAÇÃO!

RESUMO

BORGES, Kelly Carla Almeida de Souza. **Identificação de madeiras nativas por DNA Barcode**. 2016. 84p. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Departamento de Produtos Florestais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

O DNA *Barcode* é uma tecnologia em que se utiliza um fragmento de DNA para identificar espécies de forma rápida e precisa. Devido a grande dificuldade encontrada para identificar madeiras nativas, principalmente, se as mesmas estiverem secas e processadas, o presente trabalho teve como objetivo verificar a possibilidade de extrair, amplificar e sequenciar o DNA de madeira de cerne seco de espécies nativas comercializadas no Estado do Rio de Janeiro, grande consumidor de madeira. As madeiras estudadas foram: amarelão (*Aspidosperma vargasii*), araracanga (*Aspidosperma desmanthum*), caju-açu (*Anacardium giganteum*), cedro (*Cedrela odorata*), cerejeira (*Amburana acreana*), cumaru (*Dypterix odorata*), peroba-mica (*Aspidosperma macrocarpon*), piquiarana (*Caryocar glabrum*), roxinho (*Peltogyne confertiflora*) e seru (*Allantona lineata*). As características anatômicas da madeira macroscópicas das madeiras foram verificadas com auxílio de lupa (aumento de 10x) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A extração de DNA foi conduzida por meio de teste de cinco protocolos e com seis repetições. Por tratar-se de material degradado, o DNA foi amplificado com enzima Taq polimerase Platinum para aumentar a eficiência da amplificação. O gene escolhido como marcador foi o *rbcL*, gene de região conservada. As etapas de purificação e sequenciamento das amostras foram conduzidas pela empresa Macrogen (Seoul, Coreia do Sul). O melhor protocolo para extração de DNA de cerne seco foi o kit Qiagen (protocolo 2) e para essa técnica o grau de pureza das amostras é mais importante que maiores concentrações de DNA. Foi possível amplificar o DNA de todas as amostras e identificar a sequência “DNA Barcode” para as espécies amarelão (*Aspidosperma vargasii*), cumaru (*Dypterix odorata*) e seru (*Allantona lineata*). Para as demais espécies, não houve variação que permitisse selecionar a sequência Barcode, mas as sequências obtidas foram listadas, já que o sequenciamento das mesmas ainda não tinha sido citado na literatura. O resultado encontrado no presente trabalho pode ser utilizado como uma ferramenta de identificação de madeiras tanto no âmbito da fiscalização florestal, quanto para agregar valor ao comércio madeireiro através de certificação de madeiras identificadas por métodos moleculares.

Palavras-chave: cerne, *rbcL*, sequenciamento

ABSTRACT

BORGES, Kelly Carla Almeida de Souza. **Identification of brazilian woods by DNA Barcode.** 2016. 84p. Thesis (Doctorate in Environmental and Forest Sciences). Forest Institute, Forest Products Departments, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

DNA barcode is a DNA fragment to identify species quickly and accurately. Considering the difficulty to identify native woods, especially if they are dry and processed, this study aimed to verify the possibility of extracting, amplifying and sequencing the DNA of dry heartwood of species commercialized in Rio de Janeiro. The studied woods were: *Aspidosperma vargasii*, *Aspidosperma desmanthum*, *Anacardium giganteum*, *Cedrela odorata*, *Amburana acreana*, *Dypterix odorata*, *Aspidosperma macrocarpon*, *Caryocar glabrum*, *Peltogyne confertiflora* and *Allantona lineata*. The anatomical characteristics of the macroscopic wood woods were checked with magnifying aid (10X magnification) and scanning electron microscopy (SEM). The DNA extraction was conducted using five test protocols and six replicates. Because it is degraded material, the DNA was amplified with Platinum Taq polymerase enzyme to increase amplification efficiency. The gene chosen as a marker was the *rbcL*, conserved region gene. The steps of purification and sequencing of the samples were conducted by Macrogen company (Seoul, South Korea). The best protocol for dry heartwood DNA was extracted using Qiagen kit (protocol 2) and for this technique, the purity of samples is more important that increased concentrations of DNA. It was possible to amplify DNA from all samples and identify the sequence "DNA barcode" for *Aspidosperma vargasii*, *Dypterix odorata* and *Allantona lineata*. For other species, allowing no variation select the barcode sequence, but the listed sequences were obtained, since the same sequence had not yet been reported in the literature. The results found in this study can be used as a timber identification tool both in the forest inspection, and to add value to timber trade through certification woods identified by molecular methods.

Keywords: heartwood, *rbcL*, sequencing

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais compostos na extração de DNA e suas respectivas funções	13 -
Tabela 2. Relação entre os protocolos utilizados e a concentração de DNA extraído de madeira	15 -
Tabela 3. Sequências Forward (F) e Reverse (R) de Indicadores para as isoformas de genes utilizados na amplificação de DNA de madeira	19 -
Tabela 4. Plataformas de sequenciamento para genomas de plantas	23 -
Tabela 5. Espécies de madeiras estudadas	23 -
Tabela 6. Protocolos de extração de DNA e as respectivas concentrações de cada reagente utilizado	26 -
Tabela 7. Sequências Forward (F) e Reverse (R) para a amplificação dos genes matK e rbcL por PCR para madeiras	27 -
Tabela 8. Reagentes utilizados na reação de PCR, volume e concentração final de cada reagente sem aditivo.....	28 -
Tabela 9. Reagentes utilizados na reação de PCR, volume e concentração final de cada reagente com aditivo "PCR enhancer (PCRxE)"	28 -
Tabela 10. Concentração de DNA (ng/ μ L) das madeiras em cada protocolo testado	35 -
Tabela 11. Análise da qualidade, em função do grau de pureza, das amostras de DNA (Razão A260/A280nm).....	36 -
Tabela 12. Análise da qualidade das amostras, em função do grau de pureza, de DNA (Razão A230/A260 nm).....	37 -
Tabela 13. Protocolos que permitiram amplificar as amostras de DNA de madeira de cerne seco das espécies testadas	41 -
Tabela 14. Discriminação de sequências (Barcodes) dentre as espécies estudadas.....	58 -
Tabela 15. Discriminação de sequências (Barcodes) de menor variação dentre as espécies estudadas.....	59 -

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes estágios do processo de formação de madeira e os respectivos fatores envolvidos.....	- 5 -
Figura 2. Estrutura parcial de uma molécula de celulose.....	- 6 -
Figura 3. Estrutura molecular de hemicelulose.....	- 6 -
Figura 4. Caminho proposto para a biossíntese dos precursores da lignina.....	- 8 -
Figura 5. Ilustração dos planos de corte da madeira (Fonte: o autor).....	- 10 -
Figura 6. Representação esquemática da técnica do DNA Barcode.....	- 12 -
Figura 7. Ilustração das bandas marcadas a partir do marcador de peso molecular 1 kb.....	- 29 -
Figura 8. Madeira de cerne de amarelão.....	- 31 -
Figura 9. Madeira de cerne de araracanga.....	- 31 -
Figura 10. Madeira de cerne de caju-açu.....	- 31 -
Figura 11. Madeira de cerne de cedro.....	- 32 -
Figura 12. Madeira de cerne de cerejeira.....	- 32 -
Figura 13. Madeira de cerne de cumaru.....	- 33 -
Figura 14. Madeira de cerne de peroba-mica.....	- 33 -
Figura 15. Madeira de cerne de piquiarana.....	- 34 -
Figura 16. Madeira de cerne de roxinho.....	- 34 -
Figura 17. Madeira de cerne de seru.....	- 35 -
Figura 18. Teste de amplificação dos produtos de PCR para as madeiras amarelão e cerejeira sem aditivo PCR enhancer.....	- 39 -
Figura 19. Teste de amplificação dos produtos de PCR para as madeiras amarelão e cerejeira com aditivo PCR enhancer.....	- 40 -
Figura 20. Gel de eletroforese das amostras de todas as espécies amplificadas pelo Protocolo 2.....	- 42 -
Figura 21. Gel de eletroforese das amostras de todas as espécies amplificadas pelo Protocolo 4:.....	- 43 -
Figura 22. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de amarelão.....	- 45 -
Figura 23. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de araracanga.....	- 46 -
Figura 24. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de caju açu.....	- 47 -
Figura 25. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de cedro.....	- 48 -
Figura 26. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de cerejeira.....	- 49 -
Figura 27. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de cumaru.....	- 50 -
Figura 28. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de peroba mico.....	- 51 -
Figura 29. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de piquiarana.....	- 52 -
Figura 30. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de roxinho.....	- 53 -
Figura 31. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de seru.....	- 54 -
Figura 32. Alinhamento de nucleotídeos para as espécies testadas.....	- 56 -
Figura 33. Matriz de similaridade para o alinhamento de nucleotídeos para as madeiras de cerne de espécies testadas.....	- 57 -
Figura 34. Alinhamento de aminoácidos para as madeiras de cerne das espécies estudadas....	- 60 -
Figura 35. Matriz de similaridade para o alinhamento de aminoácidos para as espécies testadas:.....	- 60 -
Figura 36. Árvore filogenética das espécies estudadas.....	- 61 -

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	- 1 -
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	- 3 -
2.1 Fiscalização e Certificação florestal.....	- 3 -
2.2 Formação Genética da Madeira.....	- 4 -
2.3 Técnicas de Identificação da Madeira.....	- 9 -
2.4 DNA <i>Barcode</i> – O Código de Barras da Vida.....	- 11 -
2.5 Extração de DNA de madeira.....	- 12 -
2.6 Amplificação de DNA.....	- 18 -
2.7 Genes <i>Barcodes</i> para Plantas: <i>rbcL</i> e <i>matK</i>	- 20 -
2.8 Plataformas de Sequenciamento para Tecidos de Origem Vegetal.....	- 22 -
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	- 23 -
3.1 Material.....	- 23 -
3.2 Caracterização Macroscopia e Microscopia da Madeira.....	- 24 -
3.3 Teste de Protocolos de Extração de DNA de Madeiras Secas.....	- 24 -
3.4 Avaliação da Quantidade e Qualidade do DNA Isolado.....	- 26 -
3.5 Amplificação de DNA de Madeiras Secas por PCR.....	- 27 -
3.6 Eletroforese em Gel de Agarose.....	- 28 -
3.7 Purificação e Sequenciamento do DNA.....	- 29 -
3.8 Análise do Sequenciamento e Filogenia.....	- 29 -
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	- 30 -
4.1 Estrutura Macroscópica das Madeiras.....	- 30 -
4.2 Avaliação de Protocolos de Extração de DNA de Madeiras Secas.....	- 35 -
4.3 Amplificação de DNA de Madeiras Secas: Teste de Primers e Aditivo.....	- 38 -
4.4 Amplificação de DNA.....	- 41 -
4.5 Análise do Sequenciamento.....	- 44 -
5 CONCLUSÃO.....	- 62 -
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 63 -

1 INTRODUÇÃO

O Estado do Rio de Janeiro é considerado um grande consumidor de madeira, o 2º maior do Brasil, apresentando atualmente uma demanda de cerca de 3,6 milhões de metros cúbicos (PAINEL FLORESTAL, 2013). No entanto, apenas 11% do seu consumo são atendidos pela produção dentro de suas fronteiras (COUTINHO; VARGAS, 2013), sendo o maior volume de madeira consumida no estado proveniente do norte do Brasil, região que tem sofrido com o impacto do desmatamento.

Em outubro de 2015 as florestas degradadas na Amazônia Legal abrangeram 1.009 km², representando, em relação a outubro de 2014, um aumento de 115%, quando a degradação florestal somou 468 km². Os estados com maior incidência de desmatamento são: Mato Grosso (29%), Rondônia (26%), Pará (24%) e Amazonas (16%), com menor ocorrência no Roraima (2%), Tocantins (2%) e Acre (1%) (FONSECA et al., 2015).

A extração ilegal de madeira movimenta cerca de US\$ 100 bilhões ao ano e de acordo com estimativas do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (Pnuma), 30% de toda madeira comercializada no planeta tem origem suspeita e em alguns países essa proporção chega a 90% do total (AVANCINI, 2014).

A madeira explorada de forma ilegal na Amazônia é comercializada nos grandes centros urbanos do Brasil, como é o caso do Rio de Janeiro, e apesar da existência de fiscalização nas estradas do país, a madeira segue sem empecilhos mediante a dificuldade em identificá-la.

Entretanto, esse problema pode ser solucionado pelo emprego de métodos técnicos como a utilização de exsicatas que permitam a identificação do material botânico e a identificação anatômica da madeira (REIS, 2015).

O emprego de tais métodos poderá ajudar, preliminarmente, no momento da fiscalização, porém os mesmos apresentam certas limitações, sendo a maior delas correlacionadas ao tempo, pois a identificação por meio dessas técnicas não é feita de forma imediata, o que pode gerar um grande transtorno. Outrossim, ainda pode gerar dúvidas quanto à identificação.

Deve ser ressaltado que muitas vezes a madeira proveniente de corte ilegal é encontrada na serraria já processada, restando apenas os seus vestígios, não sendo assim possível fazer a análise dos seus caracteres anatômicos.

Devido a essas limitações, a utilização de um método científico que envolva a identificação genética de árvores facilitará a fiscalização de madeiras transportadas, visto que os seus benefícios são inúmeros, a começar pelo menor tempo de análise e maior controle de produtos oriundos de exploração ilegal no Brasil. Além disso, permitir que o consumidor tenha maior garantia da qualidade e procedência do produto madeireiro adquirido.

O “DNA *Barcode*”, técnica proposta por Paul Hebert em 2003, é um tipo de identificação taxonômica baseada na utilização de um pequeno fragmento padronizado de DNA, codificador de um gene, sendo essas sequências de DNA vistas como um “código de barras” armazenados no interior das células. Essa técnica permite que a identificação do material botânico possa ser realizada por qualquer pessoa, sendo uma ferramenta utilizada tanto para complementar os estudos taxonômicos, como também um dispositivo inovador para os não especialistas que precisam fazer uma rápida identificação do material (HEBERT et al., 2003).

Ideologicamente, o *Barcode* deve variar o suficiente para solucionar a identificação em nível taxonômico de espécie, pequeno o bastante para facilitar a manipulação e de baixo custo (DONG et al., 2015). Além disso, trata-se de uma técnica que pode superar as possíveis

limitações encontradas para identificar a madeira através das características anatômicas e fornecer informações eficazes com alta resolução (JIAO et al., 2015).

De acordo com o CBOL (*Consortium for the Barcoding of Life*) *Plant Working Group*, resultados significativos foram obtidos pela combinação dos marcadores *rbcL* e *matK*, genes plastidiais utilizados com frequência na sistemática molecular vegetal e que foram selecionados como os mais promissores pelo CBOL *Plant Working Group* (2009).

O gene *rbcL* codifica para a enzima ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase, responsável por incorporar o gás carbônico (CO₂) a uma molécula orgânica na fotossíntese e o gene *matK* codifica para a enzima maturase K, que codifica o RNA transportador para a lisina (trnK), ambos são genes de regiões conservadas e por isso são citados de forma satisfatória como genes *Barcode* (CHASE et al., 2005).

Essas informações indicam que a técnica do DNA *Barcode* é promissora e pode ser grande aliada na fiscalização dos produtos madeireiros comercializados no Estado do Rio de Janeiro, além de agregar valor à certificação dos produtos.

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo de extração de DNA de madeiras secas; amplificar e sequenciar o DNA extraído; e identificar as sequências *Barcodes* para cada madeira testada visando a aplicação para a melhorar a qualidade da fiscalização e certificação florestal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fiscalização e Certificação florestal

Estimativas indicam que entre 43% e 80% da produção madeireira da região amazônica seja ilegal, proveniente de áreas desmatadas ou exploradas de forma predatória e insustentável. Cerca de 75% dessa produção é destinada ao mercado interno. Dessa forma, existe grande possibilidade de que boa parte das empresas que utilizam madeira da região amazônica esteja voluntária ou involuntariamente usufruindo de madeira de origem ilegal ou predatória (ZENID et al., 2009).

Em resposta à exploração de florestas de forma desordenada surge no final dos anos 80 o conceito de Certificação Florestal, método utilizado para avaliar se uma floresta (florestas nativas ou plantações florestais) está sendo manejada de acordo com padrões ambientais, econômicos e sociais pré-estabelecidos. A certificação florestal está baseada em três pilares da sustentabilidade, que são: o ecologicamente correto, o socialmente justo e o economicamente viável. Este processo deve afirmar, de modo confiável e independente, a adequação especificada pelo órgão credenciador (SILVA, 2005).

A certificação florestal é utilizada visando um controle da degradação ambiental e uma maior eficiência na cadeia de produção de produtos florestais, podendo ser solicitada por qualquer empresa ou pessoa que extraia, produza, industrialize ou consuma matéria prima ou produtos de origem florestal. A certificação florestal ainda oferece muitas vantagens para as empresas certificadas, como: um melhor acesso ao mercado altamente competitivo para produtos florestais madeireiros e não madeireiros; preços diferenciados; além dos produtos certificados apresentarem uma imagem melhor ao consumidor, dentre outros benefícios (CARNEIRO, 2007).

Do ponto de vista ambiental, a certificação contribui para a conservação da biodiversidade e seus valores associados, como: manutenção dos recursos hídricos, dos solos, das paisagens, das funções ecológicas e a integridade das florestas, bem como a proteção das espécies ameaçadas ou em perigo de extinção e seus habitats. Além de envolver auditoria das atividades das instituições florestais para verificar se as áreas estão sendo exploradas de acordo com os aspectos sociais, ambientais e econômicos, conforme descritos nos princípios e critérios do *Forest Stewardship Council* (FSC). Como a certificação é voluntária, a iniciativa tem que ser dos proprietários da floresta, que pode ser privada ou pública (SUITER FILHO, 2002).

Há muitos tipos de sistemas de certificação florestal já difundidos no mundo. No Brasil os mais utilizados são o *Forest Stewardship Council* (FSC) e o Programa Brasileiro de Certificação Florestal (Cerflor). O *Forest Stewardship Council* (FSC) é uma organização não governamental independente e sem fins lucrativos com objetivo de desenvolver princípios e critérios do bom manejo florestal para a certificação, podendo também credenciar e monitorar organizações certificadoras independentes (FRANCO, 2013).

Os órgãos credenciados pelo FSC podem emitir dois tipos de certificação, a certificação do manejo florestal, para certificar as operações do manejo florestal (IMAFLOA, 2002), e a certificação da cadeia de custódia, que certifica os produtos florestais (NARDELLI; TOMÉ, 2002).

Segundo a ABNT NBR 14.790 (2014) a cadeia de custódia pode ser definida como “o conjunto das sucessivas etapas de transformação ou comercialização de produtos florestais, desde as unidades de manejo florestal até o consumidor final, controlando em cada etapa o conteúdo da matéria prima oriunda de cada unidade de manejo florestal”. Com isso, a certificação com base na

cadeia de custódia tem por finalidade assegurar que o produto florestal utilizado tenha sido originado de uma floresta certificada, obtendo informações quanto aos locais avaliados, os produtos e os processos que foram utilizados no beneficiamento destes produtos.

A obtenção do selo FSC por uma empresa deve seguir os Princípios e Critérios (P&C) do FSC, que são os mesmos para o mundo inteiro, independentemente do tipo de floresta ou do país onde ela esteja localizada. Eles se referem ao desempenho da unidade florestal e no caso de florestas naturais, o manejo florestal baseado nos P&C do FSC procura “imitar” a dinâmica natural da floresta, visando promover a regeneração natural da mesma (SPATHELF et al., 2004).

Já o Programa Brasileiro de Certificação Florestal (Cerflor), lançado em 2002, é uma certificação brasileira que estimula o manejo florestal adequado no país, sendo coordenado pelo INMETRO. O Cerflor procura desenvolver e criar mecanismos para que pequenos e médios produtores florestais possam obter a certificação e difundir a certificação de cadeia de custódia. Desde 2005, o Cerflor é reconhecido internacionalmente pelo Programa de Endosso de Esquemas de Certificação Florestal (PEFC) (LUZ, 2010).

O PEFC estabelece os mecanismos para o reconhecimento mútuo dos sistemas nacionais, enquanto a ISO 14001 (Sistema de Gestão Ambiental) está relacionada ao cumprimento de normas de gestão ambiental do processo produtivo, evitando duplicidade de trabalhos e custos relacionados com a certificação do manejo de florestas, eliminando barreiras técnicas ao comércio, permitindo o acesso dos produtos oriundos de florestas certificadas aos mercados externos e conferindo credibilidade pública ao sistema (SBS, 2006).

Para auxiliar na fiscalização das madeiras extraídas das florestas brasileiras, o Ministério do Meio Ambiente criou um documento eletrônico intitulado Documento de Origem Florestal (DOF), uma licença obrigatória para o transporte e armazenamento de produtos e subprodutos florestais de origem nativa, contendo as informações sobre a procedência desses produtos (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2006).

O controle do transporte da madeira é uma medida necessária e urgente, porém não deve ser a única. Para evitar o desmatamento ilegal o governo deve investir em alternativas, uma delas está relacionada aos processos de certificação florestal (POLITI, 2006).

O Brasil conta com empresas certificadoras que possuem grande importância para o setor florestal na economia brasileira, sendo assim, a fiscalização por meio do processo de certificação atua diretamente no PIB nacional. O setor florestal contribui com uma parcela importante para a economia brasileira, gerando produtos para consumo direto ou para exportação, impostos e empregos para a população e, ainda, atuando na conservação e preservação dos recursos naturais. De acordo com a classificação do Programa Nacional de Florestas (PNF) do Ministério do Meio Ambiente, oito cadeias produtivas exploram o patrimônio florestal: chapas e compensados, óleos e resinas; fármacos; cosméticos; alimentos; carvão, lenha e energia; papel e celulose; madeira e móveis (REMADE, 2008).

2.2 Formação Genética da Madeira

A madeira é um material heterogêneo, constituído por células cujas formas e tamanhos variam de acordo com a espécie, e que pode ser agrupado em duas categorias distintas: coníferas e folhosas. A parede de cada célula é formada pelas seguintes camadas: lamela média, parede primária (P), parede secundária externa (S1), parede secundária média (S2) e parede secundária

interna (S3). A integridade estrutural destes tecidos é atribuída à lamela média, uma camada que mantém as células adjacentes unidas entre si (ROWELL et al., 2012)

O processo de formação da madeira (Figura 1), também conhecido como xilogênese, é resultante do desenvolvimento do xilema secundário que ocorre através de cinco etapas: divisão celular, alongamento, biossíntese da parede celular (envolvendo a deposição de celulose e hemicelulose), lignificação e morte celular programada (CHAFFEY, 1999).

A presença de vários tipos de células e tecidos vasculares é compatível com a diversidade de genes associados nesse processo e que respondem aos sinais ambientais e de desenvolvimento da planta. A descoberta desses genes torna possível o conhecimento das fases de diferenciação das células xilemáticas (PLOMION et al., 2001; PEREIRA et al., 2003).

Em termos de composição química, a madeira é constituída por quatro principais compostos na parede celular secundária: polissacarídeos (celulose e hemiceluloses), ligninas, proteínas da parede celular e outros compostos menos solúveis (estilbenos, flavonóides, taninos e terpenos) e insolúveis (pectinas e outras proteínas da parede celular) em solvente neutro (HIGUCHI, 1997).

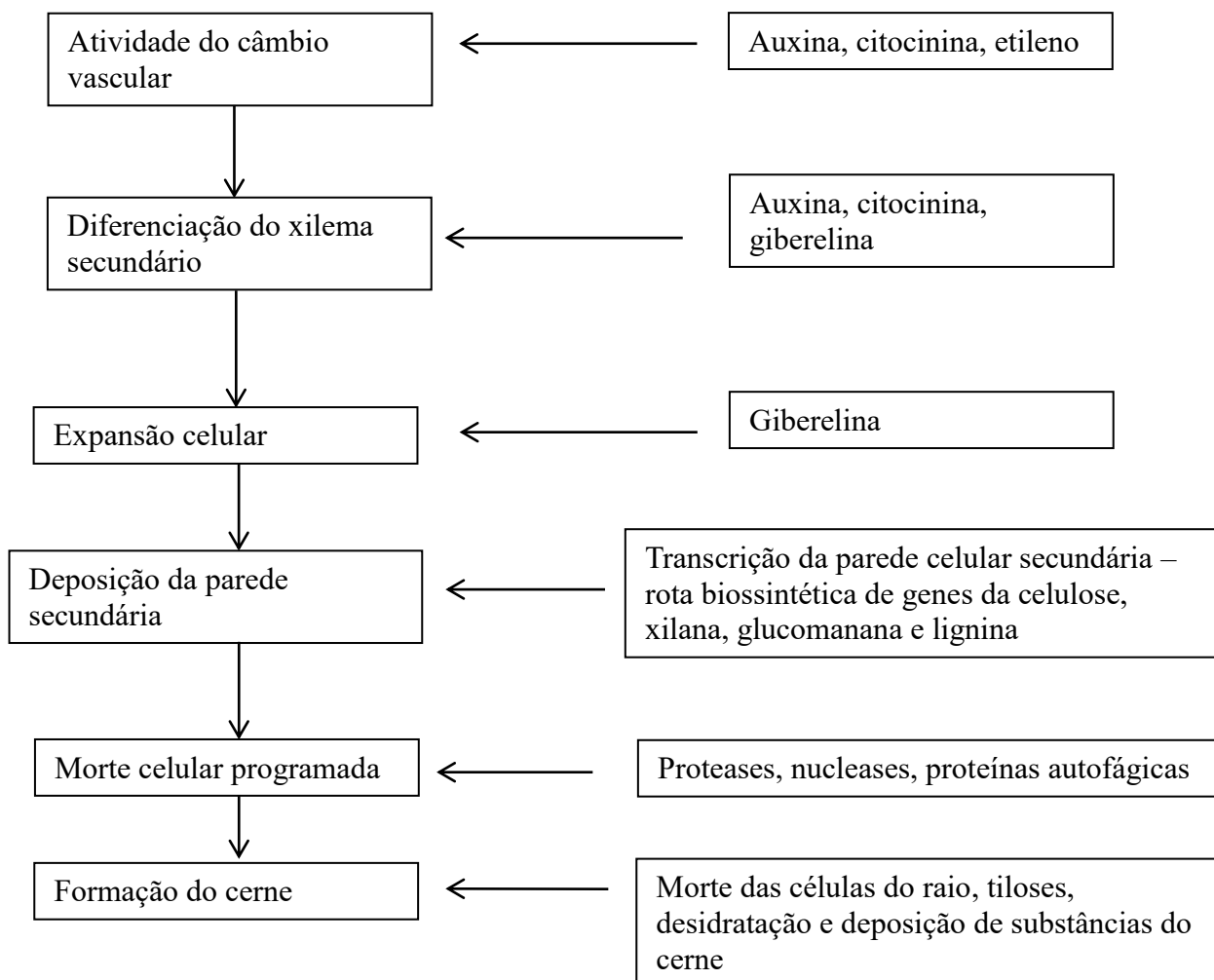


Figura 1. Diferentes estágios do processo de formação de madeira e os respectivos fatores envolvidos (adaptado de YE; ZHONG, 2015)

A celulose (Figura 2) é o componente mais abundante da madeira, compondo de 30% a 50% do seu peso seco, é um homopolissacarídeo linear constituído unicamente por moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4), que resultam em cadeias lineares. A celulose é produzida na forma de microfibrilas, semi-cristalina e cada microfibrila consiste de cerca de 36 cadeias lineares de resíduos de glicose interligados na conformação β (1 \rightarrow 4), cuja organização determina as propriedades mecânicas da célula e promove o suporte e resistência à parede celular. A quantidade de celulose é diferenciada entre a parede primária e a secundária, sendo, respectivamente de 10 a 40% e de 40 a 60% (DELMER, 1999)

A biossíntese da celulose, de ocorrência na membrana plasmática, começou a ser elucidada com *Arabidopsis* através de um estudo dos genes que codificam a subunidade catalítica do complexo Sintase da Celulose (CS). Entre os 10 genes CS identificados no genoma de *Arabidopsis*, acredita-se que AtCSA8, AtCSA7 e AtCSA4 estejam relacionados com a biossíntese da celulose na parede secundária (SUZUKI et al., 2006).

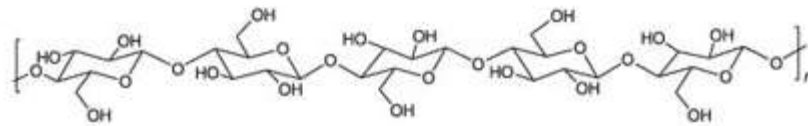


Figura 2. Estrutura parcial de uma molécula de celulose (ROWELL et al., 2012)

A hemicelulose (Figura 3), um polissacarídeo heterogêneo, é o segundo composto mais abundante na madeira, estando associada às microfibrilas de celulose para formar uma matriz na parede celular vegetal. A biossíntese desse polímero é resultante da atuação dos genes da celulose sintase e ocorre no Complexo de Golgi em duas etapas: a síntese da cadeia central, que se dá pela atividade da enzima formadora de polissacarídeo; e a adição de resíduos laterais à cadeia por reações catalisadas por uma variedade de glicosil-transferases (LEROUXEL et al., 2006).

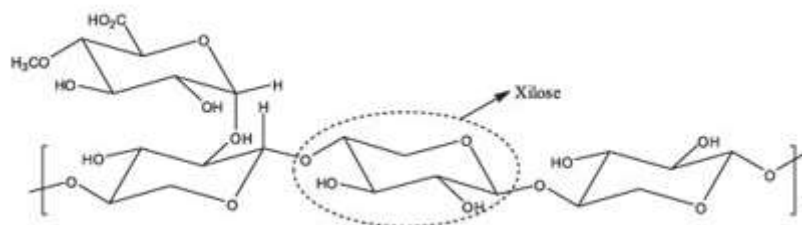


Figura 3. Estrutura molecular de hemicelulose (ROWELL et al., 2012)

O terceiro composto mais abundante da madeira é a lignina correspondendo cerca de 25 a 35% da composição. É um polímero amorfo, complexo, derivado de três alcoóis hidroxinamílico (monolignóis): hidroxicinamílico *p*-caumárico, coniferílico e sinapílico, denominados de subunidades Hidroxifenil (H), Guaiacil (G) e Sinapil (S), respectivamente, e diferem apenas no seu grau de metoxilação. A biossíntese da lignina inicia-se pelo metabolismo do ácido chiquímico, seguido da via do aminoácido aromático L-fenilalanina. A fenilalanina amonialiase

(PAL) é a enzima que regula o metabolismo fenólico nas células vegetais, transformando o aminoácido L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico, o qual é hidroxilado para ácido p-cumárico que produz os três principais componentes da lignina: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (BRAGATTO, 2007).

O último passo da biossíntese dos monolignóis é a desidrogenação do p-cumaraldeído, sinapaldeído e coniferaldeído a seus respectivos alcoóis, sendo uma reação catalisada pela enzima Cinamil Álcool Desidrogenase (CAD), codificada pelo gene CAD na rota dos fenilpropanóides (Figura 4) (BUCHANAN et al., 2000).

O primeiro passo da rota dos fenilpropanóides é catalisado pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), codificada pela família gênica PAL, imprescindível na interface entre o metabolismo primário e secundário vegetal (BUCHANAN et al., 2000). O número de genes que codificam para a PAL pode variar de 1 a 5 na maioria das plantas estudadas (VASCONCELOS, 2012). Por exemplo, em *Phaseolus vulgaris*, o gene PAL1 estava expresso em raízes, folhas e brotos, PAL2, em raízes, folhas e pétalas, e PAL3 apenas expresso em raízes; a expressão dos genes PAL aumentava à medida que ocorriam lesões na planta, no entanto, PAL1 e PAL3 eram induzidos por infecção fúngica (LIANG et al., 1989). Em *Populus*, uma isoforma de PAL está envolvida com a formação de taninos condensados, enquanto que outra está associada à produção de lignina (KAO et al., 2002).

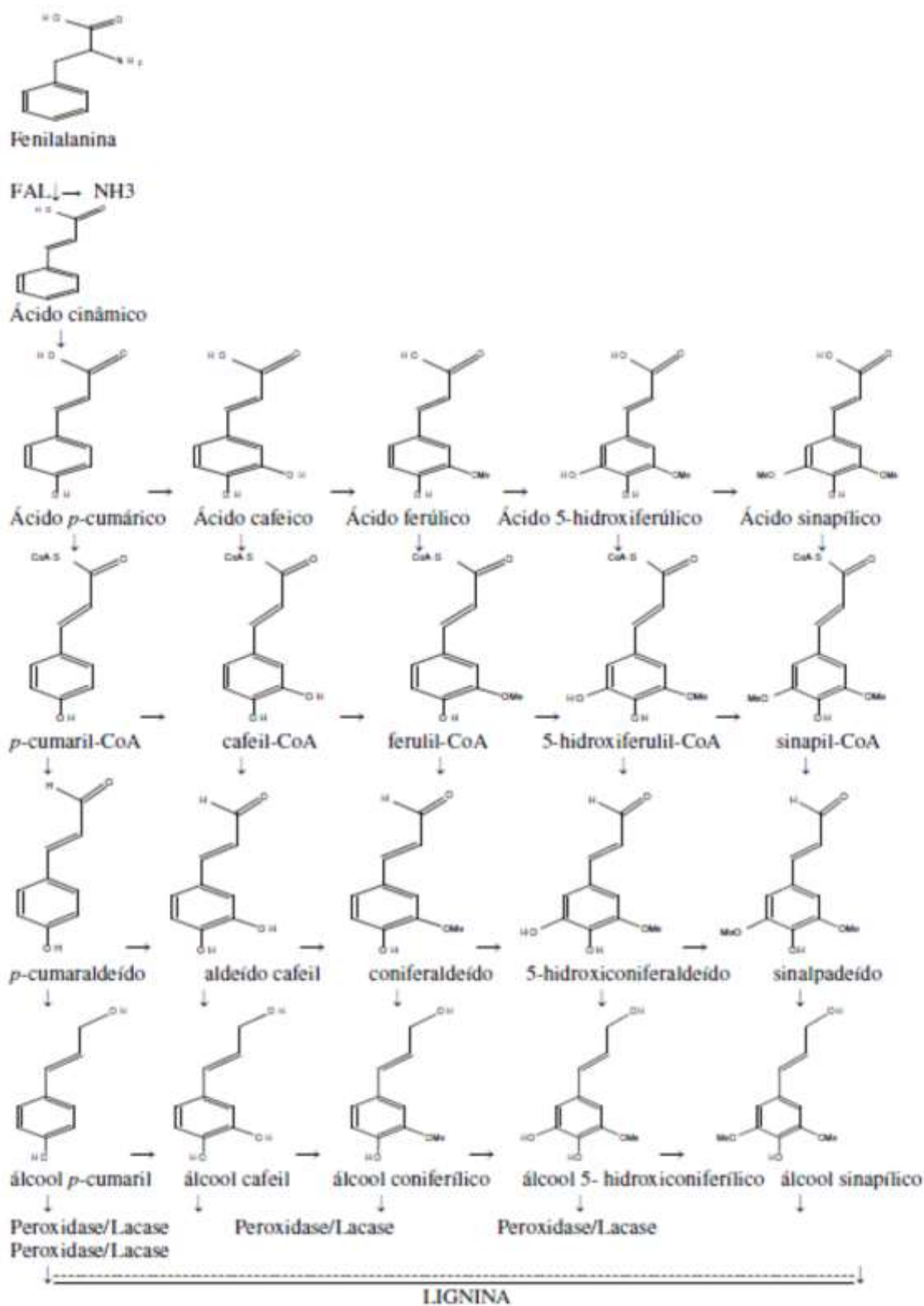


Figura 4. Caminho proposto para a biossíntese dos precursores da lignina (BOERJAN et al., 2003)

2.3 Técnicas de Identificação da Madeira

A madeira é um recurso natural renovável que apresenta vantagens ao ser comparada com outros materiais utilizados na indústria (BENITES et al., 2015). Inicialmente, cada autor interpretava a sua maneira cada caractere anatômico. Para solucionar esse problema e padronizar a linguagem entre os anatomistas, em 1931 foi criada a Associação Internacional de Anatomistas da Madeira “*International Association of Wood Anatomists – IAWA*” (ARAUJO; MATTOS FILHO, 1980).

Conhecer a estrutura anatômica da madeira é de fundamental importância para a sua qualificação visando a grande variedade de usos, evitando-se emprego inadequado e desperdício. O conhecimento das possíveis aplicações tecnológicas das espécies nativas pode servir de estímulo para sua conservação (BENITES et al., 2015).

Os métodos de identificação da madeira baseiam-se em análise das propriedades organolépticas, tais como, cor, cheiro, gosto, grã, textura, brilho, desenho, massa específica e dureza (COSTA, 2004) e das características macroscópicas e microscópicas desse material, sendo esta última restrita a pessoas com habilidade em microscópicos e com experiência considerável em anatomia da madeira (RUFFINATTO et al., 2015).

Na macroscopia são analisados os três planos de corte presentes na madeira: transversal (perpendicular ao eixo da árvore), radial (paralelo aos raios) e tangencial (perpendicular aos raios), sendo estas características observadas a olho nú ou com lupas (BURGER; RICHTER, 1991). O plano transversal é o que apresenta maior detalhe sobre o tipo e distribuição de vasos e parênquima, incluindo as características dos anéis de crescimento. Dessa forma, a observação macroscópica é o primeiro passo para a identificação da madeira (KOCH et al., 2015).

Dentre os elementos estruturais da madeira a serem observados para a sua caracterização macroscópica, o tecido parenquimático é de suma importância. O parênquima é um tecido que armazena água e substâncias de reserva e pode ser classificado em dois tipos: axial e radial. O axial ainda subdivide-se em paratraqueal, associado aos vasos, e apotraqueal, quando não está associado aos vasos, ambos observados no plano transversal (Figura 5). Enquanto o parênquima radial consiste de faixas horizontais dispostas radialmente no tronco e exibem riquezas de detalhes quando observados nos planos de corte longitudinais radiais e tangenciais (CARLQUIST, 2001).

No que tange à análise microscópica da madeira, são observadas as características dos vasos, parênquimas e fibras de forma individual, além de oferecer informações sobre inclusões de substâncias nesses tecidos consideradas também como impressões digitais (*fingerprint*) da madeira (WHEELER, 2011).

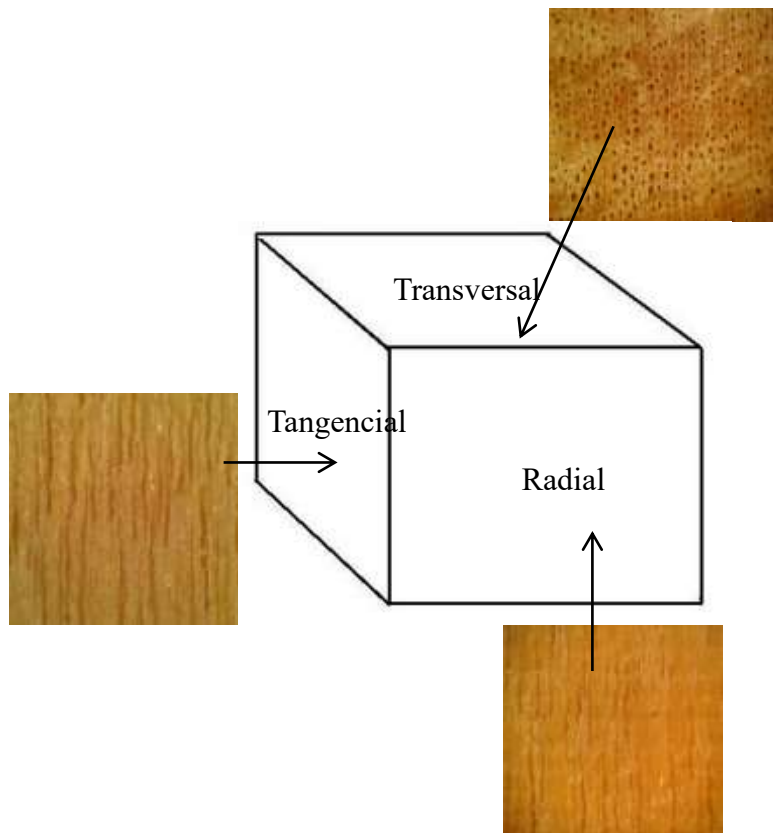


Figura 5. Ilustração dos planos de corte da madeira (Fonte: o autor)

Uma outra forma, recentemente citada, para classificar a madeira é a espectroscopia no infravermelho próximo (Near Infrared Spectroscopy – NIR). A técnica NIR é a medição da intensidade da absorção e emissão na faixa entre 380-780 nm e 2500 – 25000nm, logo, compostos orgânicos que consistem de vários grupos funcionais apresentam vibrações moleculares observadas no infravermelho. A espectroscopia NIR é um método rápido e preciso de análises que não precisa de reagentes químicos e a preparação da amostra é simples (TSUCHIKAWA; KOBORI, 2015).

De acordo com Espinoza et al. (2012) a espectroscopia NIR pode ser utilizada como uma ferramenta efetiva para distinguir espécies de pinus, além de permitir diferenciar os híbridos dessa espécie.

Ainda que a espectroscopia NIR seja uma técnica não destrutiva, sem necessidade de tratamento da amostra, rápida para a obtenção dos resultados, uma das maiores dificuldades está relacionada à observação da informação obtida em função da grande quantidade de dados. Há que se considerar que o espectro obtido sofre uma variação em consequência do plano de corte da madeira em relação ao feixe incidente de radiação infravermelha, distorção esta causada pela característica anisotrópica da madeira, além das falhas na leitura (OLIVEIRA et al., 2015).

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) também pode ser citada como uma ferramenta de identificação de madeiras, uma vez que essa técnica é capaz de fornecer o perfil carbônico molecular de uma espécie, o qual dificilmente se repete integralmente em

outras madeiras, permitindo identificar estruturas moleculares de várias substâncias presentes na madeira (SOUZA et al., 2008).

2.4 DNA *Barcode* – O Código de Barras da Vida

O Brasil é considerado um país biodiverso e isso inclui as inúmeras espécies vegetais produtoras de madeira. A identificação taxonômica desse material requer profissionais qualificados e demanda tempo. Além disso, a técnica de classificação de espécies apresenta limitações significativas. Primeiro, tanto a plasticidade fenotípica quanto a variabilidade genética dos caracteres utilizados para o reconhecimento de espécies podem acarretar em identificações duvidosas. Segundo, as chaves morfológicas muito utilizadas na identificação taxonômica são eficientes apenas para uma fase da vida da espécie em questão e apesar de existirem modelos de chaves mais modernos, o uso destas, muitas vezes, requer um nível tão elevado de conhecimento acerca do assunto, que são comuns erros de diagnóstico (HEBERT et al., 2003).

Essas limitações inerentes à taxonomia levam a uma nova abordagem para a identificação de espécies através de um sistema de análise de um pequeno segmento do genoma. De uma forma geral, um pequeno segmento do DNA da espécie de interesse é visto no formato de código de barras, conhecido como “DNA *Barcode*” (HEBERT et al., 2003). Contudo, para que o *Barcode* seja satisfatório, a região do gene selecionado deve atender três critérios: (i) conter suficiente variabilidade entre as espécies; (ii) ser curto o suficiente para ser sequenciado em uma única reação; e (iii) conter regiões conservadas para o desenvolvimento de *primers* universais (RIBEIRO et al., 2013).

A ideia é semelhante ao código de barras universal de produtos utilizados no comércio, sendo que um código de barras genômico apresenta apenas um dos quatro nucleotídeos (adenina, citosina, guanina e timina) em cada posição. Como exemplo, ao combinar apenas 15 dessas posições de nucleotídeos seria possível criar um bilhão de códigos únicos, número muito maior que o de espécies conhecidas que é de cerca de 15 milhões. A utilização desta técnica permite que cada táxon seja identificado por apresentar uma sequência única de DNA *Barcode* (HEBERT et al., 2003).

A técnica do DNA *Barcode* (Figura 6) está aliada à bioinformática, um dos ramos da Biotecnologia com atuação no desenvolvimento e aplicação de ferramentas da tecnologia da informação para permitir a organização, gestão, análise e interpretação de dados em suporte ao tratamento de questões biológicas relevantes (NODA, 2010).

Um fator, às vezes, ignorado é que o objetivo principal do DNA *Barcode* não é construir árvores filogenéticas, mas sim fornecer identificações rápidas e precisas de organismos não identificados, cujos códigos de barras de DNA já foram registrados em uma biblioteca. Ideologicamente, um código de barras deve permitir a identificação da espécie inequívoca por ter variação de sequência suficiente entre espécies e baixa variação intraespecífica (KRESS; ERICKSON, 2007).

O DNA *Barcode* tem sido produzido através de uma região genômica padrão conhecida como gene mitocondrial COX1 (codifica para uma subunidade de citocromo oxidase) para animais, fungos e alguns grupos de algas. Porém, para plantas, o gene mitocondrial vegetal é invariável, sendo inadequado para utilizá-lo na forma de código de barras (CHASE et al, 2005).

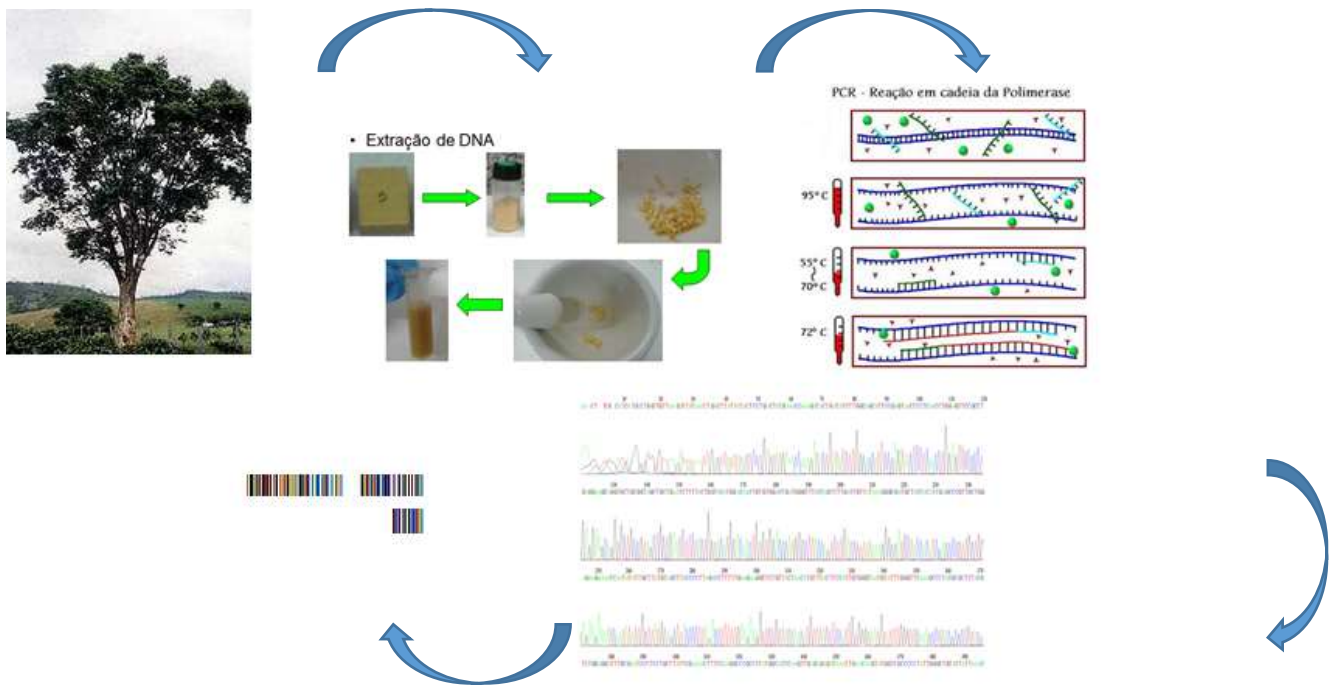


Figura 6. Representação esquemática da técnica do DNA Barcode

2.5 Extração de DNA de madeira

O DNA (ácido desoxirribonucleico) é a estrutura que armazena a informação genética que coordena todas as funções a serem desempenhadas pelos organismos, logo a sua extração tem como propósito a obtenção de material gênico de qualidade para futuras investigações. As finalidades podem ser as mais variáveis como a amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia de Polimerase), sequenciamento e conhecimento de genes envolvidos em diversas funções, sendo possível estudá-los mesmo quando o DNA é extraído em pequenas quantidades (ALBERTS et al., 2002).

Existem diversos protocolos de extração, mas a maioria deles apresenta como etapas iniciais a lise das células vegetais por meio do tratamento com detergente e posterior separação e precipitação do DNA. Existe uma variedade de reagentes utilizados nessa etapa de extração, na tabela abaixo (Tabela 1) foram descritas as principais funções dos reagentes comumente utilizados na extração de DNA de material vegetal (ROMANO; BRASILEIRO, 1998).

Tabela 1. Principais compostos na extração de DNA e suas respectivas funções (ROMANO; BRASILEIRO, 1998; OLIVEIRA et al., 2007)

Material utilizado	Função
Nitrogênio líquido e quebra mecânica	Romper parede celular
Detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) ou SDS (dodecil sulfato de sódio)	Romper membrana celular
EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético = agente quelante) e soluções com pH= 8	Evitar ação de DNAses que degradam o DNA e o pH 8 ou acima permite que o DNA fique na fase aquosa. Em faixas de pH abaixo de 8 o DNA desloca para a interface entre fase aquosa e fase orgânica. O pH abaixo de 7 promove a desnaturação do DNA e este migra para a fase orgânica
Tris-HCl	Solução tampão para manter pH constante
Fenol e clorofórmio	Separar DNA de proteínas
Agentes antioxidantes (PVP – polivinilpirrolidona ou β-mercaptoetanol)	Proteger o DNA de compostos fenólicos que o oxidam
CTAB ou CsCl (cloreto de céσιο)	Separar DNA de polissacarídeos que interferem na migração do DNA em corridas de eletroforese
Álcool isoamílico	Adicionado junto com o clorofórmio para evitar formação de espuma, permitindo a melhor separação da fase aquosa e da fase orgânica
RNAse	Remoção de RNA
Etanol absoluto	Concentra o DNA e ajuda na remoção de resíduos de fenol e clorofórmio na amostra
Etanol 70%	Remover resíduos de sais
Cloreto de sódio, acetato de sódio e acetato de amônio	Ajudam na precipitação de DNA
Isopropanol	Precipita o DNA, pois o DNA é insolúvel em álcool e se torna menos denso do que a solução aquosa obtida

A tabela 1 mostra os principais reagentes para extração de DNA de plantas, mas no que diz respeito ao isolamento de DNA de madeiras, alguns ajustes são necessários no protocolo de extração visto que a madeira apresenta composição química bem diferente da composição de folhas, as quais são comumente utilizadas em experimentos de análises moleculares com vegetal. A extração de madeira seca se torna mais problemática porque com a morte do organismo surgem de forma marcante os processos hidrolíticos e oxidativos que causam fragmentação e modificação do DNA. O aumento da degradação já pode ser observado com a idade da espécie, mas, apesar disso, pequenos fragmentos de DNA ainda apresentam informação que podem confirmar a identificação da madeira e permitir entender o seu processo de formação (JIAO et al., 2015).

Ainda que a extração de DNA do alburno seja citada na literatura como melhor que a do cerne, esta última se faz necessária porque a maior parte da madeira comercializada é compreendida de cerne (LIRA et al., 2009). A tabela 2 evidencia alguns trabalhos que realizaram a extração de DNA de madeira por diferentes métodos.

A madeira é um material rico em polissacarídeos, proteínas, lignina, taninos, pigmentos e todos esses compostos podem tornar o DNA viscoso, dificultando a sua corrida no gel de eletroforese. Essa dificuldade aumenta quando se trata de madeiras de espécies tropicais, as quais apresentam metabólitos secundários em abundância. Além disso, a contaminação por polissacarídeos e compostos fenólicos pode inibir a ação da DNA polimerase (Taqpolimerase), enzima específica que atua no processo de amplificação *in vitro*; e reduzir o grau de pureza do DNA extraído. Sendo assim, a média de concentração de DNA extraído da madeira está em torno de 50 ng/μL. Logo, se faz necessário um aumento na quantidade de madeira a ser extraída na tentativa de aumentar a quantidade de DNA. No entanto, muitas das vezes não é possível visualizar o DNA na corrida em gel de agarose devido ao nível de degradação do DNA, fato este possivelmente corrigido na etapa de amplificação por PCR (reação em cadeia de polimerase “*Polymerase Chain Reaction*” - PCR) (COLEY; BARONE, 1996; SWETHA et al., 2014).

De acordo com Rachmayanti (2009), as principais barreiras da extração de DNA podem estar relacionadas a problemas físicos, químicos, biológicos e fisiológicos. Os físicos constituem os tratamentos mecânicos aplicados para romper o tecido duro da madeira, como o superaquecimento que pode causar a degradação irreversível do DNA. Os químicos estão relacionados aos agentes e substâncias da madeira, que podem inibir a extração de DNA ou resultar em um DNA de baixa qualidade, não sendo adequado para a amplificação por PCR. Os biológicos são referentes à decomposição da madeira por fungos e microrganismos, devido a longos períodos de armazenamento, podendo resultar na degradação do DNA. E os fisiológicos estão relacionados à idade da árvore, pois a degradação do DNA irá ocorrer após a morte de uma célula vegetal.

Tabela 2. Relação entre os protocolos utilizados e a concentração de DNA extraído de madeira

Espécie	Material	Método	DNA	Con. DNA	Tris HCl	EDTA	NaCl	CTAB	PVP	β mercaptoetanol	Proteinase K	SDS	Autor
<i>Populus euphratica</i>	Madeira seca (30 anos)	Kit Dneasy Plant Mini Qiagen	Boa quantidade de DNA	15,09 ng/mg	-	-	-	-	-	-	-	-	Jiao et. al., 2015
<i>Cunninghamia lanceolata</i>	Alburno (madeira fresca)	Kit Dneasy Plant Mini Qiagen	Boa quantidade e qualidade de DNA	107,02 ng/mg	-	-	-	-	-	-	-	-	Zhang et al., 2015
<i>Cunninghamia lanceolata</i>	Cerne (madeira fresca)	Kit Dneasy Plant Mini Qiagen	Quantidade e qualidade de DNA inferior à obtida do alburno	13,83 ng/mg	-	-	-	-	-	-	-	-	Zhang et al., 2015
<i>Cinnamomum spp.</i>	Casca	CTAB	Boa qualidade e quantidade	5 – 8.1 µg/g	100m M	20mM	3mM	5%	1%	0.3%	-	-	Swetha et. al., 2014
<i>Aquilaria sinensis</i> (Lour.) Gilg	Madeira (alburno) fresca	Kit Dneasy Plant Mini Qiagen	Boa quantidade de DNA	8.01 ng/mg	-	-	-	-	-	-	-	-	Jiao et. al., 2013
<i>Pinus roxburghii</i>	Alburno	CTAB	Qualidade de DNA adequada para análises RAPD, ISSR e SSR*	19,66 ug/100 mg tecido	100m M	20mM	1,4mM	3%	1%	0,2%	-	-	Rawat et al., 2013
<i>Dalbergia odorifera</i>	Alburno	PTB (Brometo de N-fenacila tiazólio) após purificação	Boa quantidade e qualidade de DNA	62,94 ng/uL	-	-	-	-	-	-	-	-	Yu et al., 2013

Espécie	Material	Método	DNA	Con. DNA	Tris HCl	EDTA	NaCl	CTAB	PVP	β mercaptoetanol	Proteinase K	SDS	Autor
<i>Dalbergia odorifera</i>	Cerne	PTB (Brometo de N-fenacila tiazólio) após purificação	Boa qualidade	18,80 ng/uL	-	-	-	-	-	-	-	-	Yu et al., 2013
<i>Populus tremula</i>	Madeira seca	SDS	Boa qualidade e quantidade	219 ng/uL	200mM	25mM	250mM	-	-	-	-	0,5%	Verbylaitė et al., 2010
Espécies Amazônicas – região da Floresta Tropical da Guiana Francesa	Câmbio	<i>BioSprint 15</i> DNA Plant Kit Qiagen	Boa qualidade e quantidade	Não citado	-	-	-	CTAB 1%PVP	-	-	-	-	Gonzalez et al., 2009
<i>Bowdichia virgilioides</i>	Casca seca	CTAB / SDS	Qualidade satisfatória e elevada quantidade de DNA	1802,9 ng/uL	100mM	20mM	1.4mM	2%	2%	2%	35uL	35 uL	Novaes et. al., 2009
<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Casca seca	CTAB / SDS	Qualidade satisfatória e elevada quantidade de DNA	1209,1 ng/uL	100mM	20mM	1.4mM	2%	2%	2%	35uL	35 uL	Novaes et. al., 2009
<i>Dalbergia nigra</i>	Casca seca	CTAB / SDS	Qualidade satisfatória e elevada quantidade de DNA	707,8 ng/uL	100mM	20mM	1.4mM	2%	2%	2%	35uL	35 uL	Novaes et. al., 2009

Espécie	Material	Método	DNA	Con. DNA	Tris HCl	EDTA	NaCl	CTAB	PVP	β mercaptoetanol	Proteinase K	SDS	Autor
<i>Melanoxylon brauna</i>	Casca seca	CTAB / SDS	Qualidade satisfatória e elevada quantidade de DNA	742,0 ng/uL	100m M	20mM	1.4mM	2%	2%	2%	35uL	35 uL	Novaes et. al., 2009
<i>Senna multijuga</i>	Casca seca	CTAB / SDS	Qualidade satisfatória e elevada quantidade de DNA	1037,3 ng/uL	100m M	20mM	1.4mM	2%	2%	2%	35uL	35 uL	Novaes et. al., 2009
<i>Manilkara huberi</i>	Câmbio vascular	CTAB (Doyle; Doyle, 1987)	Quantidade e qualidade satisfatórias para amplificação	Não citado	-	-	-	-	-	-	-	-	Azevedo et al., 2008
<i>Gonystylus bancanus</i>	Madeira processada	CTAB	Baixa qualidade e baixa quantidade	< 15 ng/μL	100m M	20mM	1.4mM	3%	1%	0.2%	-	-	Asif ; Cannon, 2005
<i>Pinus nigra</i>	Casca	CTAB	Boa qualidade e quantidade	10 - 35 ug/g	100m M	20mM	1.5mM	2%	2%	2%	-	-	Cheng et. al., 1997
<i>Platanus occidentale</i>	Casca	CTAB	Boa qualidade e quantidade	10 - 35 ug/g	100m M	20mM	1.5mM	2%	2%	2%	-	-	Cheng et. al., 1997

* Marcadores moleculares
 RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA
 ISSR – Inter Simple Sequence Repeat
 SSR – Simple Sequence Repeat

Um dos ajustes de protocolo de extração de DNA de madeira comumente citado é a inclusão de PVP (polivinilpirrolidona), para evitar processo oxidativo por polifenóis da madeira, que pode ter uma variação em sua concentração dependendo da espécie, ao tampão de extração e o aumento no tempo de incubação para permitir a completa dissolução do DNA no tampão. Como exemplo, pode ser citada extração de DNA de madeiras de espécies tropicais da Índia com 2% de PVP no tampão CTAB e incubação a 55°C por 10 h (NITHANIYAL et al., 2014).

Outra opção é a utilização de kits de extração de DNA para maior purificação da amostra, a qual tem por finalidade permitir melhores resultados no processo de amplificação e a sua principal atuação é a desnaturação de proteínas. Para isolar DNA de madeira de *Dipterocarpaceae*, o uso do kit DNeasy Plant Mini Kit e do Mag Attract 96 DNA Plant Core Kit mostraram-se eficientes, permitindo obter cerca de 2,2 µg a partir de 50-100 mg de madeira seca (RACHMAYANTI et al., 2006).

2.6 Amplificação de DNA

A amplificação é a técnica realizada através de reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), a qual permite amplificar *in vitro* regiões específicas do genoma de qualquer organismo. A PCR permite amplificar sequências de DNA presentes em misturas complexas, possibilitando vários estudos genômicos, como o desenvolvimento de métodos de diagnósticos altamente sensíveis e específicos, obtenção de grandes quantidades de DNA para sequenciamento e análises sobre a diversidade genética de populações, entre outros. Contudo, mesmo com a eficiência da PCR, existe a necessidade de ajustar protocolos desde a etapa de obtenção do ácido nucleico até a reação de amplificação. Em síntese, para realizar a reação de PCR é preciso (OLIVEIRA et al., 2007):

- Um DNA molde;
- Um par de iniciadores (*primers*) complementares as cadeias opostas flanqueando a sequência de DNA a qual se quer amplificar;
- A enzima DNA polimerase, resistente à alta temperatura, que duplica a sequência em questão;
- Os desoxiribonucleotídeos precursores, e
- Mg^{+2} , cofator enzimático.

O par de iniciadores, através do seu pareamento específico com determinada região do DNA, permite a determinação do local específico de amplificação do fragmento desejado. Enquanto a enzima DNA polimerase é responsável por adicionar os nucleotídeos, permitindo a replicação do fragmento de DNA. Como ocorrem vários ciclos de replicação, ao final tem-se um aumento exponencial do fragmento desejado, sendo possível gerar bilhões de cópias da sequência inicial. Ao aumentar a temperatura para a desnaturação da molécula, sintetizada no ciclo anterior, esta funciona como molde de replicação. As enzimas envolvidas no processo de amplificação são isoladas de bactérias ou arqueas que vivem em locais de temperaturas extremas, como, por exemplo, a *Taq*polimerase, proveniente da bactéria *Thermus aquaticus*. Devido a essa característica, essas enzimas são capazes de suportar elevadas temperaturas requeridas no processo de amplificação do DNA sem desnaturar (MIR et al., 2004).

Asif e Cannon (2005) conseguiram amostras purificadas de DNA de madeira processada de *Gonostylus bancanus* utilizando o kit Pure PCR Template Preparation (Roche). Tani et al., (2003) obtiveram produtos de PCR a partir de DNA de madeira antiga de *Cryptomeria japonica* a partir de diluição de DNA em água em uma proporção de 1:20. Já para o material arqueológico de madeira de *Populus euphratica*, foram utilizados o kit High Pure PCR Template Preparation (Roche, Mannheim, Germany) e uma série de diluições de 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 e 1:40. No entanto, os produtos da PCR não foram amplificados com sucesso e existem duas razões para esta observação: (i) os níveis de inibição após a purificação ainda continuaram elevados e (ii) nenhum fragmento de DNA permaneceu presente nos tecidos (JIAO et al., 2015), tais constatações indicam que o protocolo de extração para esta espécie, na condição em que foi trabalhada, seja melhorado para minimizar a contaminação externa (YANG et al., 1997).

Diversos artigos têm abordado a importância da extração e amplificação do DNA de madeira para monitorar e controlar o comércio de madeira no contexto da fiscalização florestal (DEGUILLIUX et al., 2002). No entanto, existem duas barreiras quanto à amplificação e isolamento do DNA de madeira: (i) a presença de substâncias na madeira, tais como, compostos fenólicos, que podem inibir a amplificação por PCR (LEE; COOPER, 1995); (ii) a baixa quantidade e qualidade de DNA, por tratar-se da tentativa de amplificar o DNA de tecidos mortos (KWOK; HIGUCHI, 1989). Para solucionar essas barreiras, o DNA tem sido isolado de várias partes dos troncos, considerando o genoma nuclear, mitocondrial e plastidial. Alguns iniciadores têm sido citados na literatura, de acordo com a tabela 3.

Tabela 3. Sequências Forward (F) e Reverse (R) de Indicadores para as isoformas de genes utilizados na amplificação de DNA de madeira

<i>Genes</i>	Sequência (5' - 3')	Aplicação	Madeira utilizada
<i>rbcL-1</i>	F- ATCGTTTCTTATTTTG TG R- CTTTGTATCATTTCTTCG	Verificar a viabilidade de extração de DNA de madeira arqueológica e identificá-la por DNA Barcode	<i>Populus euphratica</i> (JIAO et al., 2015)
<i>rbcL-2</i>	F - GTTGCTGGAGAAGAAAAT R- CTTGGATACCATGAGGTG		
<i>ITS</i>	F-AACGACTCTCGGCAACGG R- GAGGGTCTCTCAACCACC		
<i>rbcL-3</i>	F – CGTTTCTTATTTTG TGCC R- TTCCCCTTCAAGTTTACC		
<i>rbcL-4</i>	F- GGATTCACCGCAAACACT R - ATTACCCTCACGAGCAAG		
<i>rbcL-5</i>	F -GGGTTATCCGCTAAGAAT R - CACGAGCAAGATCACGTC		
<i>rbcLa</i>	F- ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC- R- GTAAAATCAAGTCCACCCRCG	Diferenciar as espécies de canela por técnicas moleculares	<i>Cinnamomum spp</i> (SWETHA et al., 2014)
matK-1RKIM	F - ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	Monitoramento de	Espécies TDEF* -

matK -3FKIM	R- CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	biodiversidade e da exploração ilegal	Índia (NITHANIYAL et al., 2014)
<i>rbcLa</i>	F - ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC		
<i>rbcLajf634</i>	R- GAAACGGTCTCTCCAACGCAT		
matK1RKim	F- ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	Identificação de espécies	African Rainforest Trees (PARMENTIER et al., 2013)
matK3FKim	R- CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG		
matK390	F -CGATCTATTCATTCAATATTTTC		
matK1326r	TCT AGC ACA CGA AAG TCG AAG T		
<i>CY1</i>	F- TACCGATTGAATGATCCGGTGAAG	Fonte alternativa para obter DNA (para os casos em que não é possível obter a folha)	Árvores de Leguminosas da Floresta Atlântica e Cerrado da América do Sul (NOVAES et al., 2009)
<i>CY3</i>	R- CGCCGTTACTAGGGGAATCCTTGT		
<i>psbA3</i>	F- GTTATGCATGAACGTAATGCTC		
<i>trnHf 05</i>	R - CGCGCATGGTGGATTACAAATCC		
<i>rpoC1</i>	F- GTGGATACACTTCTTGATAATGG R - TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC	Estudos de biodiversidade	Espécies das famílias Lauraceae, Myrtaceae, Elaeocarpaceae, Sapotaceae da região amazônica (GONZALEZ et al., 2009)
<i>rbcLa</i>	F- ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC- R- GAAAAATCAAGTCCACCCRCG		
<i>rpoB</i>	F - AAGTGCATTGTTGGAAGCTGG R - GATCCCAGCATCACAATTCC		
<i>trnL</i>	F- CGAAATCGGTAGACGCTACG R - ATTTGAACTGGTGACACGAG		

TDEF – Tropical Dry Evergreen Forest
rbcL, *matK*, *psbA* – *trnH*, *trnL* – genes de cloroplasto
ITS – gene de região intergênica do DNA ribossomal
CY1 = ITS F
CY3 = ITS R
rpoB - Gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase
rpoC1 - Gene que codifica a subunidade β' da RNA polimerase

2.7 Genes *Barcodes* para Plantas: *rbcL* e *matK*

Para a maioria das espécies animais, o gene que codifica a citocromo oxidase I (CO1) do DNA mitocondrial tem sido muito utilizado e com resultados satisfatórios (HEBERT et al.,

2003), porém, para plantas a baixa taxa de substituição nucleotídica no genoma mitocondrial dificulta seu uso para o DNA *Barcode* (CBOL – *Plant Working Group*, 2009).

Dessa forma, o CBOL – *Plant Working Group* (2009) sugeriu como alternativa para o *Barcode* de plantas, com base em avaliações de recuperação, qualidade da sequência e os níveis de discriminação de espécies, marcadores que compreendem regiões codificantes presentes no genoma do cloroplasto.

O cloroplasto é uma organela citoplasmática constituída por apenas um cromossomo circular facilmente isolado (PALMER, 1987). O genoma do cloroplasto contém todos os genes que codificam para os RNA ribossomais (rRNA) e RNA transportadores (tRNA) para a síntese de proteínas fundamentais para o seu funcionamento (SHINOZAKI et al., 1986).

O DNA de cloroplasto (cpDNA) apresenta herança unipariental e na maioria das angiospermas é transmitido apenas pelo gameta feminino (DEMESURE et al., 1995). Além disso, é altamente conservado em termos de tamanho, conteúdo, estrutura e ordem dos genes (JUDD et al., 2002), permitindo, dessa forma, que iniciadores específicos desse genoma sejam utilizados em quase todo o reino vegetal, facilitando a comparação entre os diferentes táxons (PINTO, 2015).

Dentre os marcadores cpDNA, o gene *matK* codifica a proteína maturase K e o gene *rbcL* codifica a subunidade maior da ribulose-1,5- bifosfato carboxilase/oxigenase. No entanto, a universalidade dos marcadores de código de barras é dificultada devido à variação morfológica / geográfica em espécies de plantas, sendo necessários testes com diferentes marcadores à medida que se trabalha com plantas de espécies e hábitos diversificados (ROY et al., 2010).

O gene *rbcL* por ser codificante de uma proteína altamente conservada e por apresentar taxa de evolução lenta é o gene mais comum utilizado para fornecer dados filogenéticos, apresentando considerável resolução em níveis taxonômicos mais elevados, como família (PINTO, 2015), além de ter sido o primeiro gene das plantas a ser sequenciado (ZURAWSKI et al., 1981). As vantagens do gene *rbcL* são que ele pode ser facilmente amplificado e sequenciado na maioria das plantas terrestres e é considerado como um *locus* de referência em investigações filogenéticas, fornecendo um posicionamento confiável de um táxon numa família e / ou gênero da planta (KRESS; ERICKSON, 2007).

O gene *matK* possui cerca de 1570 pb e codifica para a proteína maturase, que está envolvida no splicing de íntrons tipo-II de RNA transcritos (NEUHAUS; LINK, 1987). A região codificante de *matK* está geralmente localizada dentro de um íntron classe II, entre os éxons 5' e 3' do gene que codifica o *trnK* (RNA transportador para lisina). A elevada taxa evolutiva característica do *matK* o tornou utilizável em reconstruções filogenéticas em altos níveis taxonômicos, como a ordem ou família, e às vezes em baixos níveis, como gênero ou espécie, tendo sido muito citado em pesquisas que envolvam DNA *Barcode* de plantas (YU et al., 2011). Para os estudos de *Barcode* o segmento utilizado de *matK* compreende aproximadamente 790 pb (STOECKLE et al., 2011).

No estudo de identificação forense de *Cannabis sativa*, utilizando o gene *rbcL* como *Barcode*, foi observado que esse gene pode ser usado como marcador biogeográfico, sugerindo que se trata de uma assinatura genética para análise forense devido a ocorrência de polimorfismos SNP (Single Nucleotide Polymorphism) encontrados nesse gene (RIBEIRO et al., 2013).

Para identificação de amostras de madeiras comercializadas de espécies da floresta tropical da Índia, o marcador *rbcL* foi amplificado com sucesso a partir de todas as amostras, enquanto o marcador *matK* foi amplificado apenas em 75,8% das amostras (NITHANIYAL et al., 2014).

No estudo de identificação de madeiras arqueológicas de *Populus euphratica*, foi utilizado o marcador *rbcL* que apresentou uma identidade de 98% com as sequências de *P. euphratica* no GenBank (JIAO et al., 2015).

Todavia, o número de vegetais identificados pela técnica de DNA *Barcode* não engloba muitas das plantas tropicais encontradas no Brasil, tendo sido estudadas poucas plantas como as do gênero *Compsonera* da família Myristicaceae (NEWMASER et al., 2008) e das orquidáceas (LAHAYE et al., 2008).

Devido ao ritmo acelerado de degradação no Brasil, a técnica do DNA *Barcode* pode ser uma ferramenta para a fiscalização florestal, pois mais da metade das espécies nativas podem enfrentar um risco de extinção devido à exploração ilegal de madeiras. O controle da exploração florestal ainda é significativamente frágil sendo uma concorrência desleal com a atividade sustentável (JUVENAL; MATOS, 2002).

2.8 Plataformas de Sequenciamento para Tecidos de Origem Vegetal

As plataformas de sequenciamento são tecnologias adotadas para promover o sequenciamento de DNA e são capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida. A utilização de novas plataformas de sequenciamento para espécies vegetais ainda é considerada limitada, levando em consideração que os genomas nucleares vegetais são imensos e altamente repetitivos, resultando na incompatibilidade do tamanho das leituras produzidas com a montagem dos genomas. Dessa forma, para plantas, as plataformas mais utilizadas são de segunda geração de sequenciamento. As plataformas da Applied Biosystems, denominada SOLiD System e o Heliscope True Single Molecule Sequencing (tSMS), da Helicos, possuem a capacidade de gerar informação muitas vezes maior que o sequenciamento de Sanger, com uma grande economia de tempo e custo por base para o sequenciamento (CARVALHO; SILVA, 2010).

Corroborando tal informação, pode ser aqui citada a plataforma Illumina, de segunda geração, recentemente utilizada no sequenciamento do genoma de *Eucalyptus grandis* (MYBURG et al., 2014).

No entanto, muitos trabalhos têm sido conduzidos a partir de sequenciadores automáticos (VARUZZA, 2013). Na tabela 4 estão listadas algumas espécies de vegetais e a plataforma de sequenciamento utilizada.

Tabela 4. Plataformas de sequenciamento para genomas de plantas

Espécie	Plataforma de sequenciamento
Genes envolvidos na formação de lenho de reação e compressão de <i>Populus tomentosa</i>	Solexa (CHEN et al., 2015)
Mapa genético de milho (<i>Zea mays</i>)	Illumina (LU et al., 2015)
Sequência genômica de algodão (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Illumina (LI et al., 2015)
Identificação de espécies (DNA <i>Barcode</i>) de <i>Senna sp</i> e <i>Casearia sp</i>	ABI 3500 (Applied Biosystems) (JANUARIO, 2014)
DNA <i>Barcode</i> de coníferas de Wales	ABI3730X (DE VERE et al., 2012)
DNA <i>Barcode</i> de <i>Gaultheria sp.</i>	PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) (REN et al., 2011)
Sequenciamento convencional de cevada (<i>Hordeum vulgare</i>)	454 (WICKER et al., 2006)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

As amostras de madeira utilizadas nesse experimento foram originadas do cerne e cedidas pelo Laboratório de Produtos Florestais (LPF do Serviço Florestal Brasileiro – Brasília) e pela serraria Nova Canaã (Rio Branco/ Acre), todas secas naturalmente.

A tabela 5 apresenta a lista das espécies estudadas, as quais encontram-se entre as principais produtoras de madeiras comercializadas no Estado do Rio de Janeiro, segundo à Associação de Comércio e Indústria das Madeiras do Estado do Rio de Janeiro (ACIMDERJ). As espécies listadas foram escolhidas em função da disponibilidade.

Tabela 5. Espécies de madeiras estudadas

Nome vulgar	Nome científico	Família	Origem
Amarelão	<i>Aspidosperma vargasii</i>	Apocynaceae	Nova Canaã
Araracanga	<i>Aspidosperma desmanthum</i>	Apocynaceae	LPF
Caju-açu	<i>Anacardium giganteum</i>	Anacardiaceae	LPF
Cedro	<i>Cedrela odorata</i>	Meliaceae	Nova Canaã
Cerejeira	<i>Amburana acreana</i>	Fabaceae	Nova Canaã
Cumaru	<i>Dypterix odorata</i>	Fabaceae	Nova Canaã
Peroba-mica	<i>Aspidosperma macrocarpon</i>	Apocynaceae	LPF
Piquiarana	<i>Caryocar glabrum</i>	Caryocaraceae	LPF
Roxinho	<i>Peltogyne confertiflora</i>	Fabaceae	Nova Canaã
Seru	<i>Allantoma lineata</i>	Lecythidaceae	LPF

As madeiras cedidas pela serraria Nova Canaã foram depositadas na Xiloteca do Laboratório de Anatomia da Madeira da UFRRJ com os respectivos códigos: Amarelão (7609), Cedro (7613), Cerejeira (7610), Cumaru (7612) e Roxinho (7611).

3.2 Caracterização Macroscopia e Microscopia da Madeira

Para a análise da estrutura macroscópica da madeira foi utilizada lupa com objetiva 10x de aumento da marca DiagTech. Já para descrição da ultraestrutura microscópica, as madeiras foram amolecidas em água a 100 °C por 30 min. e submetidas ao corte de 2 µm em micrótomo para posterior exame sob microscópio eletrônico de varredura (marca Hitachi, modelo Tabletop Microscope TM3000).

3.3 Teste de Protocolos de Extração de DNA de Madeiras Secas

As madeiras, já identificadas, foram separadas em lascas com auxílio de estilete e armazenadas a -80 °C. Com o intuito de evitar contaminação cruzada entre as amostras, cada corte de madeira e extração de DNA foram conduzidos separadamente por espécie e todo material utilizado foi autoclavado antes e depois de cada corte / extração. Foram testados cinco protocolos de extração de DNA a partir de madeira seca (cerne) (Tabela 6), com seis repetições, conforme descrito a seguir:

- Protocolo 1- adaptado de Doyle e Doyle (1990)

Tampão de extração: 2% p/v de CTAB, 2,5% de PVP, 2M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA (pH 8,0), 40 µL de β – Mercaptoetanol (2 µL/ µL de tampão).

Foram macerados 200 mg de madeira em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo, ambos em porcelana. À amostra macerada foram adicionados 2 mL do tampão de extração, previamente aquecido a 65^o C. A solução resultante foi transferida para microtubos de 2 mL e, em seguida, adicionados 40 µL de β – Mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas a 65 °C por 40 min., com agitações (± 800 rpm) a cada 10 min. Após o aquecimento, o material foi resfriado em gelo por 5 min. e centrifugado por 10 min. a 11.000 rpm. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo de 2 mL ao qual foram adicionados 600 µL de CIA “clorofórmio:álcool isoamílico” (24:1) e em seguida levemente homogeneizado por 30 segundos. As amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 10 min. e a fase aquosa transferida para um novo tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 4 µL de Rnase A (100 µg/mL). Posteriormente as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min. Finalizado esse tempo, 240 µL de álcool isopropílico gelado foram acrescentados às amostras. O material foi homogeneizado vagarosamente e incubado a -20 °C por 2 h. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 30 min. Em seguida o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado com 400 µL de etanol absoluto e foi realizada uma centrifugação a 11.000 rpm por 3 min. O etanol foi descartado e o precipitado foi seco por 5 min. a 30 °C em concentrador a vácuo (Concentrator Plus Eppendorf). O pellet foi ressuspendido em 20 µL de água MiliQ autoclavada e armazenado em freezer -80 °C.

- Protocolo 2 - DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

Foram macerados 100 mg de cada amostra de madeira, separadamente, em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo, ambos em porcelana. O DNA genômico foi extraído de

acordo com o Kit “DNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA foi armazenado em freezer -80 °C.

- Protocolo 3 – adaptado de Swetha et al., (2014)

Tampão de extração: 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 3M NaCl, 5% CTAB, 1% PVP, 3 µL de β – Mercaptoetanol (0,15% v/v).

Foram macerados 200 mg de madeira seca em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo, ambos em porcelana e em seguida adicionados 2 mL do tampão de extração previamente aquecido a 65 °C. A solução formada foi transferida para microtubos de 2 mL e foram adicionados 3 µL de β – Mercaptoetanol (0,15% v/v). As amostras foram aquecidas a 65 °C, por 2 h, com agitação constante de 200 rpm. Em seguida, as amostras foram submetidas a choque térmico (gelo a 5 °C) por 5 min. e um volume igual ao conteúdo do tubo foi adicionado de CIA “clorofórmio:álcool isoamílico” (24:1). A mistura foi homogeneizada lentamente e centrifugada a 1.118 rpm por 15 min. a 4 °C. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo de 2 mL. À fase aquosa, foram adicionados 1/3 de volume de acetato de sódio 3 M (pH 5.2) e 2/3 de volume de CIA (24:1). A mistura foi homogeneizada lentamente e centrifugada a 1.118 rpm por 15 min. a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionado um volume igual de isopropanol gelado. Os tubos foram incubados a -80 °C (overnight) e o DNA precipitado por centrifugação a 4.472 rpm por 20 min. a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 400 µL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 4.472 rpm por 10 min. a 4°C. O etanol foi descartado e o precipitado seco por 5 min. a 30 °C em concentrador a vácuo (Concentrator Plus Eppendorf). O precipitado foi ressuscitado em 20 µL de água ultra pura autoclavada e armazenado em freezer -80 °C.

- Protocolo 4 – adaptado de Doyle e Doyle (1990)

Tampão de extração: 2% p/v de CTAB, 2,5% p/v de PVP-40, 2M NaCl, 100mM Tris-HCl pH 8,0; 25mM EDTA pH 8,0, 2% (v/v) de β-mercaptoetanol.

Foram macerados 200 mg de madeira em gral e pistilo contendo nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para microtubo de 2 mL e acrescentado 1,4 mL do tampão de extração. As amostras foram homogeneizadas por inversão a cada 10 min. e incubadas em banho-maria por 40 min. a 65 °C. Após serem retiradas do banho-maria, as amostras foram resfriadas em gelo por 5 min. e logo após, centrifugadas por 10 min. a 11000 rpm. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo de 2 mL sobre o qual foram acrescentados 800 µL da mistura Clorofórmio: Álcool Isoamílico, 24:1 (v/v) com posterior homogeneização por inversão durante 10 min. As amostras foram centrifugadas por 10 min. a 11000 rpm e o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 600 µL de Álcool Isopropílico gelado, o material foi homogeneizado por inversão e incubado a -20 °C por 2 - 4 h. Ao final desse tempo, foi realizada uma centrifugação por 20 min. a 11000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado e posteriormente centrifugado por 5 min. a 11000 rpm. O precipitado foi seco a vácuo por 5 min. a 30 °C e o pellet foi ressuscitado em 50 µL de TE 1X contendo RNase na concentração final de 40 ug/mL e armazenado em freezer -80 °C.

- Protocolo 5 – adaptado de Novaes et al. (2009)

Tampão de extração: 2% CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, EDTA 20 mM, pH 8,0, 2% de PVP, 2-mercaptoetanol (2% = 20 μ L) e 35 μ L de proteinase K (1 mg / mL).

Amostras de 200 mg de madeira seca foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo até a formação de um pó fino, sobre o qual foi adicionado 1 mL do tampão de extração, sendo realizada uma homogeneização do material no tampão de extração. Logo após, foram adicionados 35 μ L SDS 20% (w/v) e a mistura foi transferida para tubos de 2 mL que foram incubados a 60 °C por 60 min. com agitação ocasional. Após este tempo, os tubos foram resfriados em temperatura ambiente, e foram adicionados 600 μ L de CIA (Clorofórmio: Álcool Isoamílico, 24:1) e o material foi homogeneizado por inversão suave durante 5 min. As amostras foram centrifugadas durante 15 min. a 18000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de 1,5 mL. A esses tubos foram adicionados 140 μ L de CTAB a 10% (p/v) e 280 μ L de NaCl 5 M para posterior inversão suave até a homogeneização. Foi realizada uma segunda adição de 140 μ L de CTAB a 10% (p/v) e 280 μ L de NaCl 5 M, para posterior adição de 1 volume de isopropanol gelado. O material foi incubado overnight a -20 °C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 18000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O pellet formado foi lavado 3 vezes com etanol 70% gelado e seco a 37 °C por 15 min. O pellet foi dissolvido em 30 μ L de tampão TE 1X [10 mM Tris-HCl, pH 8,0, EDTA 1 mM, pH 8,0] contendo 10 μ g/mL de RNase A por 2 h a 37 °C.

Tabela 6. Protocolos de extração de DNA e as respectivas concentrações de cada reagente utilizado

Reagentes	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5
CTAB	2%		5%	2%	2%
PVP	2,5%		1%	2,5%	2%
NaCl	2 M		3 M	2 M	1,4 M
Tris – HCl	100 mM		100 mM	100 mM	100 mM
EDTA	25 mM		20 mM	25 mM	20 mM
β - mercaptoetanol	2%		0,15%	2%	2%
Proteinase K	-		-	-	1mg/mL
SDS	-		-	-	20%

3.4 Avaliação da Quantidade e Qualidade do DNA Isolado

A quantidade do DNA foi determinada através da absorbância no comprimento de onda de 260 nm em espectrofotômetro (NanoDrop 2000c Thermo Scientific), enquanto a qualidade do DNA foi obtida pelas razões A260/A280 e A230/A260 (RACHMAYANTI et al., 2006). No geral, a razão da pureza do DNA é em torno de 1,8 a 2,0 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Para confirmar a qualidade do DNA extraído pelos diferentes protocolos, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% com Gel Red submetido à tensão de 100V por 30 min. Foram adicionados 5 μ L da amostra de DNA, 2 μ L do tampão de amostra (azul de bromofenol) e 2 μ L de Gel Red (Biotium).

Os valores de quantificação e de pureza, obtidos para cada protocolo, foram submetidos à análise de variância no programa Assistat versão 7.7 beta (2014) e foi realizado o teste Tukey para comparação de médias.

3.5 Amplificação de DNA de Madeiras Secas por PCR

Inicialmente, foi realizado um teste de amplificação com *primers* (Tabela 7) segundo a metodologia de Swetha et al. (2014) e Nithaniyal et al. (2014) para amplificação de DNA extraído de madeira de diferentes espécies.

Tabela 7. Sequências Forward (F) e Reverse (R) para a amplificação dos genes *matK* e *rbcL* por PCR para madeiras

Mix de primers	Primers	Sequência 5'-3'	Espécie / Fonte
Mix 1	<i>rbcLa</i> F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	<i>Cinnamomum spp</i> (SWETHA et al., 2014)
	<i>rbcLa</i> R	GTAAAATCAAGTCCACCCRCG	
Mix 2	<i>matK</i> -1RKIM F	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	Espécies TDEF* - Índia (NITHANIYAL et al., 2014)
	<i>MatK</i> - 3FKIM R	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	
Mix 3	<i>rbcLa</i> F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	
	<i>rbcLajf63</i> 4 R	GAAACGGTCTCTCCAACGCAT	

* TDEF – Tropical Dry Evergreen Forest

Foram realizados dois testes de amplificação, um sem aditivo e outro com aditivo “PCR enhancer” (Invitrogen) nas concentrações 1x, 2x e 3x, com intuito de maximizar a amplificação do DNA a partir de madeira seca, uma vez que o aditivo é frequente na amplificação de materiais com DNA degradado. Os volumes aplicados, as reações, assim como a concentração e quantidade dos reagentes na reação, estão apresentados nas tabelas 8 e 9. Controle negativo e positivo (amostra de DNA de folha de *Lophantera lactescens*) foram utilizados para todas as reações.

Tabela 8. Reagentes utilizados na reação de PCR, volume e concentração final de cada reagente - sem aditivo

Reagente	Volume (μL)	Concentração final
H ₂ O ultra pura	19,15	-
Tampão 10x	2,5	1x
Mg 50 mM	0,75	1,5 mM
Mix dNTPs 10 mM	0,5	0,2 mM
Primer forward	0,5	0,2 μM
Primer reverse	0,5	0,2 μM
Enzima Taq DNA polimerase Platinun	0,1	2U/ reação
Amostra	1	-

Tabela 9. Reagentes utilizados na reação de PCR, volume e concentração final de cada reagente - com aditivo "PCR enhancer (PCRxE)"

Reagente	1x (μL)	2x (μL)	3x (μL)	Concentração final
H ₂ O ultra pura	16,65	14,15	11,65	-
PCRxE	2,5	5,0	7,5	1x
Tampão 10x	2,5	2,5	2,5	1x
Mg 50 mM	0,75	0,75	0,75	1,5 mM
Mix dNTPs 10 mM	0,5	0,5	0,5	0,2 mM
Primer forward	0,5	0,5	0,5	0,2 μM
Primer reverse	0,5	0,5	0,5	0,2 μM
Taq DNA polimerase Platinun	0,1	0,1	0,1	2U/ reação
Amostra	1	1	1	-

Para ambos os testes, a amplificação iniciou a 94^o C por 2 min. e foram realizados 35 ciclos com as seguintes temperaturas: Desnaturação: 94^o C – 30”; Anelamento: 55^o C – 3”; Extensão: 72^o C – 1’20”, e finalização a 4^o C.

3.6 Eletroforese em Gel de Agarose

A efetividade das reações de PCR foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% submetidos à tensão de 100V por 30 min. Foram adicionados 5 μL de produto de PCR, 2 μL do tampão de amostra (azul de bromofenol) e 2 μL de Gel Red (Biotium).

Considerando que o Gel Red, ao ser utilizado na amostra pode influenciar na corrida do DNA, ocasionando atraso na migração, foi testada a coloração pós corrida na concentração de 0,5 μL de Gel Red (Biotium) em 999,5 μL de H₂O DEPC (dietilpirocarbonato – inibidor de RNAase).

Para aferir o comprimento dos fragmentos amplificados, para todas as corridas, utilizou-se o marcador de peso molecular 1kb (Avati) (Figura 7). Os géis foram visualizados e fotografados no sistema de fotodocumentação ChemiDoc MP System (BioRad).



Figura 7. Ilustração das bandas marcadas a partir do marcador de peso molecular 1 kb (Avati).
Fonte: Invitrogen

3.7 Purificação e Sequenciamento do DNA

Os produtos de PCR para cada madeira testada foram purificados com a enzima EXO-SAP (DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler – BIO-RAD) e sequenciados pela empresa Macrogen (Seoul, Coreia do Sul). A reação de sequenciamento de nucleotídeos foi realizada para ambas as cadeias, forward e reverse, tendo sido utilizados os mesmos *primers* da PCR. A reação de sequenciamento foi realizada com a enzima Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems). A corrida eletroforética das reações de sequenciamento foi realizada no sequenciador ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) e as reações foram conduzidas com DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD). Os fragmentos foram purificados com o Kit BigDye XTerminator® Purification (Applied Biosystems).

3.8 Análise do Sequenciamento e Filogenia

As sequências consenso foram obtidas e alinhadas manualmente utilizando o programa Clustal W / MUSCLE, e posterior alinhamento por meio do programa CLC Genomics. Uma vez obtidas as sequências para as amostras, a árvore filogenética foi obtida através do programa MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estrutura Macroscópica das Madeiras

Foram observadas as principais características das madeiras estudadas. A madeira de amarelão (Figura 8) possui cerne amarelo e sem odor característico, parênquima axial difuso indistinto sob lente (10x), poros difusos solitários e sem a presença de tilos.

A madeira de araracanga (Figura 9) apresenta cerne amarelado levemente rosado ou avermelhado e sem odor característico. Apresenta parênquima axial indistinto sob lente (10x), paratraqueal aliforme, madeira é porosa, com poros solitários e sem tilos.

A madeira de caju-açu (Figura 10) possui cerne em tom de branco amarelado claro a branco amarelado rosado e sem odor característico. Apresenta parênquima axial visível apenas sob lente e classificado como paratraqueal aliforme, com porosidade difusa, poros solitários e múltiplos, parcialmente obstruídos por óleo resina, além de raios visíveis apenas sob lente.

A madeira de cedro (Figura 11) possui cerne de cor castanho claro rosado a castanho avermelhado e odor característico. Apresenta parênquima em faixas marginais e os poros obstruídos por óleo-resina ou, às vezes, por substância de cor clara.

A madeira de cerejeira (Figura 12) possui cerne em tom de castanho com algumas faixas mais escuras e odor agradável. Apresenta parênquima axial do tipo paratraqueal aliforme e vasicêntrico, formando algumas confluências em pequenos trechos, com porosidade difusa, poros solitários e múltiplos, além de, às vezes, serem obstruídos por substância branca.

A madeira de cumaru (Figura 13) possui cerne castanho escuro e de aspecto fibroso. Apresenta parênquima paratraqueal aliforme confluyente, associando alguns vasos.

A madeira de peroba-mica (Figura 14) é porosa com cerne amarelado a bege e sem odor característico. Apresenta parênquima axial indistinto sob lente (10x), parênquima axial apotraqueal difuso, com poros solitários e sem presença de tilos.

A madeira de piquiarana (Figura 15) apresenta cerne bege a acastanhado, com parênquima axial visível apenas sob lente e o parênquima apotraqueal difuso e difuso em agregados formando uma trama com os raios, podendo apresentar finas faixas marginais. Os vasos são visíveis a olho nu, apresentam porosidade difusa, poros solitários e múltiplos; e podendo ser obstruídos por tilos.

A madeira de roxinho apresenta cerne roxo (Figura 16), sem odor e aspecto fibroso característicos, com parênquima axial paratraqueal aliforme confluyente e marginal em linhas finas. Os poros são visíveis a olho nu, solitários, vazios ou obstruídos por óleo-resina.

A madeira de seru (Figura 17) apresenta cerne bege amarelado, com odor perceptível, com parênquima axial pouco visível a olho nu, do tipo apotraqueal reticulado. A porosidade é difusa, os poros são solitários, alguns podem ser múltiplos, em sua maioria não são obstruídos por substâncias.

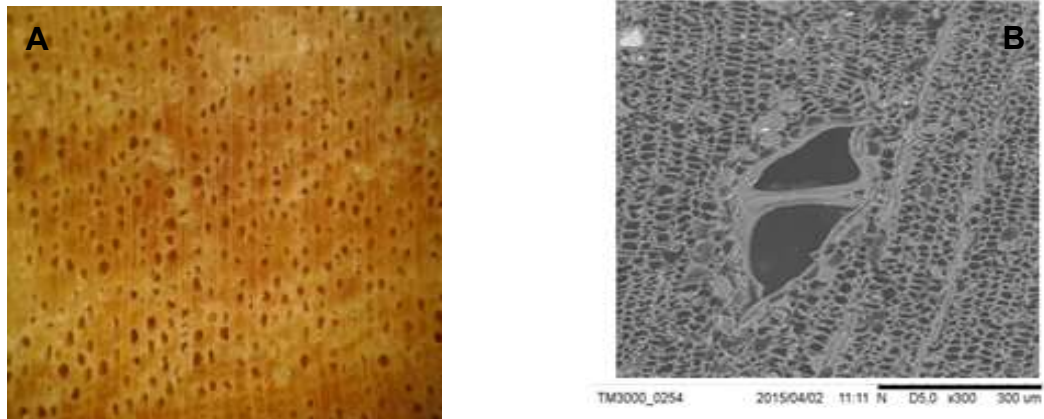


Figura 8. Madeira de cerne de amarelão: (A) Corte transversal - lupa aumento de 10x; (B) Corte transversal microscopia eletrônica de varredura (MEV) - aumento de 300x escala de 300 μ m

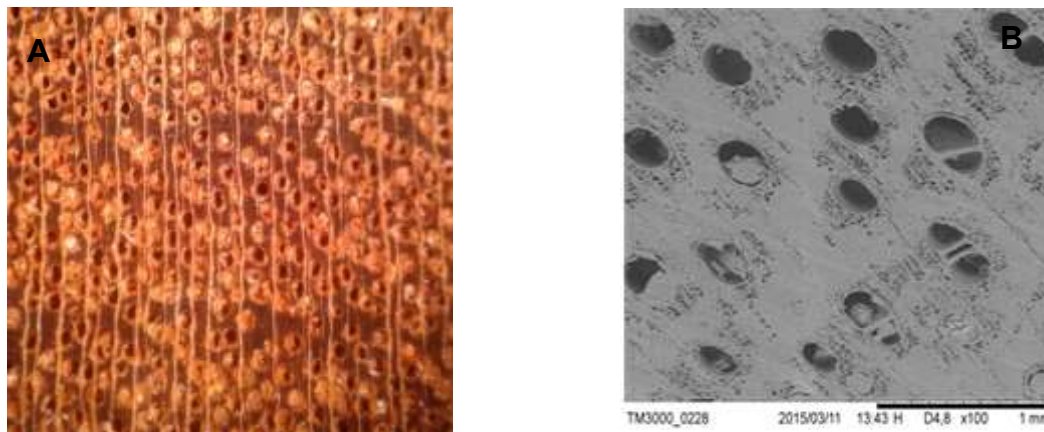


Figura 9. Madeira de cerne de araracanga: (A) Corte transversal - lupa aumento de 10x; (B) Corte transversal microscopia eletrônica de varredura (MEV) – aumento de 100x e escala de 1mm

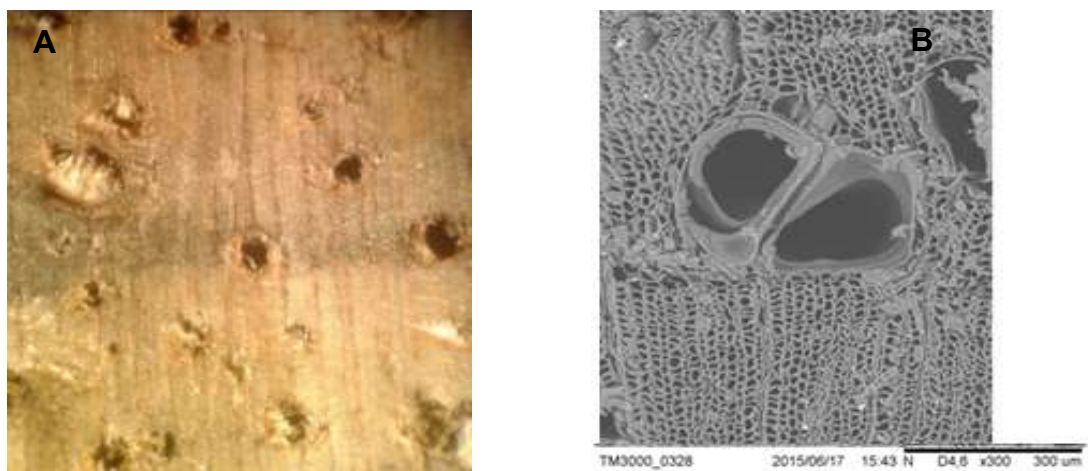


Figura 10. Madeira de cerne de caju-açu: (A) Corte transversal - lupa aumento de 10x; (B) Corte transversal microscopia eletrônica de varredura (MEV) – aumento de 300x e escala de 300 μ m

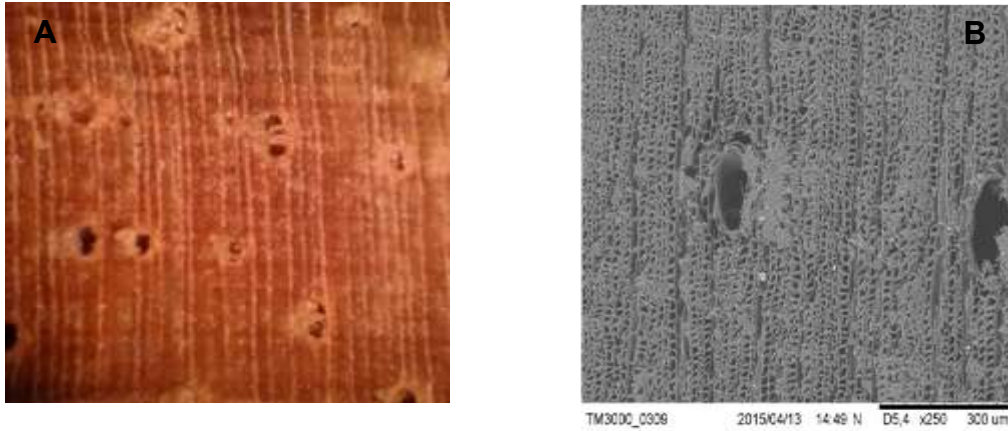


Figura 11. Madeira de cerne de cedro: (A) Corte transversal - lupa aumento de 10x; (B) Corte transversal microscopia eletrônica de varredura (MEV) – aumento de 250x e escala de 300μm

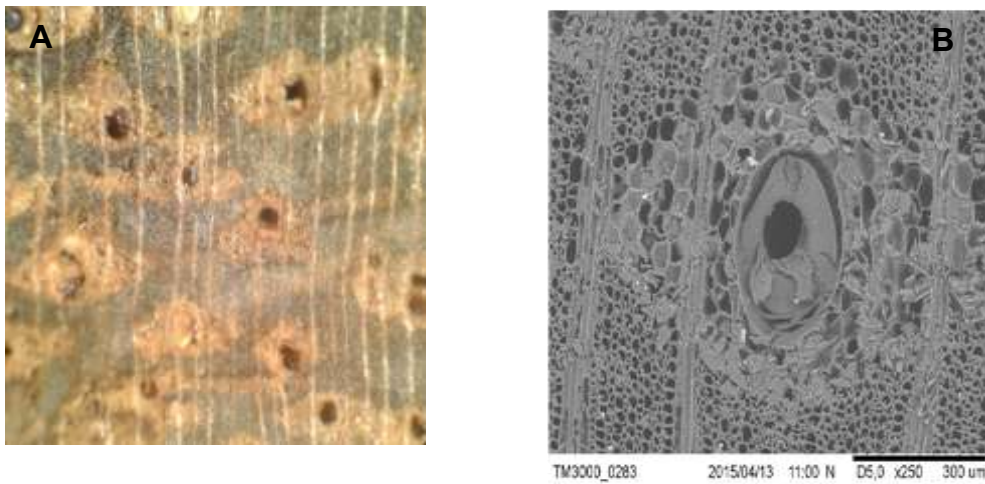


Figura 12. Madeira de cerne de cerejeira: (A) Corte transversal - lupa aumento de 10x; (B) Corte transversal microscopia eletrônica de varredura (MEV) - aumento de 250x escala de 300 μm

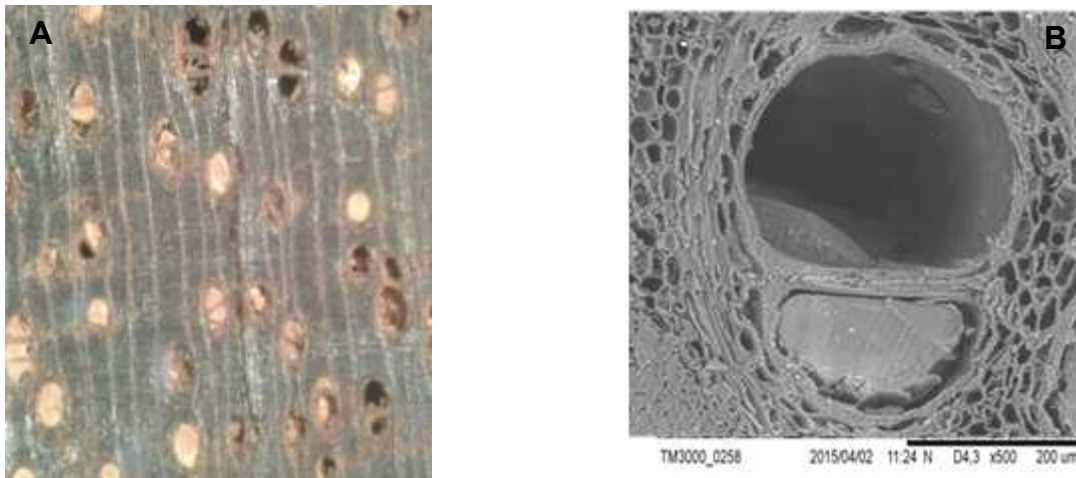


Figura 13. Madeira de cerne de cumaru: (A) Corte transversal - lupa aumento de 10x; (B) Corte transversal microscopia eletrônica de varredura (MEV) - aumento de 500x escala de 200 μm

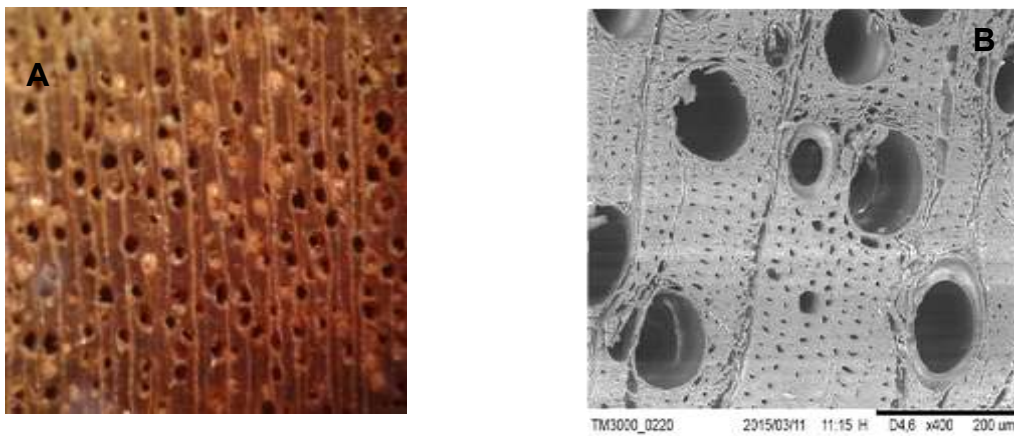


Figura 14. Madeira de cerne de peroba-mica: (A) Corte transversal - lupa aumento de 10x; (B) Corte transversal microscopia eletrônica de varredura (MEV) - aumento de 400x escala de 200 μm

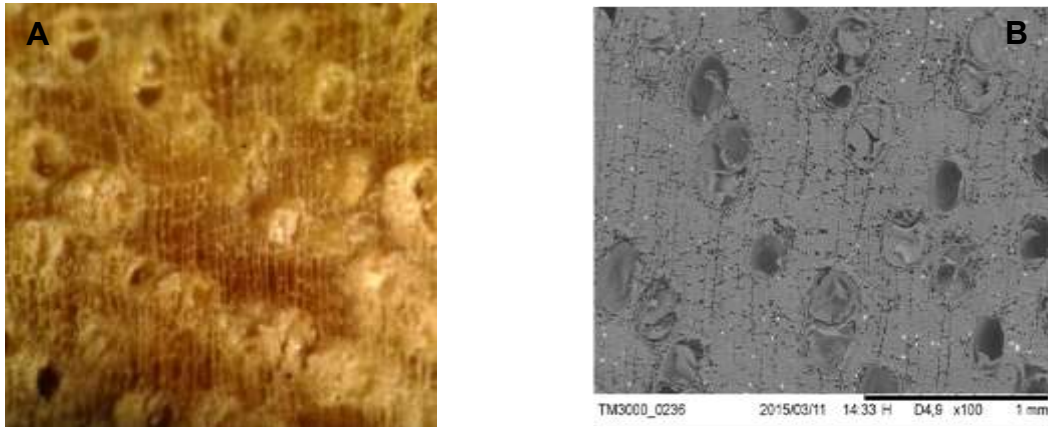


Figura 15. Madeira de cerne de piquiarana: (A) Corte transversal - lupa aumento de 10x; (B) Corte transversal microscopia eletrônica de varredura (MEV) - aumento de 100x escala de 1mm

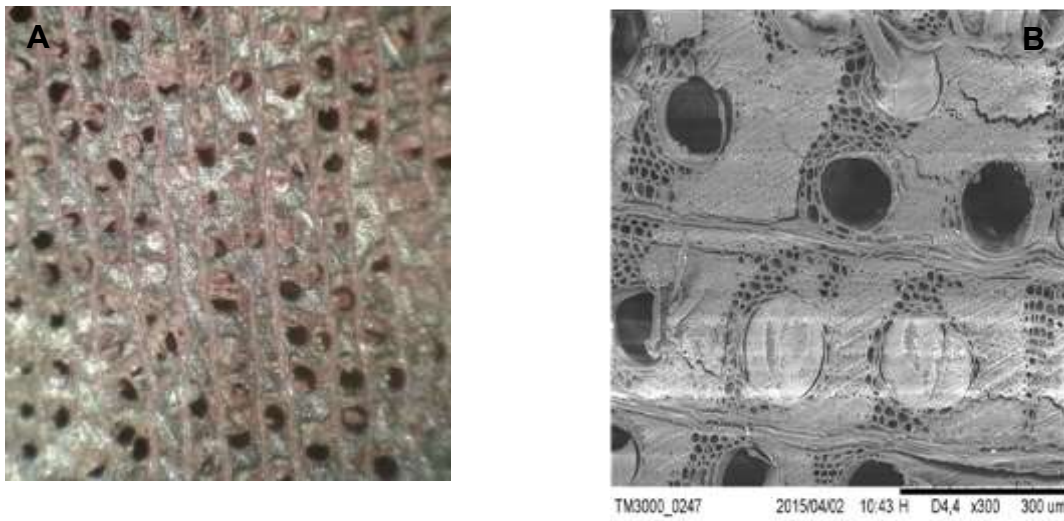


Figura 16. Madeira de cerne de roxinho: (A) Corte transversal - lupa aumento de 10x; (B) Corte transversal microscopia eletrônica de varredura (MEV) - aumento de 300x escala de 300µm

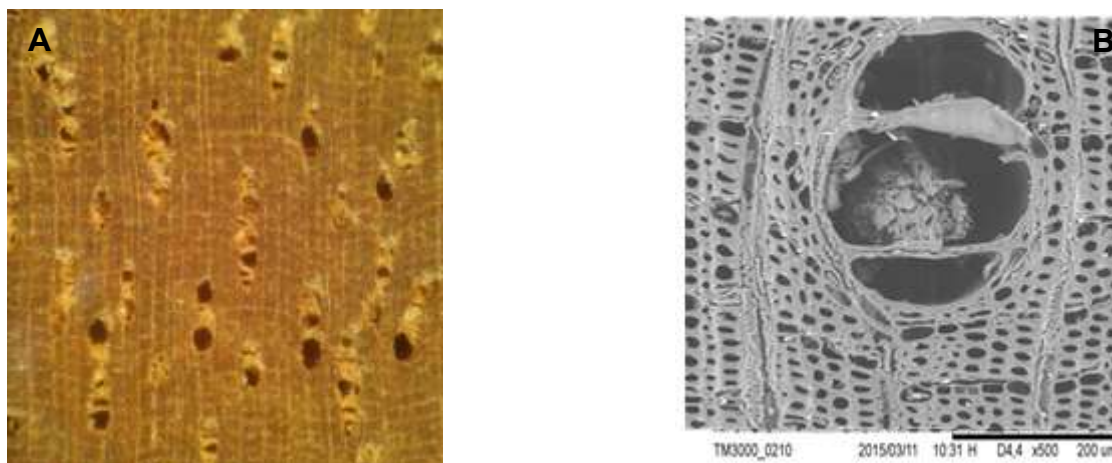


Figura 17. Madeira de cerne de seru: (A) Corte transversal - lupa aumento de 10x; (B) Corte transversal microscopia eletrônica de varredura (MEV) - aumento de 500x escala de 200 μ m

4.2 Avaliação de Protocolos de Extração de DNA de Madeiras Secas

Foi possível extrair DNA de madeira seca, a partir do cerne, para todas as espécies testadas, com diferença significativa (Teste Tukey 1%) entre os protocolos para a concentração de DNA (ng/ μ L) no comprimento de onda a 260 nm (Tabela 10).

Tabela 10. Concentração de DNA (ng/ μ L) das madeiras em cada protocolo testado

Nome vulgar	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5
	----- Concentração de DNA (ng/ μ L) -----				
Amarelão	242,86 a	6,35 b	63,13 b	243,78 a	30,76 b
Araracanga	298,23 ab	1,63 c	198,40 b	327,26 a	65,63 c
Caju-açu	157,36 a	2,33 d	101,80 ab	64,03 bc	4,96 cd
Cedro	122,13 b	3,20 c	77,68 b	233,46 a	6,83 c
Cerejeira	83,73 ab	11,23 b	223,68 a	88,00 ab	52,10 ab
Cumaru	114,85 b	1,55 c	89,83 b	400,40 a	43,95 bc
Peroba-mica	140,23 b	2,35 d	69,93 c	268,25 a	8,61 d
Piquiarana	115,67 a	4,20 b	10,70 b	103,86 a	5,36 b
Roxinho	62,90 b	2,28 c	32,36 bc	257,06 a	7,81 c
Seru	267,66 b	4,28 d	57,70 cd	513,10 a	142,15 c

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey 1%

De uma forma geral, a quantidade de DNA obtida foi satisfatória, considerando o tipo de tecido utilizado, o cerne seco. Para Asif e Cannon (2005), o rendimento de DNA a partir de madeira seca é considerado ótimo para quantidades iguais ou superiores a 50 ng/μL.

No entanto, o DNA genômico das amostras não pode ser visualizado em gel de agarose a 1%. Estudos realizados por Jiao et al. (2012) mostraram que as quantidades de DNA extraídas do cerne seco foi de 7,90 ng/mg no método CTAB e de 8,38 ng/mg com extração pelo kit Qiagen, não sendo possível ser observado após a eletroforese em gel de agarose a 1%.

A não visualização em gel de agarose ocorre por tratar-se de DNA extraído de amostras de cerne seco, tecido rico em carboidratos (celulose) e fenóis (lignina) (LOWE, 2008), além de apresentar células mortas e mais antigas (KLOCK et al., 2005).

Para o controle da qualidade após a extração, o DNA de alto peso molecular e íntegro aparecerá no gel como uma banda bem marcada com um tamanho acima de 12 kb, porém o arraste indica degradação do material (VINOD, 2004).

O DNA do cerne é gradualmente degradado durante a sua formação, por ação de nucleases e pelo processo de morte celular (BAMBER, 1976), ocasionando uma diminuição intensa de fragmentos na região do DNA (JIAO et al., 2013).

Estas características do cerne são responsáveis pela degradação do DNA, resultando diretamente na baixa qualidade do material extraído, impedindo a visualização das bandas por meio de eletroforese em gel de agarose após a extração. Contudo, esta dificuldade pode ser corrigida na amplificação por PCR (COLEY; BARONE, 1996; SWETHA et al., 2014).

Já no que diz respeito à qualidade das amostras (Tabela 11), obtida por espectrofotômetro, o protocolo 2 (Kit DNeasy Plant Mini) foi o que resultou em maior grau de pureza, para a maioria das amostras, quando comparado com os demais testados.

Tabela 11. Análise da qualidade, em função do grau de pureza, das amostras de DNA (Razão A260/A280nm)

Nome vulgar	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5
	-----Razão A260/A280 -----				
Amarelão	1,15 bc	1,49 a	1,10 c	1,33 abc	1,37ab
Araracanga	1,41 ab	1,79 a	1,29 b	1,35 ab	0,62 c
Caju-açu	1,17 b	1,67 a	1,21 b	1,22 b	1,58 a
Cedro	0,86 bc	1,44 a	1,17 ab	0,58 c	0,87 bc
Cerejeira	1,18 ab	1,07 b	0,69 c	1,40 a	1,18 ab
Cumaru	1,06 b	2,08 a	1,17 b	0,79 b	0,91 b
Peroba-mica	1,32 ab	1,93 a	1,14 b	0,63 b	1,24 ab
Piquiarana	1,40 ab	1,67 ab	0,87 b	1,24 ab	2,10 a
Roxinho	0,86 bc	2,06 a	0,58 bc	0,56 c	1,11 b
Seru	1,17 a	1,40 a	1,15 a	0,77 b	1,19 a

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey de médias ao nível de 1% de probabilidade

O DNA apresenta seu máximo de absorção em 260 nm, logo sua quantificação é feita com base na absorbância nesse comprimento de onda. Os compostos presentes na madeira, como as proteínas, mostram absorção na região de 280 nm, devido a diversos aminoácidos (fenilalanina, cisteína, cistina, metionina, triptofano, histidina e tirosina) (ZAIA et al., 1998). A pureza da amostra de DNA é analisada pela razão A260/A280, a qual indica a relação entre a quantidade de ácido desoxirribonucleico e a de proteínas contaminantes (GALLAGHER, 2011). A razão ideal para isolado de DNA com baixa contaminação por proteínas é de 1,8 a 2,0 e este é classificado como puro (TECHNICAL BULLETIN, 2012).

Razões abaixo de 1,8 indicam possíveis contaminações por fenol, proteínas ou algum outro componente. Quando não se obtém o grau de pureza de 1,8, é necessária a realização de ajustes no protocolo ou purificação de DNA, a qual pode ser feita com utilização de kits.

Outras substâncias presentes na madeira como os fenóis, carboidratos, além de guanidina residual presente nas colunas de kits para extração de DNA, mostram absorção na região de 230 nm (WILFINGER et al., 1997). Dessa forma, a razão A260/A230 indica a qualidade das amostras de DNA quanto à presença ou não dessas substâncias (Tabela 12).

Tabela 12. Análise da qualidade das amostras, em função do grau de pureza, de DNA (Razão A230/A260 nm)

Nome vulgar	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5
	-----Razão 230/260 -----				
Amarelão	0,33 b	0,32 b	0,34 b	0,47 a	0,27 b
Araracanga	0,47 a	0,11 b	0,45 a	0,42 a	0,09 b
Caju-açu	0,33 a	0,09 b	0,40 a	0,37 a	0,12 b
Cedro	0,27 a	0,13 b	0,33 a	0,29 a	0,13 b
Cerejeira	0,28 b	0,19 c	0,34 b	0,43 a	0,29 b
Cumarú	0,47 a	0,07 b	0,51 a	0,54 a	0,18 b
Peroba-mica	0,39 b	0,09 d	1,14 a	0,33 bc	0,22 cd
Piquiarana	0,33 ab	0,15 ab	0,45 a	0,24 ab	0,12 b
Roxinho	0,17 b	0,10 c	0,20 b	0,41 a	0,20 b
Seru	0,36 a	0,15 a	0,37 a	0,35 a	0,24 a

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey 1%

Diante da análise dos resultados obtidos na razão A230/A260, apesar do protocolo 4 ter apresentado, em geral, os maiores valores quanto a esse aspecto, foi possível constatar que, para as madeiras testadas, o nível de pureza foi muito aquém de 1,8. Esse resultado se deve ao fato de haver predominância de substâncias fenólicas na amostra, o que já era esperado pela composição química característica do material estudado.

Mazza e Bitencourt (2000) explicam que contaminantes, como os compostos polifenólicos e terpenóides, muito presentes no cerne da madeira e liberados durante a lise celular aderem irreversivelmente ao DNA, inibindo a digestão com endonucleases de restrição e/ou a

amplificação através de PCR. O rompimento da célula também libera polissacarídeos, os quais são de difícil separação do DNA (LODHI et al., 1994).

Todavia, assim como foi mencionado para a razão 260/280, as impurezas detectadas na razão 260/230 também podem ser purificadas na etapa de amplificação.

4.3 Amplificação de DNA de Madeiras Secas: Teste de Primers e Aditivo

Ao analisar os géis dos produtos resultantes da PCR sem aditivo para os genes *rbcLa* F e *rbcLa* R, MatK-1RKIM -f e MatK -3FKIM-r e *rbcLa*-F 5' – 3' e *rbcLajf634*-R 5' – 3' foi possível verificar que o protocolo 2, apesar de ter fornecido as concentrações mais baixas, porém as melhores purezas, permitiu a amplificação para a madeira de amarelão. O protocolo 5 também amplificou para amarelão. Com isso, no teste preliminar para a escolha dos *primers* na ausência de aditivo, foi constatado que os três *primers* atenderiam ao objetivo de amplificar o DNA das madeiras testadas (Figura 18).

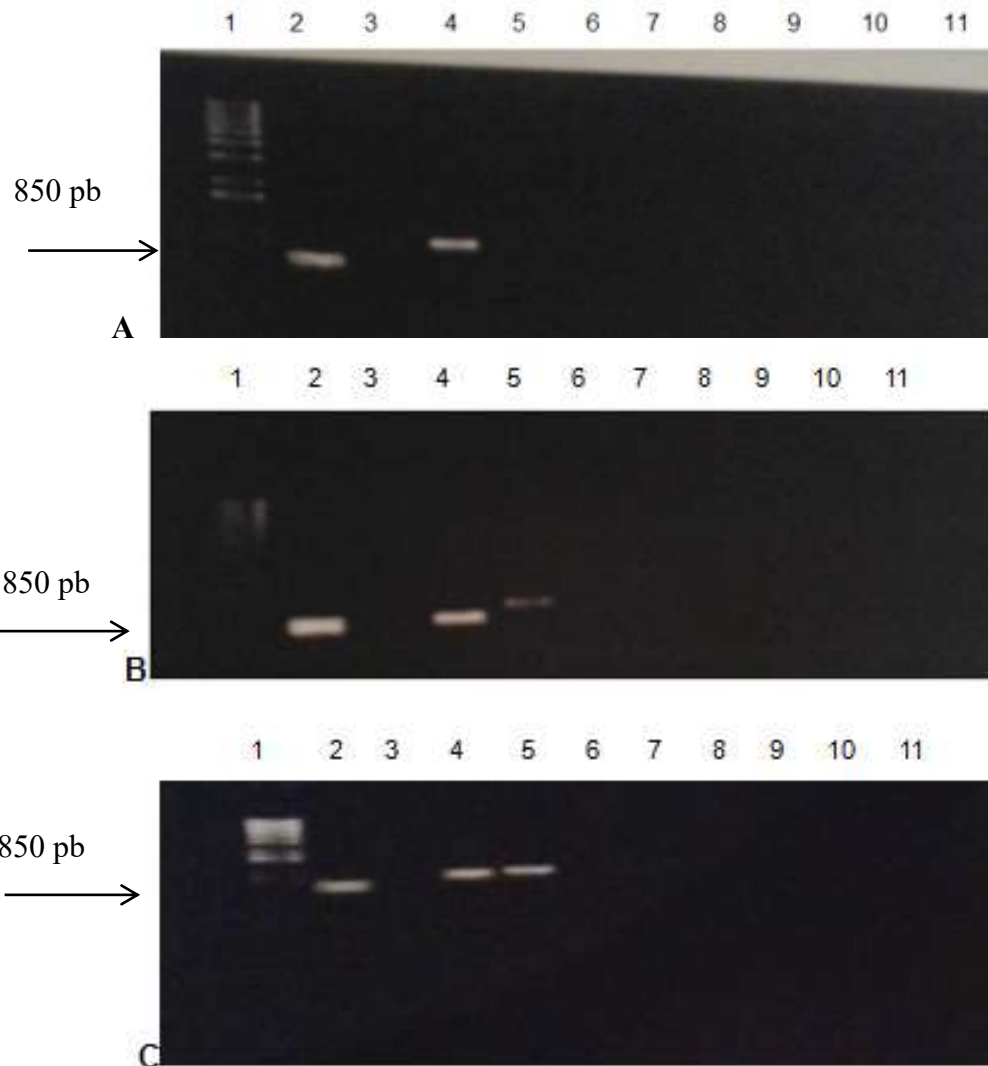


Figura 18. Teste de amplificação dos produtos de PCR para as madeiras amarelão e cerejeira sem aditivo PCR enhancer: (A) Gel de eletroforese para os genes *rbcLa F* e *rbcLa R*: 1 – marcador; 2 – controle positivo (DNA de folha de (*Lophantera lactescens*); 3 – amarelão Protocolo 1; 4 – amarelão Protocolo 2; 5 - amarelão Protocolo 5; 6 – cerejeira Protocolo 5; 7 – cerejeira Protocolo 4; 8 – cerejeira Protocolo 3; 9 – cerejeira Protocolo 2; 10 – cerejeira Protocolo 1; 11 – controle negativo.; (B) Gel de eletroforese para os genes *MatK-1RKIM -f* e *MatK -3FKIM-r* : 1 – marcador; 2 – controle positivo (DNA de folha de (*Lophantera lactescens*); 3 – amarelão Protocolo 1; 4 – amarelão Protocolo 2; 5 - amarelão Protocolo 5; 6 – cerejeira Protocolo 5; 7 – cerejeira Protocolo 4; 8 – cerejeira Protocolo 3; 9 – cerejeira Protocolo 2; 10 – cerejeira Protocolo 1; 11 – controle negativo; (C) Gel de eletroforese para os genes *rbcLa-F 5' – 3'* e *rbcLajf634-R 5' – 3'* : 1 – marcador; 2 – controle positivo (DNA de folha de (*Lophantera lactescens*); 3 – amarelão Protocolo 1; 4 – amarelão Protocolo 2; 5 - amarelão Protocolo 5; 6 – cerejeira Protocolo 5; 7 – cerejeira Protocolo 4; 8 – cerejeira Protocolo 3; 9 – cerejeira Protocolo 2; 10 – cerejeira Protocolo 1; 11 – controle negativo.

Quanto ao gel das amostras submetidas ao aditivo foi possível visualizar que para os genes *rbcLa F* e *rbcLa R*, *rbcLa-F* e *rbcLajf634-R* apenas o marcador e o controle positivo foram amplificados, enquanto para *MatK-1RKIM -f* e *MatK -3FKIM-r*, somente o marcador foi amplificado. Sendo assim, o teste com o aditivo não mostrou resultados satisfatórios para as amostras inicialmente testadas (Figura 19).

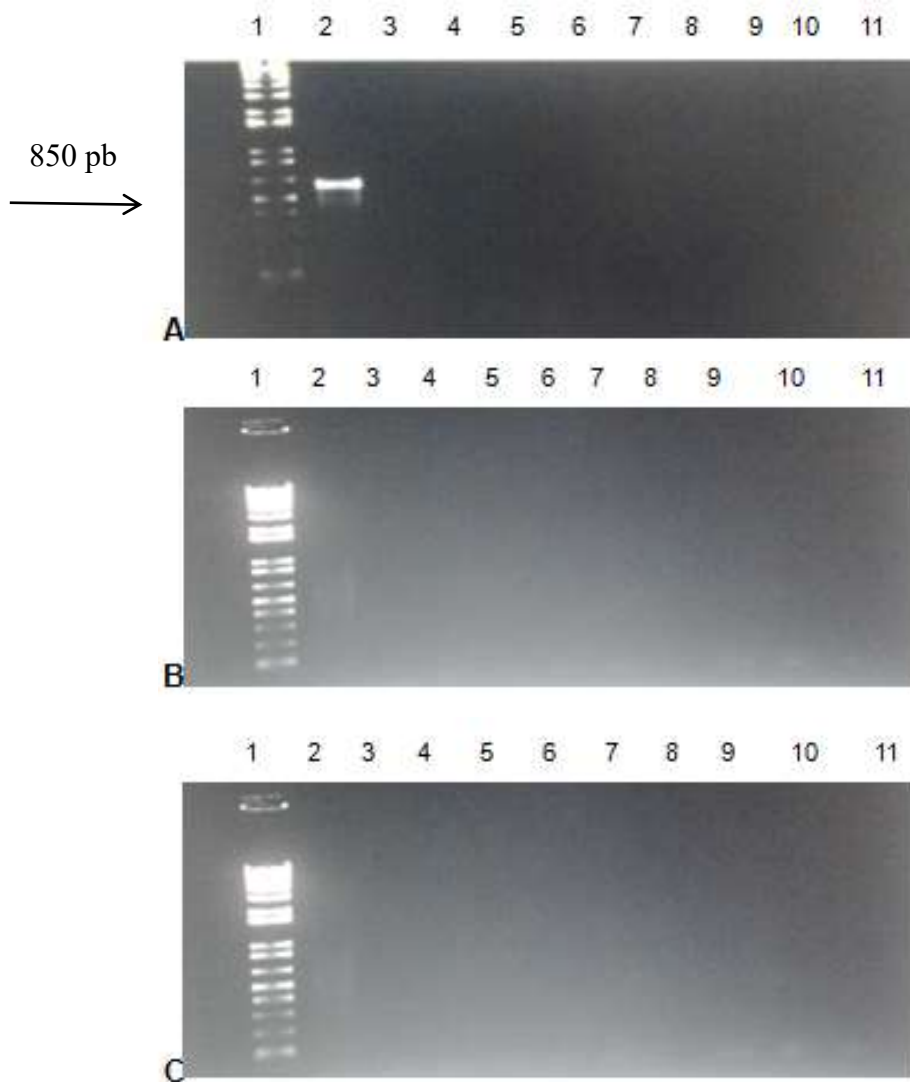


Figura 19. Teste de amplificação dos produtos de PCR para as madeiras amarelão e cerejeira com aditivo PCR enhancer: A) Gel de eletroforese para os genes *rbcLa F* e *rbcLa R* (PCR enhancer) 1 – marcador; 2 – controle positivo (DNA de folha de *Lophantera lactescens*); 3 – amarelão Protocolo 1; 4 – amarelão Protocolo 2; 5 - amarelão Protocolo 5; 6 – cerejeira Protocolo 5; 7 – cerejeira Protocolo 4; 8 – cerejeira Protocolo 3; 9 – cerejeira Protocolo 2; 10 – cerejeira Protocolo 1; 11 – controle negativo; B) Gel de eletroforese para o genes *MatK-1RKIM -f* e *MatK -3FKIM-r* (PCR enhancer) 1 – marcador; 2 – controle positivo (DNA de folha de *Lophantera lactescens*); 3 – amarelão Protocolo 1; 4 – amarelão Protocolo 2; 5 - amarelão Protocolo 5; 6 – cerejeira Protocolo 5; 7 – cerejeira Protocolo 4; 8 – cerejeira Protocolo 3; 9 – cerejeira Protocolo 2; 10 – cerejeira Protocolo 1; 11 – controle negativo; C) Gel de eletroforese

para os genes *rbcLa*-F 5' – 3' e *rbcLajf634*-R 5' – 3' (PCR enhancer) – marcador; 2 – controle positivo (DNA de folha de (*Lophantera lactescens*); 3 – amarelão Protocolo 1; 4 – amarelão Protocolo 2; 5 - amarelão Protocolo 5; 6 – cerejeira Protocolo 5; 7 – cerejeira Protocolo 4; 8 – cerejeira Protocolo 3; 9 – cerejeira Protocolo 2; 10 – cerejeira Protocolo 1; 11 – controle negativo

4.4 Amplificação de DNA

Diante das avaliações realizadas para a seleção de *primers*, foram escolhidos os genes *rbcLa*-F e *rbcLajf634*-R, sem aditivo, para a amplificação de todas as amostras de madeira e foi possível obter os resultados listados na tabela 13 de acordo com os protocolos testados, onde “+” indica o protocolo que permitiu amplificar o DNA de madeira de cerne seco. Os resultados satisfatórios de eletroforese realizada a partir da PCR do DNA extraído pelos protocolos 2 e 4 estão representados nas figuras 20 e 21, respectivamente.

Tabela 13. Protocolos que permitiram amplificar as amostras de DNA de madeira de cerne seco das espécies testadas

Nome vulgar	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5
	-----Amplificação das amostras -----				
Amarelão		+			
Araracanga		+			
Caju-açu		+		+	
Cedro		+			
Cerejeira		+			
Cumaru		+			
Peroba-mica		+			
Piquiarana		+			
Roxinho		+			
Seru		+			

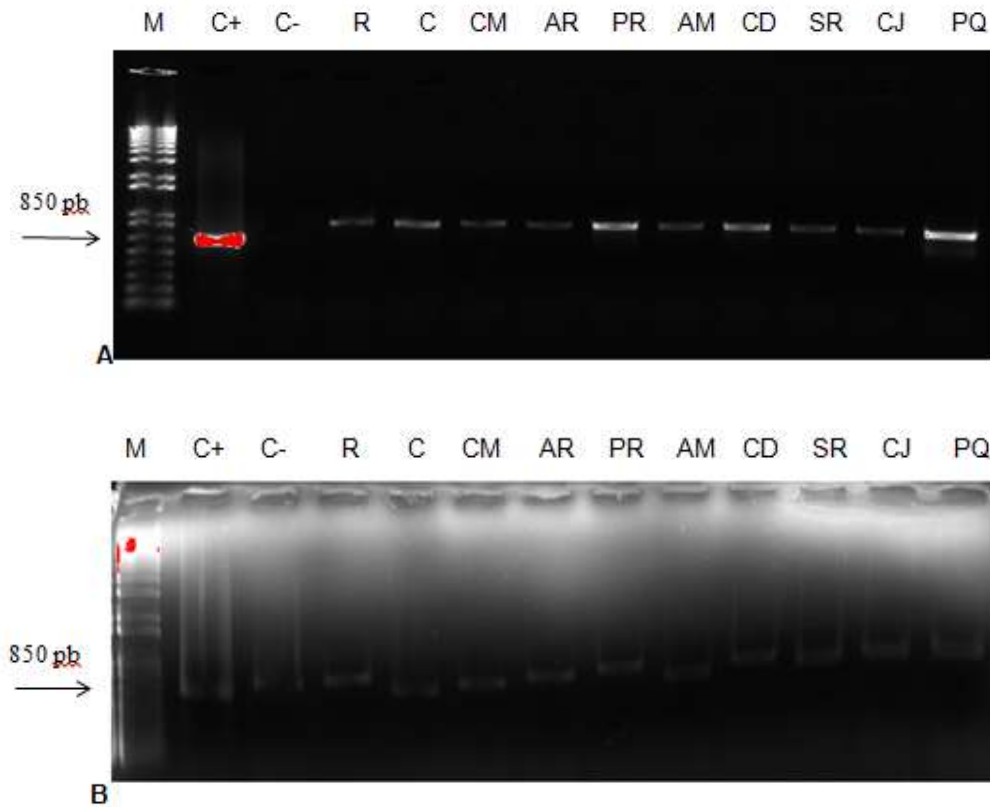


Figura 20. Gel de eletroforese das amostras de todas as espécies amplificadas pelo Protocolo 2: A) Gel red aplicado na amostra; B) Gel red aplicado após a corrida. M- marcador 1kb Ladder (Avati), C+ controle positivo (DNA de folha de *Lophantera lactescens*), C- controle negativo, R – Roxinho, C – Cerejeira, CM – Cumaru, AR – Araracanga, PR – Peroba mica, AM – Amarelão, CD – Cedro, SR – Seru, CJ – Caju açúcar, PQ – Piquiarana

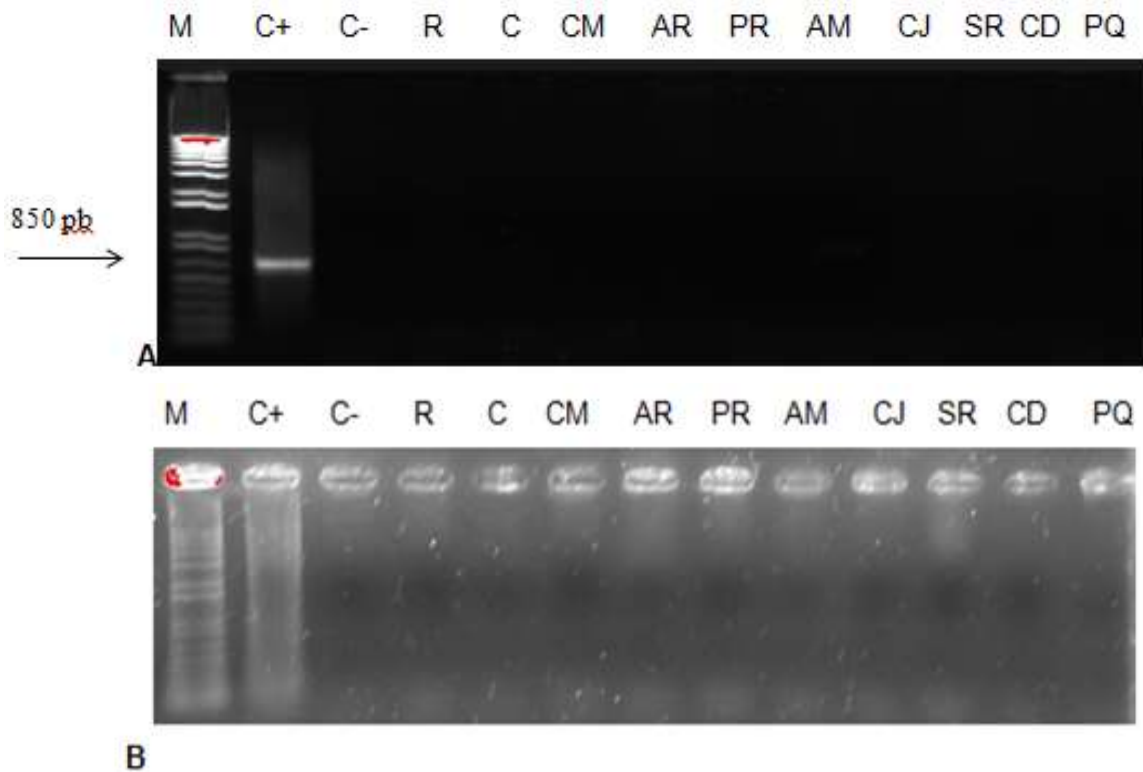


Figura 21. Gel de eletroforese das amostras de todas as espécies amplificadas pelo Protocolo 4: A) Gel red aplicado na amostra; B) Gel red aplicado após a corrida. M- marcador 1kb Ladder (Avati), C+ controle positivo (DNA de folha de *Lophantera lactescens*), C- controle negativo, R – Roxinho, C – Cerejeira, CM – Cumaru, AR – Araracanga, PR – Peroba mica, AM – Amarelão, CJ – Caju açúcar, SR – Seru, CD – Cedro, PQ - Piquiarana

Apesar da quantidade de DNA obtida ter variado entre os protocolos testados, o resultado obtido para a pureza das amostras foi confirmado através dos géis. Foi possível observar que o protocolo 2 (kit Qiagen) é o mais indicado para extração de cerne seco, visto que foi obtida uma melhor amplificação a partir do DNA extraído com este protocolo.

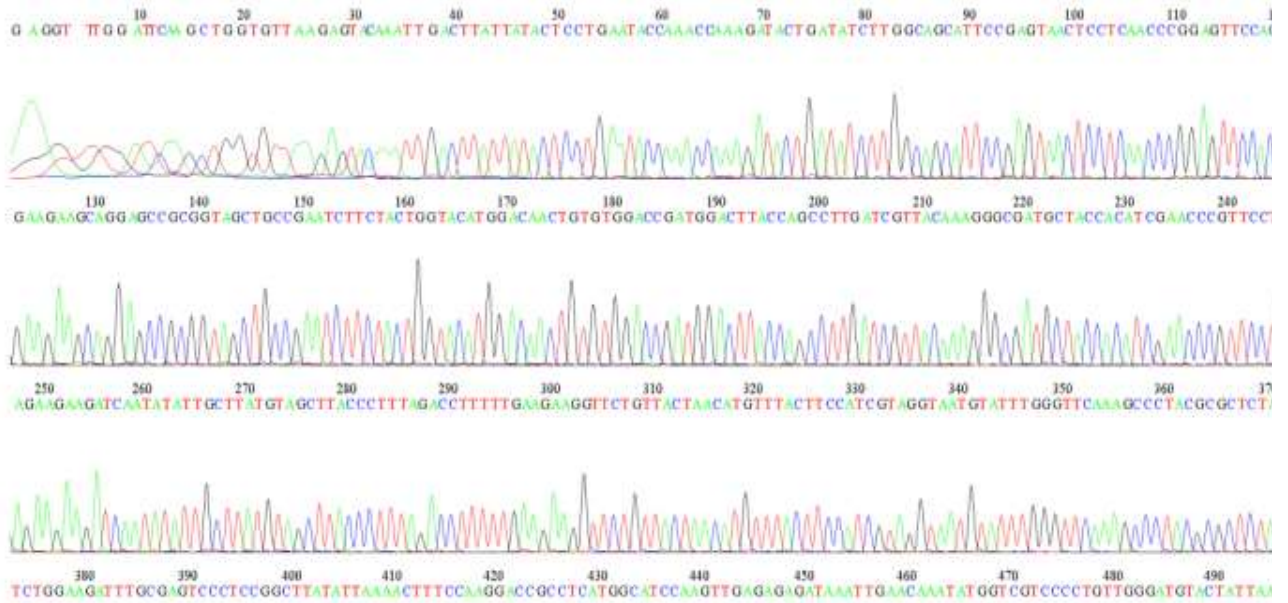
O uso do kit Qiagen (protocolo 2) tem sido citado na literatura por apresentar resultados satisfatórios na amplificação de DNA de madeira, sendo este dado corroborado pelo trabalho com madeira arqueológica de *Populus euphratica* (JIAO et al., 2015); extração de DNA de madeira seca de *Cunninghamia lanceolata* (JIAO et al., 2012); para a caracterização de espécies da família Dipterocarpaceae (RACHMAYANTI et al., 2006).

Quanto ao gene marcador *rbcL* utilizado na amplificação, a escolha se deu com base na sugestão do CBOL – *Plant working Group* (2009), um consórcio para a criação de DNA *Barcodes* de espécies vegetais, que menciona marcadores que compreendem regiões codificantes presentes no genoma do cloroplasto.

4.5 Análise do Sequenciamento

Os dados obtidos permitiram observar que foi possível sequenciar o material genético das madeiras testadas (Figuras 22 a 31). As sequências e os fragmentos com baixa qualidade foram eliminados manualmente através do programa Muscle “Multiple Sequence Aligment”, objetivando minimizar erros. Para madeira de roxinho foi constatado que houve perda de sinal do sequenciamento decorrente da baixa qualidade da amostra de DNA.

Forward (3'-5')



Reverse (5'-3')

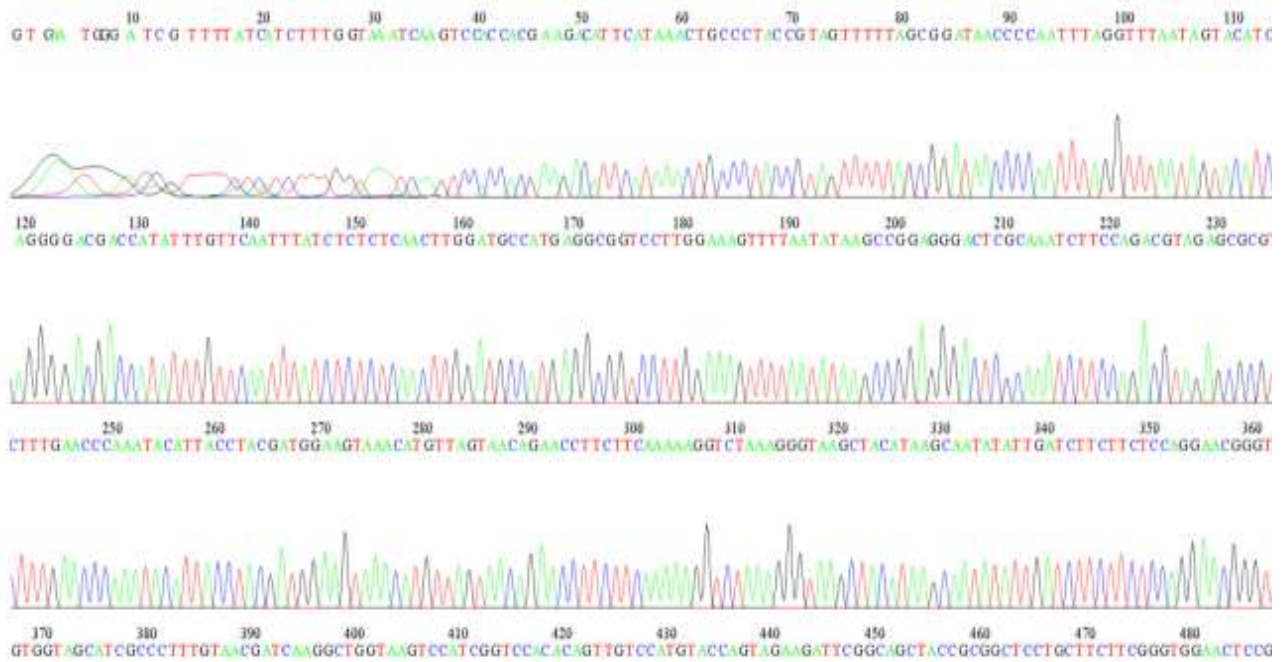
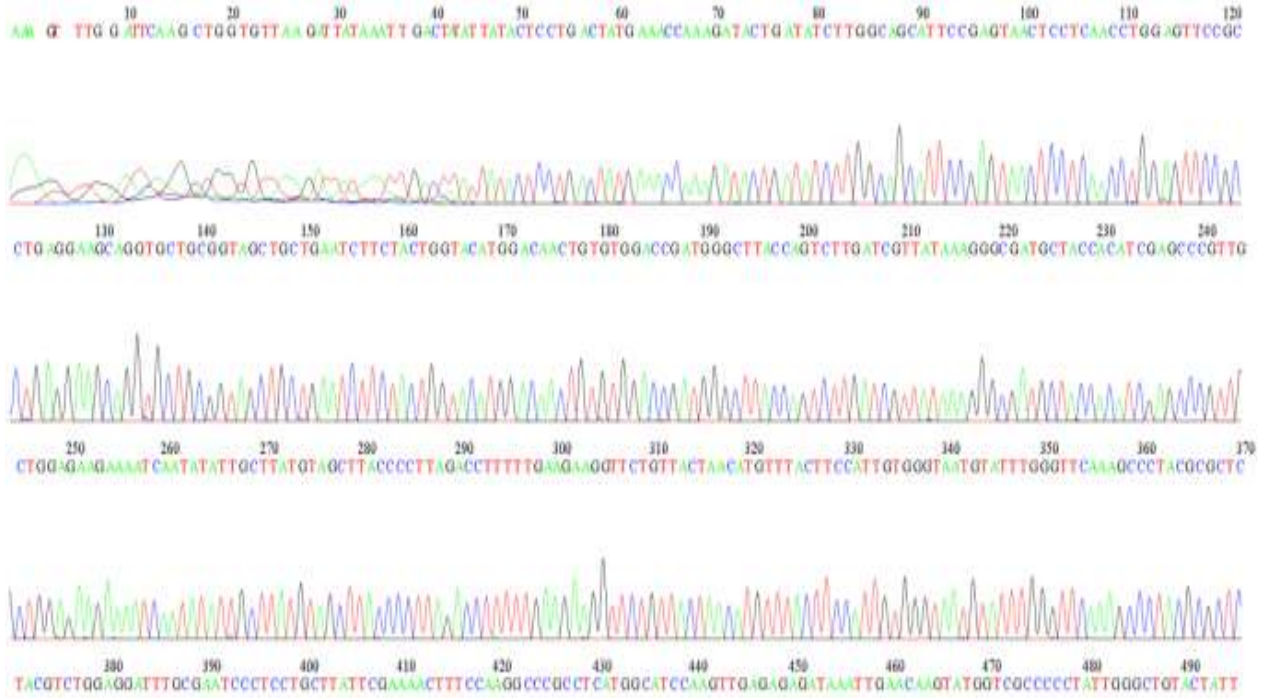


Figura 22. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de amarelão

Forward (3'-5')



Reverse (5'-3')

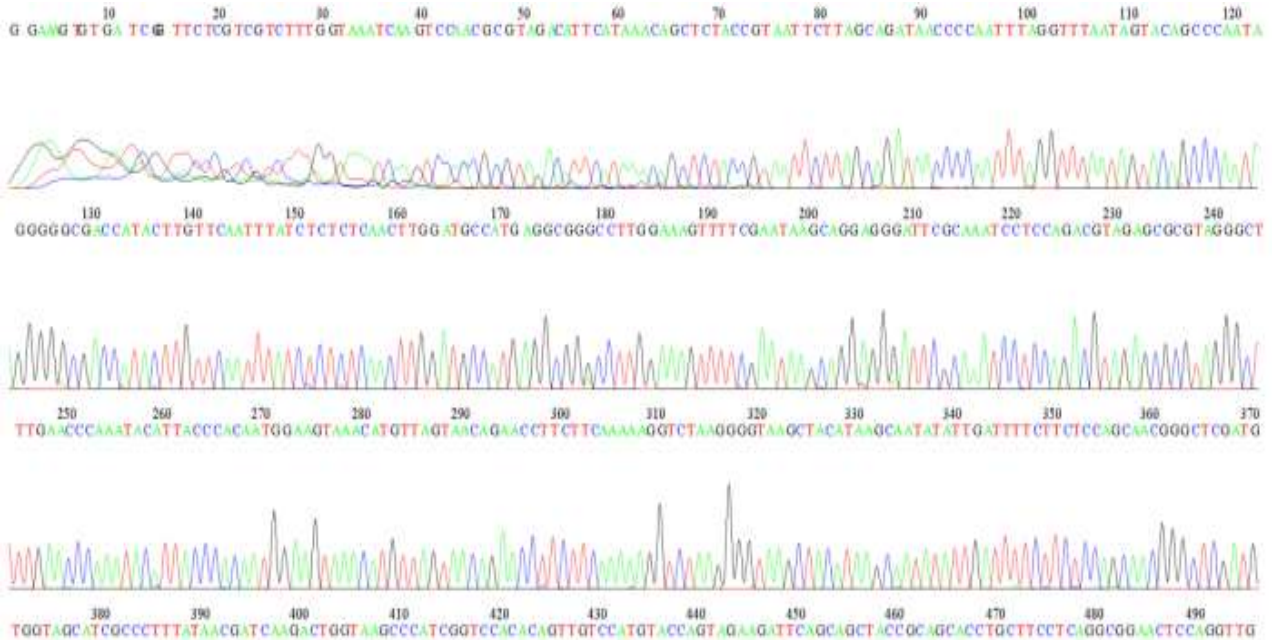


Figura 23. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de araracanga

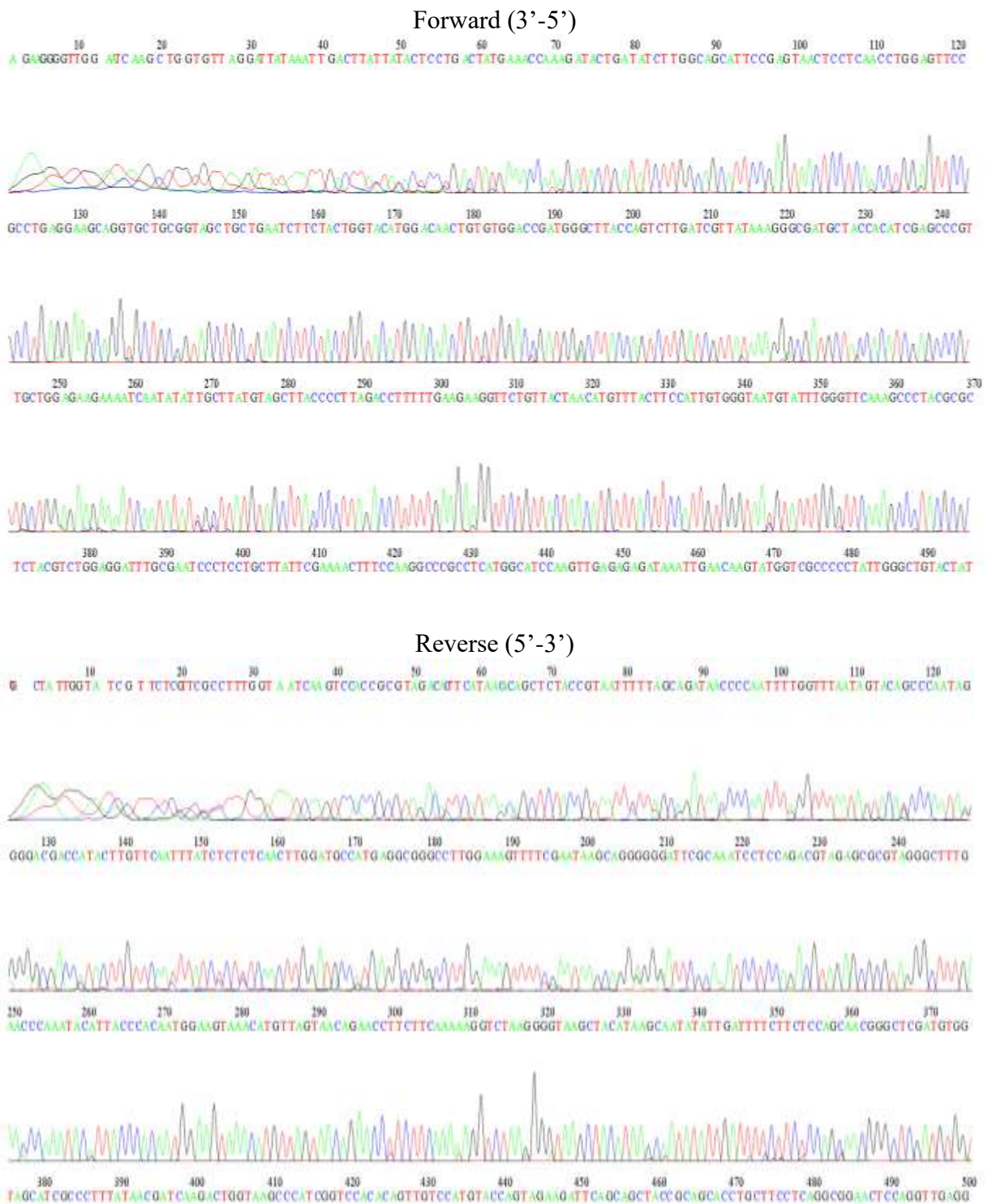


Figura 24. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de caju açu

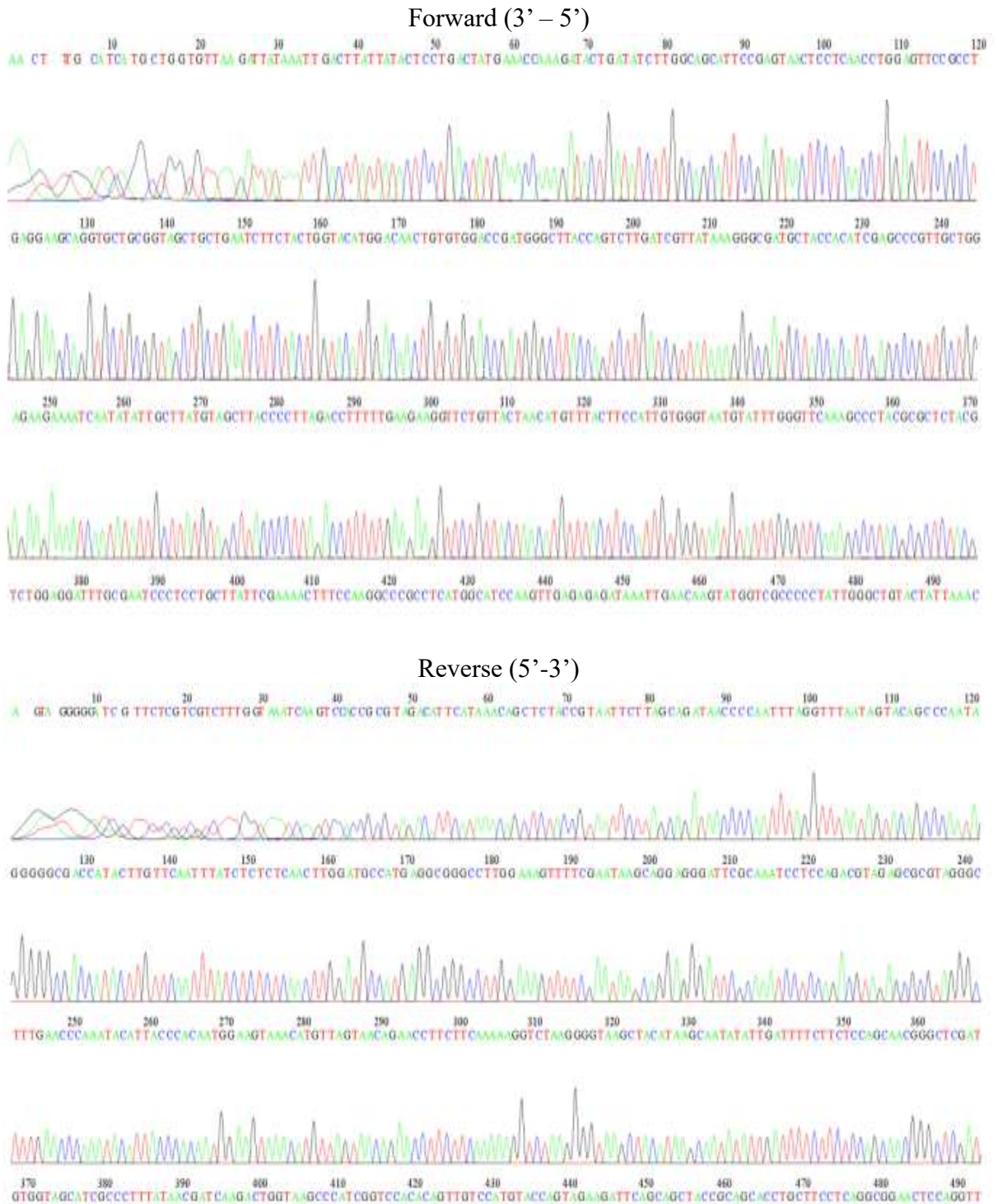


Figura 26. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de cerejeira

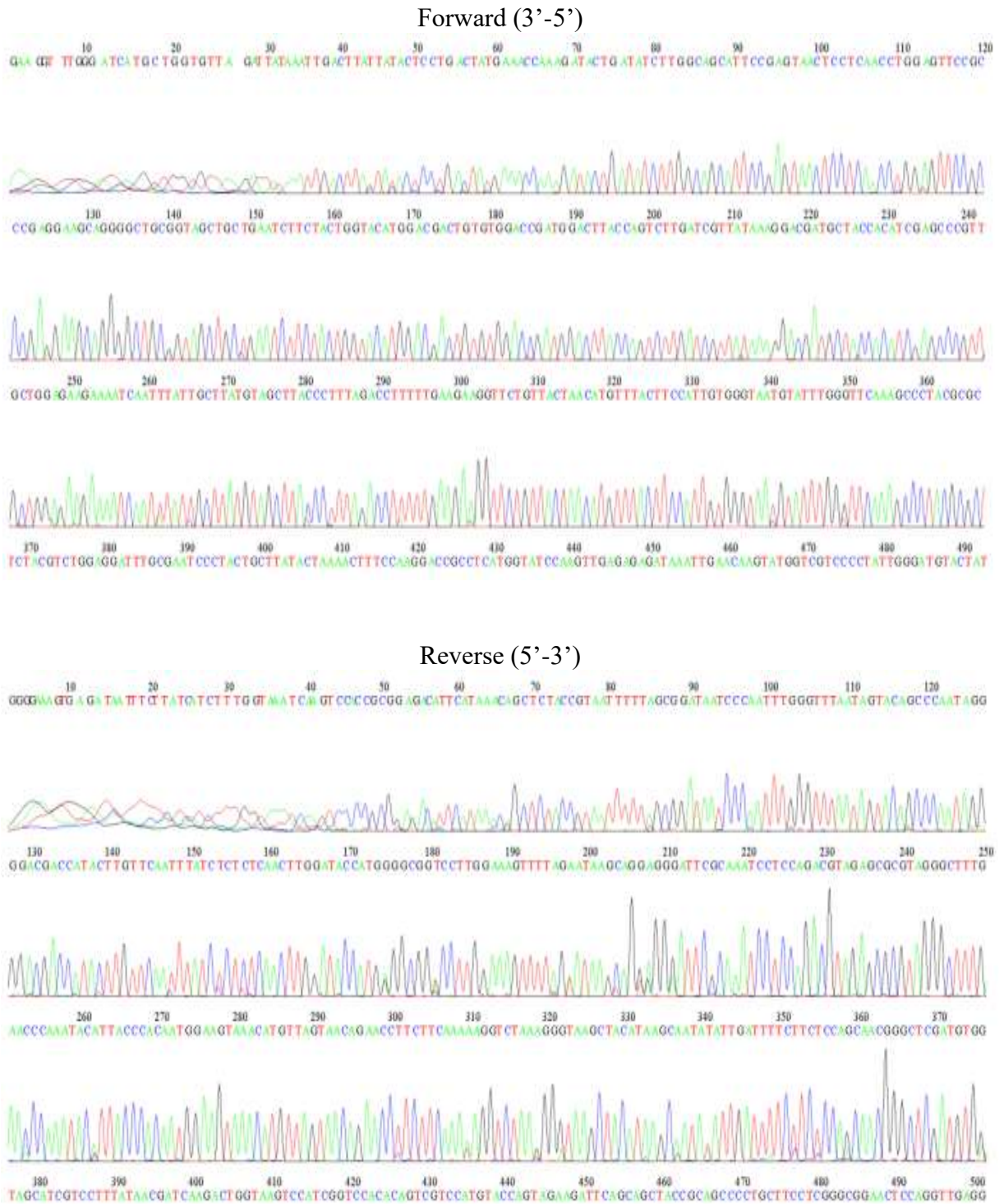
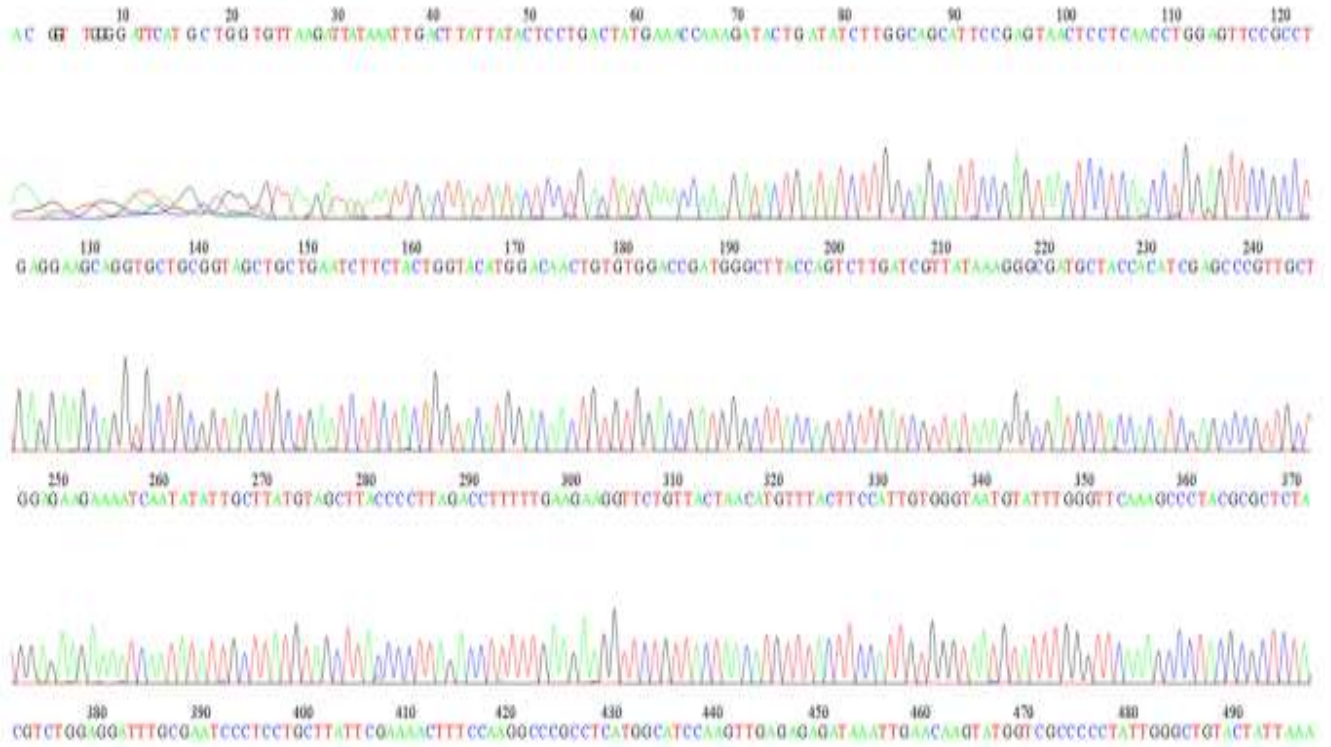


Figura 27. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de cumaru

Forward (3'-5')



Reverse (5'-3')

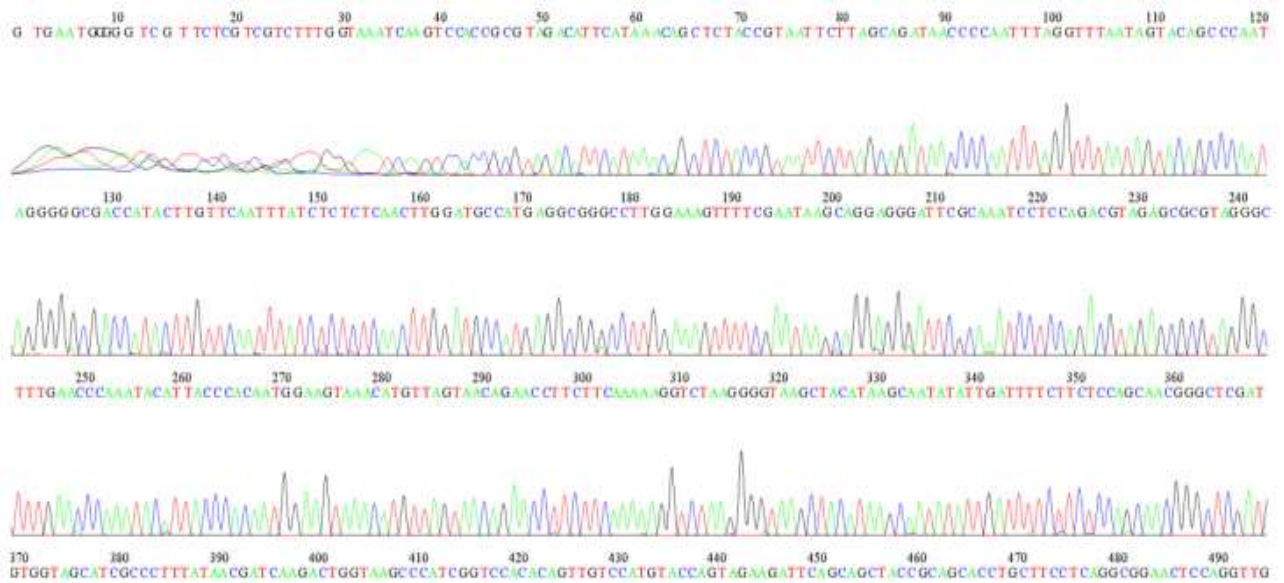
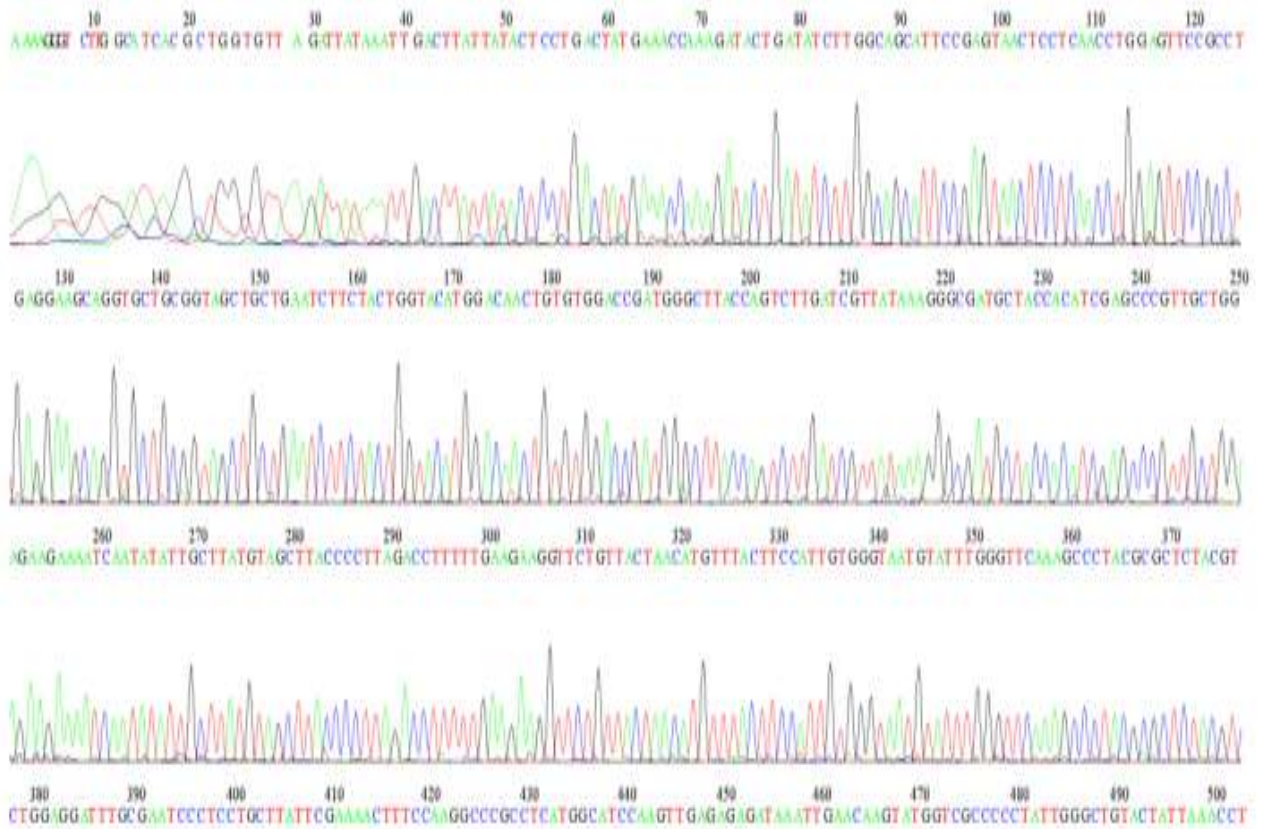


Figura 28. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de peroba mico

Forward (3'-5')

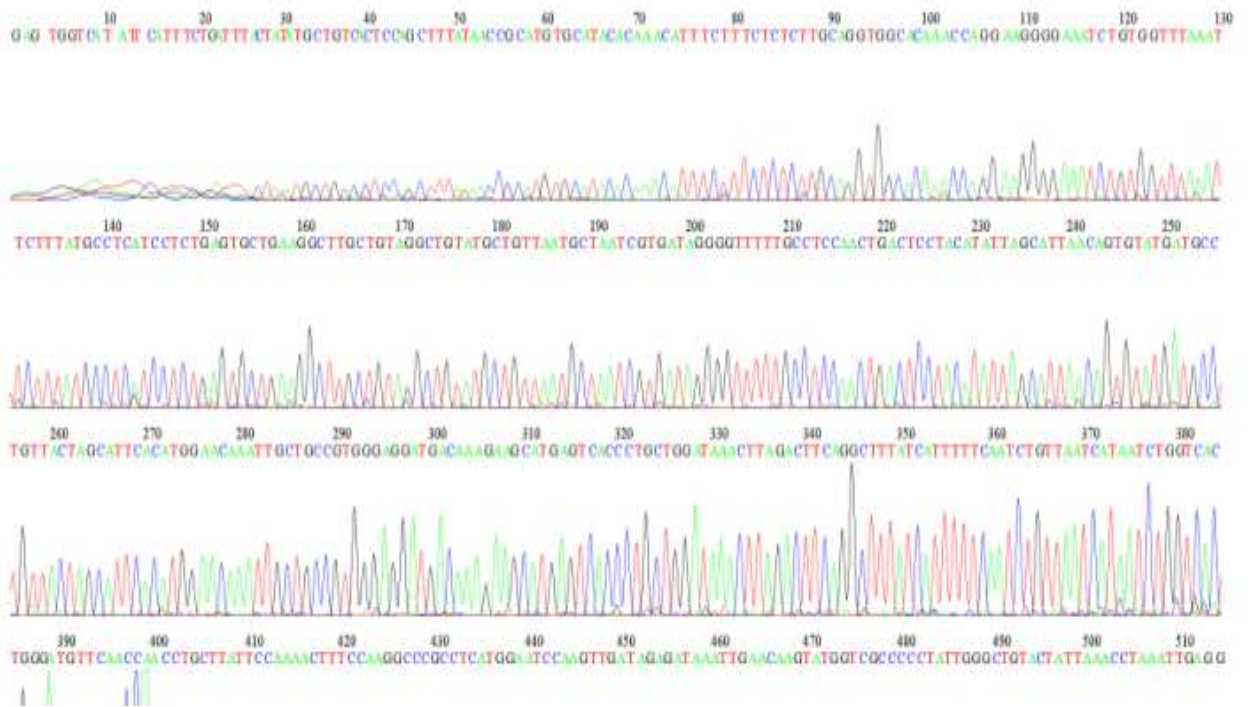


Reverse (5'-3')



Figura 29. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de piquiarana

Forward (3'-5')



Reverse (5'-3')

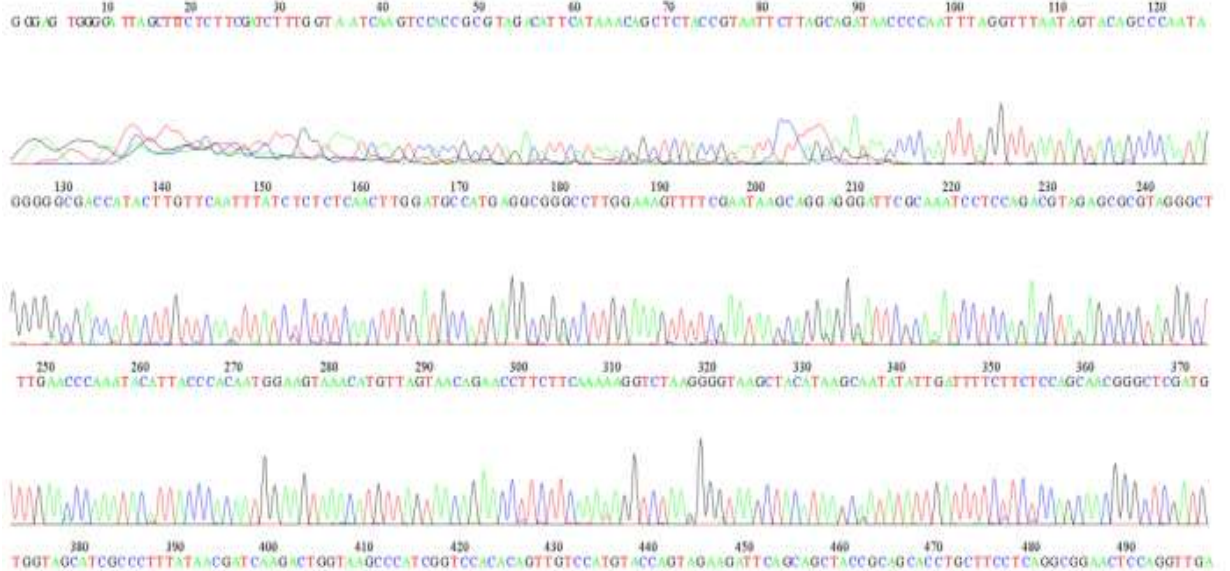
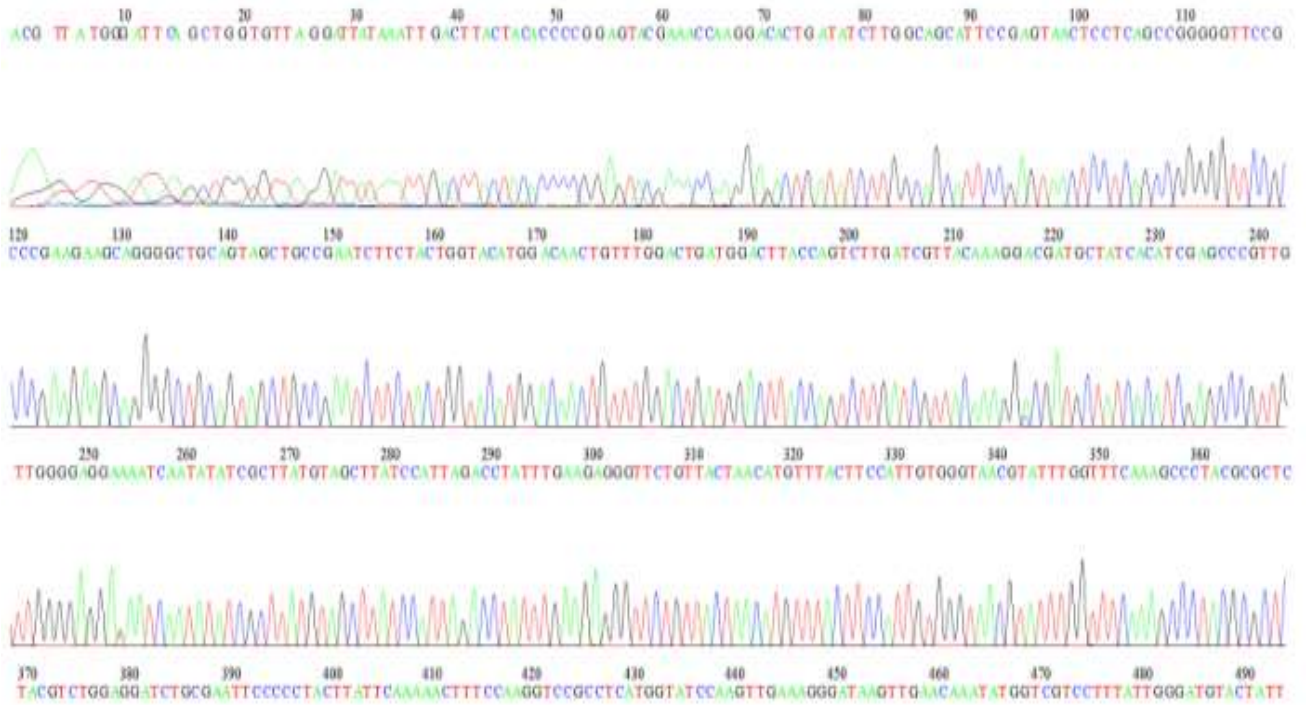


Figura 30. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de roxinho

Forward (3'-5')



Reverse (5'-3')

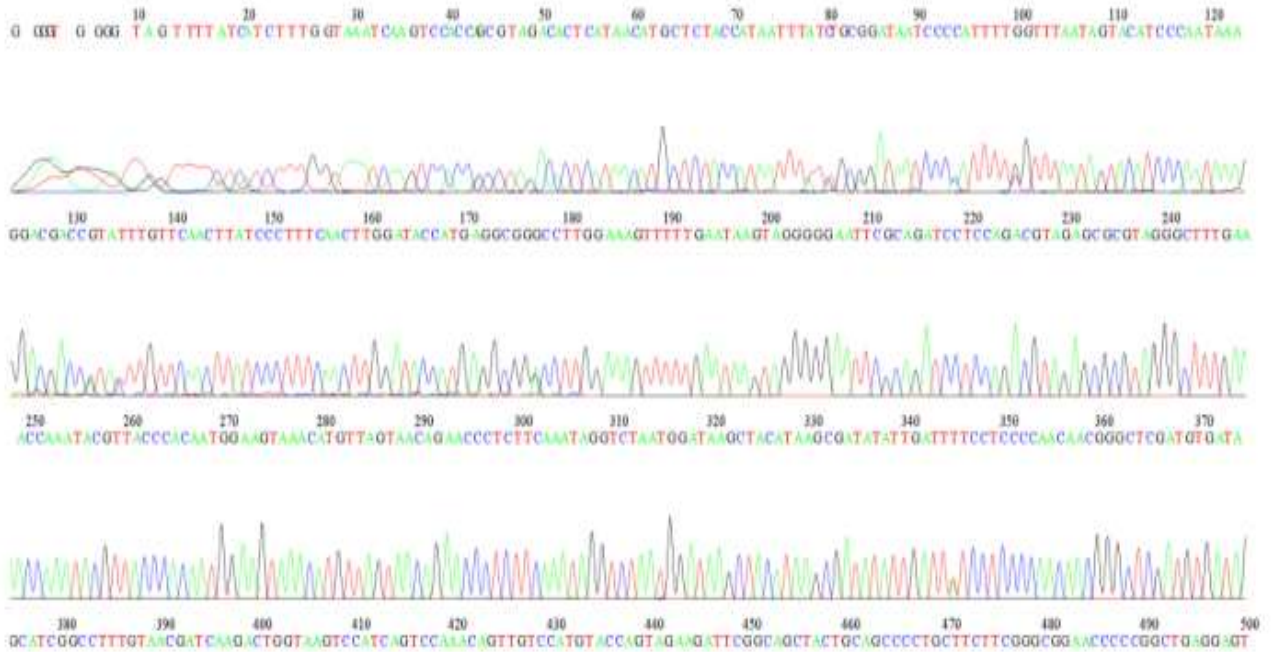


Figura 31. Eletroferograma do sequenciamento da madeira de cerne de seru

Após o sequenciamento com os primers Forward e Reverse ter sido realizado, foram gerados os segmentos contínuos de DNA (contigs) pelo programa CLC Genomics, além de ter sido construída a matriz de similaridade, a obtenção da região de consenso para verificar as diferenças entre as espécies.

A figura 32 mostra o alinhamento dos nucleotídeos para as espécies, confirmando que o gene *rbcL* é muito conservado, pois não houve muita variação entre as sequências, mesmo tratando-se de famílias diferentes. Dentre as espécies que mais apresentaram variação estão amarelão e seru. Tais variações são indicadas pelas bases dispostas ao longo da linha respectiva para cada família.

É importante mencionar que foi utilizada uma madeira teste, a que revelou maior variação de sequência, conforme ilustrado na figura 32. Essa espécie não foi revelada na presente pesquisa, pois a mesma está inserida no pedido de registro de processo junto ao NIT (Núcleo de Inovação Tecnológica) da UFRRJ.

Nesse alinhamento é possível verificar onde existe a possibilidade de desenhar uma sequência que possa ser utilizada como marcador para cada espécie, no entanto, foram encontradas semelhanças entre as espécies das diferentes famílias testadas não sendo possível diferenciá-las ao nível taxonômico de família. Todavia, diante do conhecimento dessas sequências existe a possibilidade de utilizá-las em testes para discriminar essas espécies de outras cujas características anatômicas da madeira sejam semelhantes e de difícil identificação.

Essa ínfima diferença entre as espécies foi confirmada pela matriz de similaridade obtida pelo programa CLC Genomics (Figura 33). A porção inferior ao traço demarcado na figura indica os níveis de similaridade e a porção superior, as diferenças, ou seja, essa matriz mostra uma comparação entre as amostras, nesse caso representadas por números de 1 a 10, comparando as informações dispostas em linhas com as que estão na coluna.

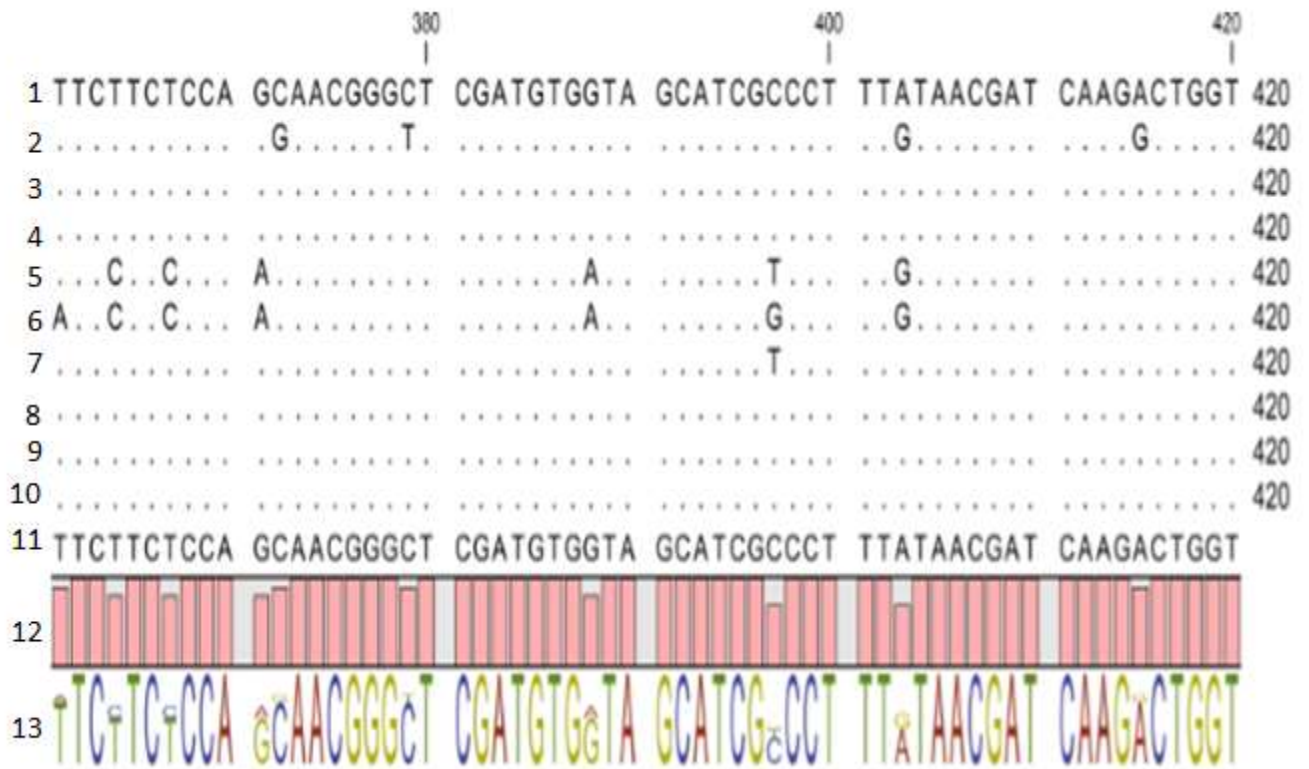


Figura 32. Alinhamento de nucleotídeos para as espécies testadas: 1- cerejeira (*Amburana acreana*), 2 – amarelão (*Aspidosperma vargasii*), 3 – Caju açu (*Anacardium giganteum*), 4 – Piquiarana (*Caryocar glabrum*), 5- seru (*Allantona lineata*), 6 – madeira teste, 7 – cumaru (*Dypterix odorata*), 8 – cedro (*Cedrela odorata*), 9 – araracanga (*Aspidosperma desmanthum*), 10 peroba – mica (*Aspidosperma macrocarpon*), 11 – sequência consenso, 12 – conservação, 13 – sequência logo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	100,00	44	0	0	69	66	20	0	0	0
2	93,03	100,00	44	44	74	74	42	44	44	44
3	100,00	93,03	100,00	0	69	66	20	0	0	0
4	100,00	93,03	100,00	100,00	69	66	20	0	0	0
5	89,06	88,27	89,06	89,06	100,00	11	64	69	69	69
6	89,54	88,27	89,54	89,54	98,26	100,00	63	66	66	66
7	96,83	93,34	96,83	96,83	89,86	90,02	100,00	20	20	20
8	100,00	93,03	100,00	100,00	89,06	89,54	96,83	100,00	0	0
9	100,00	93,03	100,00	100,00	89,06	89,54	96,83	100,00	100,00	0
10	100,00	93,03	100,00	100,00	89,06	89,54	96,83	100,00	100,00	100,00

Figura 33. Matriz de similaridade para o alinhamento de nucleotídeos para as madeiras de cerne de espécies testadas: 1- *Amburana acreana* (cerejeira), 2 – *Aspidosperma vargasii* (amarelão), 3 – *Anacardium giganteum* (caju açu), 4 – *Caryocar glabrum* (piquiarana), 5 – *Allantoma lineata* (seru), 6 – madeira teste, 7 – *Dipteryx odorata* (cumaru), 8 – *Cedrela odorata* (cedro), 9 – *Aspidosperma desmanthum* (araracanga), 10 – *Aspidosperma macrocarpon* (peroba-mica)





Logo, com base nos resultados encontrados nas figuras 32 e 33, é possível fazer uma discriminação entre as espécies estudadas com base nas sequências das espécies listadas na tabela 14. Diante dessa informação, confirma-se o que foi citado por Hebert; Gregory (2005), que mencionam que a identificação por *Barcode* é simples, não requer conhecimentos de taxonomia e está livre de erros subjetivos, como ocorrem na identificação morfológica, tornando possível a identificação de espécies desconhecidas.

Como exemplo do possível uso desses *Barcodes*, pode-se citar a discriminação entre espécies que apresentam madeiras com características anatômicas muito semelhantes, como a *Allantoma lineata* (seru) e a *Couratari sp.*(tauari), ambas espécies da família Lecythidaceae. Os resultados obtidos demonstram que a técnica do DNA *Barcode* é uma ferramenta que pode ser utilizada para o combate de extração ilegal de madeira, auxiliando à fiscalização florestal.

Esse resultado corrobora com o citado por Carvalho (2012): “a identificação molecular pode ser utilizada na Botânica Forense, tendo em vista que o corte ilegal e o tráfico de madeira de espécies protegidas necessitam de identificação rápida, a qual pode ser por DNA de madeiras já processadas, promovendo agilidade às punições dos responsáveis por madeiras ilegais”.

Outra aplicação dessa técnica está relacionada à certificação molecular, através da inserção de um código de barras, na própria madeira a ser consumida, com informações que a identifiquem, desde procedência até a sequência genética, agregando valor ao produto a ser comercializado. Como exemplo, a utilização da sequência *Barcode* para *Dipteryx odorata* (cumaru), espécie produtora de madeira de grande valor econômico e uso em diversas áreas, tanto na construção civil quanto para mobiliário de alta qualidade (NAHUZ, 2013). De uma forma geral, esta técnica pode ser aplicada tanto para fins de fiscalização quanto de certificação.

Tabela 14. Discriminação de sequências (Barcodes) dentre as espécies estudadas

Família	Espécie	Nome vulgar	Sequência	Barcode
Apocynaceae	<i>A. vargasii</i>	amarelão	TTCTTCTCCAGGAA CGGGTTCGATGTGG TAGCA	
Lecythidaceae	<i>Allantoma lineata</i>	seru	TCCTCCCCAACAAC GGGCTCGATGTGAT AGCAT	
Fabaceae	<i>Dipteryx odorata</i>	cumarú	GCATCGTCCTTTATA ACGATCAAGACTGG TAAG	
Madeira teste	Madeira teste	Madeira teste	ATCCTCCCCAACAA CGGGCTCGATGTGAT AGCA	

Já para as demais espécies não houve diferença entre as sequências, ainda assim vale a pena destacá-las (Tabela 15) pelas seguintes razões:

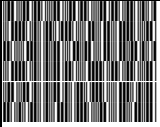


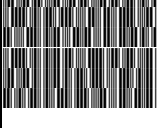
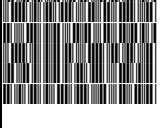

- i) ainda não foram citadas na literatura as sequências do DNA das espécies estudadas;
- ii) essas sequências podem ser citadas como *Barcodes*, principalmente para situações em que houver dificuldade para diferenciar as madeiras dessas espécies com outras de características anatômicas semelhantes.

A ausência de variação para as diferentes espécies (Tabela 15) pode ser explicada pelo gene escolhido como marcador, *rbcL*, que apesar de ser citado como um *Barcode* universal para plantas, seu uso é dificultado quando se trata de variações morfológicas e/ou geográficas (ROY et al., 2010).

Esperava-se encontrar nesse estudo uma sequência discriminatória para todas as espécies testadas, como essa diferença não foi verificada com base na sequência de nucleotídeos, foi realizada a análise da sequência dos aminoácidos. Essa análise é mais conservada que a de nucleotídeos, isso porque algumas mutações podem alterar o códon, mas dificilmente alteram a proteína, visto que, para a maioria dos aminoácidos existe mais de um códon. Logo, pode ocorrer alteração da base de um códon, mas essa alteração não traduz em alteração do aminoácido e a proteína continua a mesma (MAUSETH, 2009).

Pode ser observado na figura 34 o alinhamento de aminoácidos para as espécies estudadas. Foram verificadas pequenas variações, confirmando o observado na sequência de nucleotídeos. Essa diminuição de variação, ao comparar a cadeia de nucleotídeos com a cadeia de aminoácidos, também ocorreu na pesquisa sobre o gene *rbcL* como *Barcode* para identificação forense de *Cannabis sativa* (RIBEIRO et al., 2013).

Tabela 15. Discriminação de sequências (Barcodes) de menor variação dentre as espécies estudadas

Família	Espécie	Nome vulgar	Sequência	Barcode
Fabaceae	<i>Amburana acreana</i>	cerejeira	TTCTTCTCCA GCAACGGGCT CGATGTGGTA GCATCGCCCT TTATAACGAT CAAGACTGGT	
Meliaceae	<i>Cedrela odorata</i>	cedro	TTCTTCTCCA GCAACGGGCT CGATGTGGTA GCATCGCCCT TTATAACGAT CAAGACTGGT	
Anacardiaceae	<i>Anacardium giganteum</i>	caju-açu	TTCTTCTCCA GCAACGGGCT CGATGTGGTA GCATCGCCCT TTATAACGAT CAAGACTGGT	
Apocynaceae	<i>Aspidosperma desmanthum</i>	araracanga	TTCTTCTCCA GCAACGGGCT CGATGTGGTA GCATCGCCCT TTATAACGAT CAAGACTGGT	
Apocynaceae	<i>Aspidosperma macrocarpon</i>	peroba-mica	TTCTTCTCCA GCAACGGGCT CGATGTGGTA GCATCGCCCT TTATAACGAT CAAGACTGGT	
Caryocaraceae	<i>Caryocar glabrum</i>	piquiarana	TTCTTCTCCA GCAACGGGCT CGATGTGGTA GCATCGCCCT TTATAACGAT CAAGACTGGT	

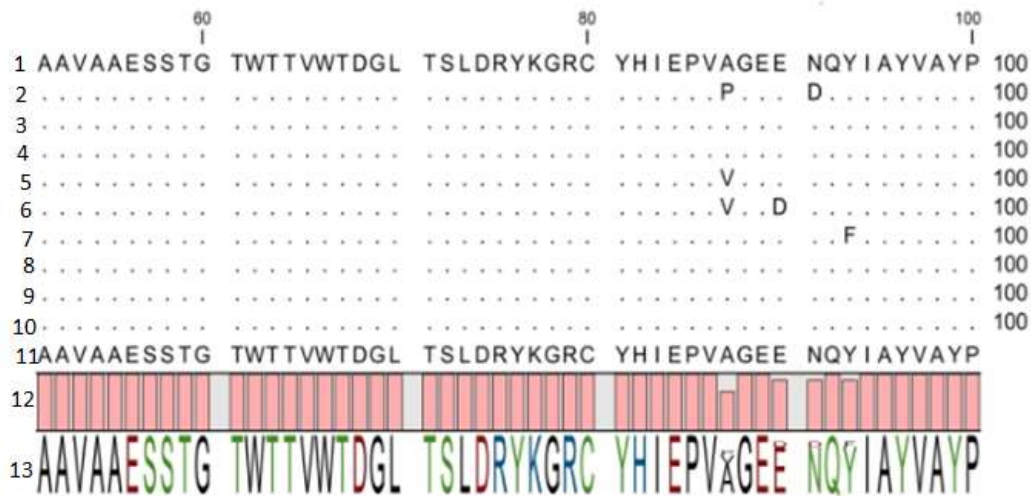


Figura 34. Alinhamento de aminoácidos para as madeiras de cerne das espécies estudadas: 1- cerejeira (*Amburana acreana*), 2 – amarelão (*Aspidosperma vargasii*), 3 – Caju açúcar (*Anacardium giganteum*), 4 – Piquiarana (*Caryocar glabrum*), 5- seru (*Allantoma lineata*), 6 – madeira teste, 7 – cumaru (*Dipteryx odorata*), 8 – cedro (*Cedrela odorata*), 9 – araracanga (*Aspidosperma desmanthum*), 10 peroba – mica (*Aspidosperma macrocarpon*), 11 – sequência consenso, 12 – conservação, 13 – sequência logo

A alta conservação das sequências de aminoácidos foi comprovada na matriz de similaridade (Figura 35), em que os valores encontrados para similaridade de aminoácidos são maiores que aqueles para nucleotídeos (Figura 33) e com isso, as variações para aminoácidos também foram baixas. A interpretação da figura 35 é a mesma que foi realizada para a figura 33, comparando as espécies, identificadas por números de 1 a 10, da linha com a coluna.

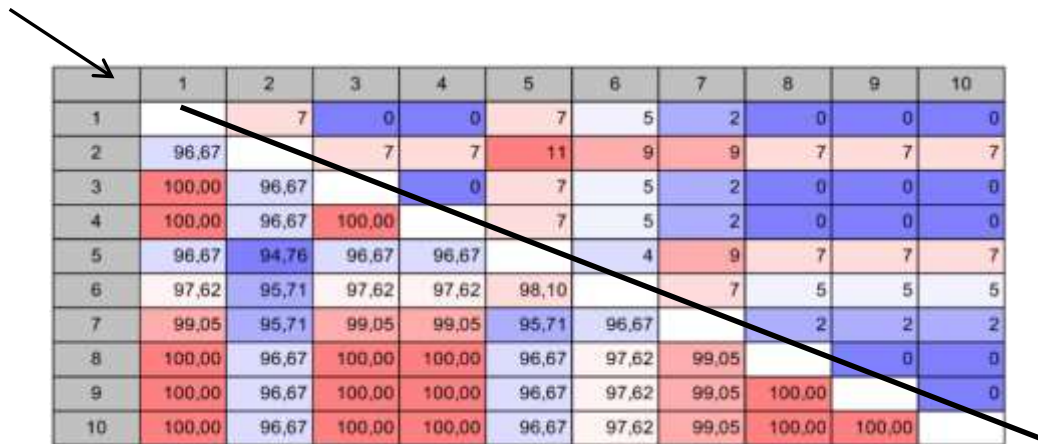


Figura 35. Matriz de similaridade para o alinhamento de aminoácidos para as espécies testadas: 1- *Amburana acreana* (cerejeira), 2 – *Aspidosperma vargasii* (amarelão), 3 – *Anacardium giganteum* (caju açúcar), 4 – *Caryocar glabrum* (piquiarana), 5 – *Allantoma lineata* (seru), 6 – madeira teste, 7 – *Dipteryx odorata* (cumaru), 8 – *Cedrela odorata* (cedro), 9 – *Aspidosperma desmanthum* (araracanga), 10 – *Aspidosperma macrocarpon* (peroba-mica)

Após a obtenção de todas as sequências foi criada a árvore filogenética das espécies estudadas (Figura 36) com o uso do programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

Conforme já constatado em análises anteriores, a árvore filogenética demonstra que não houve similaridade entre espécies da mesma família. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de ter sido estudado um único indivíduo de cada espécie obtido de diferentes procedências, o que pode influenciar nas sequências de material genético.

Para um trabalho de certificação florestal agregado à técnica de DNA *Barcode* sugere-se a extração, amplificação de DNA de madeira de um número considerável de indivíduos da mesma espécie. Para as espécies aqui estudadas a amplificação pode ser feita utilizando as sequências do DNA já identificadas como marcadores.

Entretanto, para os aspectos forenses de combate à extração ilegal da madeira, muitas das vezes a peça questionada é representada por apenas um indivíduo, situação esta que se tomou por base para a realização da presente pesquisa. O principal objetivo deste estudo foi verificar a possibilidade de extrair e sequenciar DNA, além de encontrar uma sequência de gene que pudesse ser utilizada como *Barcode* a partir de madeira do cerne seco de espécies comercializadas no Estado do Rio de Janeiro. Sendo assim, a árvore filogenética foi uma forma de ilustrar como as espécies testadas estão dispostas em relação umas as outras em termos de máxima verossimilhança em uma escala de 1%.

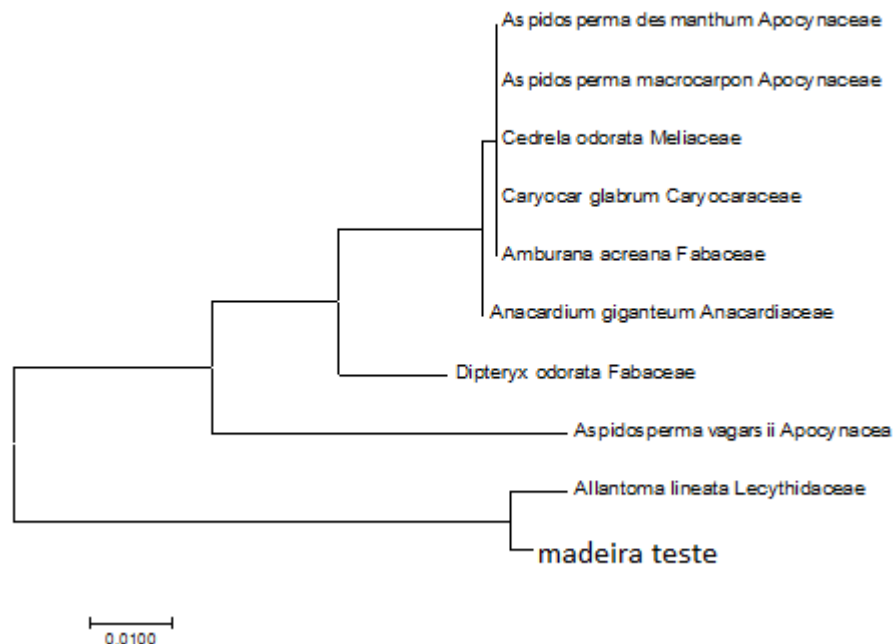


Figura 36. Árvore filogenética das espécies estudadas: *Amburana acoreana* (cerejeira), *Aspidosperma vargasii* (amarelão), *Anacardium giganteum* (caju açu), *Caryocar glabrum* (piquiarana), *Allantoma lineata* (seru), *Dipteryx odorata* (cumaru), *Cedrela odorata* (cedro), *Aspidosperma desmanthum* (araracanga), *Aspidosperma macrocarpon* (peroba-mica)

5 CONCLUSÃO

O protocolo 2 (kit Qiagen) é o mais recomendado para extrair DNA de madeira seca das espécies nativas testadas.

Apesar dos demais protocolos terem permitido obter concentrações de DNA acima de 200ng/μL, ficou provado que a pureza da amostra é mais importante que a quantidade obtida.

O protocolo adotado para amplificar o DNA das amostras, com a enzima Taq polimerase Platinum, garantiu uma boa amplificação de todas as espécies.

Foram encontradas sequências *Barcodes* para as espécies *Aspidosperma vagarsii* (amarelão), *Allantoma lineata* (seru) e *Dipteryx odorata* (cumaru).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT NBR 14790. **Manejo florestal sustentável – Cadeia de custódia – Requisitos**. 2014.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*, 5th edition. New York: Garland Science, 1728p., 2007.
- ARAÚJO, P.A.M.; MATTOS FILHO, A. A importância da anatomia do lenho para a comercialização da madeira. **Rodriguésia**, ano XXXII, nº 53, 1980.
- ASIF, M.J., CANNON, C.H. DNA extraction from processed wood: a case study for the identification of an endangered timber species (*Gonostylus bancanus*). **Plant Molecular Biology Report**, n. 23, p. 185 – 192, 2005.
- ASPEBORG, H.; SCHRADER, J.; COUTINHO, P.M.; *et al.*, Carbohydrateactive enzymes involved in the secondary cell wall biogenesis in hybrid aspen. **Plant Physiology**, n.137, p. 983–997, 2005.
- AVANCINI, M. Extração ilegal de madeira - Alta lucratividade dificulta repressão desse crime. **Revista Pré-Univesp**. 2014. Disponível em <http://pre.univesp.br/extracao-ilegal-de-madeira#.VIDBj7_6KXc> Acesso em: 21.11.2015.
- AZEVEDO, V.C.R.; KANASHIRO, M.; GRATTAPAGLIA, D.; CIAMPI, A.Y. Variabilidade no cpDNA em *Manilkara huberi*, espécie sob manejo sustentável na Amazônia brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.7, p.859-867, 2008.
- BAMBER, R.K. Heartwood, its function and formation. **Wood Science and Technology**, n.10, p.1 – 8, 1976.
- BENITES, P.K.R.M.; GOUVEA, A.F.G.; CARVALHO, A.M.M.L.; SILVA, F.C. Caracterização anatômica da fibra de oito espécies florestais do Cerrado de Mato Grosso do Sul para a produção de papel. **Ciência da Madeira (Brazilian Journal of Wood Science)**, v.6, n.2, p. 88-93, 2015.
- BIROL, I.; RAYMOND, A.; JACKMAN, S.D.; *et al.*, Assembling the 20 Gb white spruce (*Picea glauca*) genome from whole-genome shotgun sequencing data. **Bioinformatics**, n. 29, p.1492–1497, 2013.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review Plant Biology**, v.54, p. 519-546, 2003.
- BRAGATTO, J. **Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene *ugdh* de soja, que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 73p., 2007.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1.367p., 2000.

- BURGER, M. L.; RICHTER, H. G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel. 154p., 1991.
- CARLQUIST, S. **Comparative wood anatomy: systematic, ecological, and evolutionary aspects of dicotyledon wood**. Springer, Berlin, 385p.,2001.
- CARNEIRO, M.S. A construção social do mercado de madeiras certificadas na Amazônia brasileira: a atuação das ONGs ambientalistas e das empresas pioneiras. **Sociedade e Estado**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 681-713. set./dez. 2007.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.
- CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.3, p.735-744, 2010.
- CARVALHO, B.A. **DNA e a perícia ambiental criminal**. In: TOCHETTO, D (Coord.). **Perícia ambiental criminal**. Campinas, SP: Millennium Editora, p. 237-250, 2012.
- CBoL Plant Working Group. A DNA *Barcode* for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.106, p. 12794–12797, 2009.
- CHAFFEY, N. Cambium: old challenges – new opportunities. **Trees**, v.13, p. 138 – 151, 1999.
- CHASE, M.W.; SALAMIN, N.; WILKINSON, M.; DUNWELL, J.M.; KESANAKURTHI, R.P.; HAIDAR, N.; SAVOLAINEN, V. Land plants and DNA *Barcodes*: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, v. 29; n. 360, p. 1889–1895, 2005.
- CHEN H.; XUE L.; CHINTAMANANI S.; GERMAIN H.; LIN H.; CUI H.; et al. ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.21, p. 2527–2540, 2009.
- CHEN, J.; CHEN, B.; ZHANG, D. Transcript profiling of *Populus tomentosa* genes in normal, tension, and opposite wood by RNA-seq. **BMC Genomics**, v.16, p.164, 2015.
- CHENG, F.S.; BROWN, S.K.; WEEDEN, N.F. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. **HortScience**, v. 32, n. 5, p. 921-922, 1997.
- COLEY, P.D.; BARONE, J.A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 27, p. 305–335, 1996.

COSTA, M.O. **Caracterização anatômica e colorimétrica de espécies madeiras comercializadas como “IPÊ” no Estado do Pará.** In: Congresso Nacional de Botânica, 55, 2004, Anais, Viçosa – MG: UFV, CD-Rom.

COUTINHO, G.; VARGAS, I. Consumo de madeira no Estado do Rio. **Carta da Indústria**, ano XIII, edição 609, p.2, 2013.

DE VERE, N.; RICH, T.C.G.; FORD, C.R.; TRINDER, S.A.; LONG, C.; et al., DNA Barcoding the Native Flowering Plants and Conifers of Wales. **PLoS ONE**, v.7, n. 6, 2012.

DEGUILLOUX, M.F.; PEMONGE, M.H.; PETIT, R.J. Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. **Proceedings of the Royal Society: London**, v. 269, p. 1039-1046, 2002.

DELMER, D.P. Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult Field os study. **Annual Review of Plant Physiology and Planta Molecular Biology**. Palo Alto, v.50, p.245-276, 1999.

DEMASURE, B.; SODZI, N.; PETITI, R.J. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. **Molecular Ecology**, v.4, n.1, p.129-131, 1995.

DHARMAWARDHANA, P.; BRUNNER, A.M.; STRAUSS, S.H. Genome-wide transcriptome analysis of the transition from primary to secondary stem development in *Populus trichocarpa*. **BMC Genomics**, v.11, n. 150, 2010.

DONG, W.; XU, C.; LI, C.; SUN, J.; ZUO, Y.; SHI, S.; CHENG, T.; GUO, J.; ZHOU, S. *ycf1* , the most promising plastid DNA barcode of land plants. **Scientific Reports**, v.5, 2015.

DOYLE, J.J.T. E DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v.12, p.13-15, 1990.

ESPINOZA, J.A.; HODGE, G.R.; DVORAK, W.S. The potential use of near infrared spectroscopy to discriminate between different pine species and their hybrids. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, n.20, p.437–447, 2012.

FONSECA, A.; JUSTINO, M.; SOUZA JR., C.; VERÍSSIMO, A. **Boletim do desmatamento da Amazônia Legal (outubro de 2015) SAD.** IMAZON. Disponível em <http://imazon.org.br/PDFimazon/Portugues/transparencia_florestal/amazonia_legal/SAD%20outubro%202015.pdf> Acesso em: 21.11.2015.

FRANCO, L.M.L. A certificação de cadeia de custódia FSC no setor industrial gráfico brasileiro: um estudo de caso no Estado do Rio de Janeiro. **Inovação Ambiental**, 2013.

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

- GONZALEZ, M.A.; BARALOTO, C.; ENGEL, J.; MORI, S.A.; PE' TRONELLI, P.; et al., Identification of Amazonian Trees with DNA *Barcodes*. **PLoS ONE**, v.4, n. 10, e7483, 2009.
- GUO H.; ECKER J. R. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF^{EBF1/EBF2}-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. **Cell** , v.115, p. 667–677, 2003.
- HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA *Barcodes* . **Proceedings of the Royal Society – Biological Sciences**, v.270, p. 313-321, 2003.
- HEBERT, P.D.; GREGORY, T.R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic Biology**. v. 54, p. 852-859, 2005.
- HIGUCHI, T. **Biochemistry and Molecular Biology of Wood**. Springer, Berlin Heidelberg New York, 374p., 1997.
- INSTITUTO DE MANEJO E CERTIFICAÇÃO FLORESTAL E AGRÍCOLA – IMAFLORA. **Manual de certificação de cadeia de custódia no sistema do Forest Stewardship Council - FSC**. Piracicaba: 50 p., 2002.
- JANUARIO, B.B. **Aplicação de códigos de barras de dna (DNA BARCODING) na identificação das espécies de *Senna mill.* (Fabaceae) e *Casearia jacq.* (Salicaceae) para estudos de variabilidade genética**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 71p., 2014.
- JIAO, L.; YIN, Y.; XIAO, F.; SUN, Q.; SONG, K.; JIANG, X. Comparative analysis of two dna extraction protocols from fresh and dried wood of *Cunninghamia lanceolata* (Taxodiaceae). **IAWA Journal**, v. 33, n. 4, p. 441–456, 2012.
- 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, p.487 – 494. 2013.
- JIAO, L.; LIU, X.; JIANG, X.; YIN, Y. Extraction and amplification of DNA from aged and archaeological *Populus euphratica* wood for species identification. **Holzforschung**. ISSN (Online) 1437-434X, ISSN (Print) 0018-3830, DOI: 10.1515/hf-2014-0224, January 2015.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. and DONOGHUE, M. J. Plant Systematics: a phylogenetic. **Systematic Biology**, v.53, n.3, p.517-518, 2002.
- JUVENAL, T.L.; MATTOS, R.L.G. **O setor florestal no brasil e a importância do reflorestamento**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 16, p. 3-30, 2002.

KAO, Y.Y.; HARDING, S.A.; TSAI, C.J. Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. **Plant Physiology**, v.130, p.796-807, 2002.

KLOCK, U. et al., **Química da Madeira**. 2005. 3ª edição. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

KLOCK, U. **Química da Madeira: Madeira - material heterogêneo**. 2012. Disponível em <www.madeira.ufpr.br/disciplinasklock/quimicadamadeira/madeiraheterogenea2012.pdf> Acesso em 29.05.2016.

KOCH, G.; HAAG, V.; HEINZ, I.; RICHTER, H.G.; SCHMITT, U. Control of Internationally Traded Timber - The Role of Macroscopic and Microscopic Wood Identification against Illegal Logging. **Journal of Forensic Research**, v. 6, p. 317, 2015.

KRESS, W.J.; ERICKSON, D.L. A Two-Locus Global DNA *Barcode* for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. **PLoS ONE**, v.2, n.6, p. 508, 2007.

KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false positive with PCR. **Nature**, v. 339, p. 237–238, 1989.

LAHAYE, R.; VAN DER BANK, M.; BOGARIN, D.; WARNER, J.; PUPULIN, F., GIGOT, G.; MAURIN, O DUTHOIT, S.; BARRACLOUGH, T.G.; SAVOLAINEN, V. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 105, p. 2923–2928, 2008.

LEE, A. B.; COOPER, T. A. Improved direct PCR screen for bacterial colonies: wooden toothpicks inhibit PCR amplification. **Biotechniques**, v.18, p.225–226, 1995.

LEROUXEL, O.; CAVALIER, D.M.; LIEPMAN, A.H.; KEEGSTRA, K. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides — a complex process. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 6, p. 621-630, 2006.

LI, F.; FAN, G.; LU, C.; XIAO, G.; et al., Genome sequence of cultivated Upland cotton (*Gossypium hirsutum* TM-1) provides insights into genome evolution. **Nature Biotechnology**, 2015.

LI, S.B.; XIE, Z.Z.; HU, C.G.; ZHANG, J.Z. A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 47, 2016.

LIANG, X.; DRON, M.; CRAMER, C.L.; DIXON, R.A.; LAMB, C.J. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 14486-14492, 1989.

LIRA, J.N.; NASCIMENTO, C.C.; DE PAULA, E.V.C.M. **Avaliação da densidade básica da madeira do cerne e alburno de oito espécies de madeira**. XVIII Jornada de Iniciação Científica PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA, Manaus, 2009.

LODHI, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F. REISCH, B.I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.12, p. 6-13, 1994.

LOWE, A. **Can we use DNA to identify the geographic origin of tropical timber?** Proceeding of the International Workshop “Fingerprinting methods for the identification of timber origins”. Bonn, Germany, p. 15-19, 2008.

LU, F.; ROMAY, M.C.; GLAUBITZ, J.C.; BRADBURY, P.J.; ELSHIRE, R.J.; WANG, T.; LI, Y.; LI, Y.; SEMAGN, K.; ZHANG, X.; HERNANDEZ, A.G.; MIKEL, M.A.; SOIFER, I.; BARAD, O.; BUCKLER, E.S. High-resolution genetic mapping of maize pan-genome sequence anchors. **Nature Communications**, v.6, n. 6914, 2015.

LUZ, M.C.P.N. FSC e Cerflor, trocando em miúdos. **Revista Tecnologia Gráfica**. Ed. 74, 2010.

MATSUMOTO-KITANO, M.; KUSUMOTO, T.; TARKOWSKI, P.; KINOSHITA-TSUJIMURA, K.; VACLAVIKOVA, K.; MIYAWAKI, K.; KAKIMOTO, T. Cytokinins are central regulators of cambial activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, n. 105, p. 20027–20031, 2008.

MAUSETH, J.D. **Botany: an introduction to plant biology**. Fourth edition. University of Texas, Austin, 672p. 2009.

MAZZA, M.C.M.; BITTENCOURT, J.V.M. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 41, p. 12-17, 2000.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. PORTARIA MMA Nº 253, DE 18 DE AGOSTO DE 2006.

MIR, L. et al., **Genômica**. São Paulo: Editora Atheneu, 1114p., 2004.

MYBURG, A.A.; GRATTAPAGLIA, D.; TUSKAN, G.A., et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, n. 510, p.356-362, 2014.

NAHUZ, A.R. **Catálogo de madeiras brasileiras para a construção civil**. São Paulo: IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, 103p., 2013.

NARDELLI, A. M. B.; TOMÉ, M. V. D. F. Efeito multiplicador dos benefícios da certificação florestal. **Revista Floresta**, Edição especial, p. 94-98, 2002.

NEUHAUS, H; LINK, G. The chloroplast tRNA (UUU) gene from mustard (*Sinapsis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase related polypeptide. **Current Genetics**, v.11, p. 251–257, 1987.

NEWMASER, S.G.; FAZEKAS, A.J.; STEEVES, R.A.D.; JANOVEC, J. Testing candidate plant *Barcode* regions in the Myristicaceae. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p. 480–490, 2008.

NITHANIYAL, S., NEWMASER, S. G., RAGUPATHY, S., KRISHNAMOORTHY, D., VASSOU, S. L., PARANI, M. DNA *Barcode* Authentication of Wood Samples of Threatened and Commercial Timber Trees within the Tropical Dry Evergreen Forest of India. **PLoS ONE**, v.9, n.9, e107669. doi:10.1371/journal.pone.0107669., 2014.

NODA, R. W. **Bioinformática: formação acadêmica e plataformas com softwares e ferramentas** / Roberto Willians Noda. Sete Lagoas:Embrapa Milho e Sorgo, 20 p. (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 109), 2010.

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**, n.8, v.1, p. 86-96, 2009.

NYSTEDT, B.; STREET, N.R.; WETTERBOM, A.; *et al.*, The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. **Nature**, v. 497, p.579–584, 2013.

OLIVEIRA, M.C.S.; REGITANO, L.C.A.; ROESE, A.D.; *et al.* **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia de polimerase**. São Carlos, EMBRAPA Pecuária Sudeste, 2007.

OLIVEIRA, A.A.; SIQUEIRA, P.H.; NISGOSKI, S.; BOLZON DE MUNIZ, G.I.; FERREIRA, J.H. Identificação de madeiras utilizando espectrometria no infravermelho próximo e redes neurais artificiais. **Tendências em Matemática Aplicada e Computacional**, v.16, n. 2, p. 81-95, 2015.

PAINEL FLORESTAL. **Estado do Rio de Janeiro está em busca de novas florestas para suas indústrias**. 2013. Disponível em <<http://www.painelflorestal.com.br/noticias/estado-do-rio-de-janeiro-esta-em-busca-de-novas-florestas-para-suas-industrias>> Acesso: 09.06.2015.

PALMER, J.D. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. **The American Naturalist**, v.130,n.1-2, p.6–29, 1987.

PARMENTIER, I.; DUMINIL, J.; KUZMINA, M.; PHILIPPE, M.; THOMAS, D.W.; KENFACK, D.; CHUYONG, G.B.; CRUAUD, C.; HARDY, O.J. How effective are DNA *Barcodes* in the identification of African Rainforest Trees? **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, e54921, 2013.

PAVY, N.; BOYLE, B.; NELSON, C.; PAULE, C.; GIGUÉRE, I.; CARON, S.; PARSONS, L.S.; DALLAIRE, N.; BEDON, F.; BÉRUBÉ, H.; COOKE, J.; MACKAY, J. Identification of conserved core xylem gene sets: conifer cDNA microarray development, transcript profiling and computational analyses. **New Phytologist**, v. 180, p. 766–786, 2008.

PEREIRA, R.P.W.; MONTEIRO, M.B.O.; ABREU, H.S.; LELIS, R.C.C. Sistemas de diferenciação vascular em plantas. **Revista Floresta e Ambiente**, v. 10, n.1, p.106 - 115, 2003.

PINO-NUNES, L.E. **Controle do desenvolvimento vegetal pela interação auxina-citocinina. Uma nova abordagem baseada no estudo de mutantes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom)**. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 140p., 2009.

PINTO, I.B. **Caracterização dos genes *matK* e *rbcL* e da variabilidade genética entre os acessos de araruta (*Maranta arundinacea* L.)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 58f., 2015.

PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood Formation in Trees. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1513–1523, 2001.

POLITI, M. Fiscalização nas florestas do País. **Gazeta Mercantil**. 2006.

RACHMAYANTI, Y., LEINEMANN, L., GAILING, O., FINKELDEY, R. Extraction, amplification and characterization of wood DNA from Dipterocarpaceae. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 24, p. 45 – 55, 2006.

RACHMAYANTI, Y. **Isolation of DNA from unprocessed and processed wood of Dipterocarpaceae**. Department of Forest Genetics and Forest Tree Breeding. Faculty of Forest Sciences and Forest Ecology. University of Göttingen, Alemanha, 2009.

RAWAT, A.; BARTHWAL, S.; GINWAL, H.S. Genomic DNA extraction from sapwood of *Pinus roxburghii* for polymerase chain reaction studies. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n.15, 1732-1735, , 2013.

REMADE. Setor Florestal - O desenvolvimento do setor florestal brasileiro. **REMADE**, n. 112, 2008.

REN, H.; LU, L.; WANG, H.; LI, D.Z. DNA barcoding of *Gaultheria* L. in China (Ericaceae: Vaccinioideae). **Journal of Systematics and Evolution**, n.49, v.5, p. 411–424, 2011.

REIS, A.R.S. Anatomia da madeira de quatro espécies de Aspidosperma Mart. & Zucc. Comercializadas no estado do Pará, Brasil. **Ciência da Madeira (Brazilian Journal of Wood Science)**, n.6, v.1, p. 47-62, 2015.

RIBEIRO, A.S.D; DIAS, V.H.G; MELLO, I.C.T; SILVA, R; SABINO, B.D; GARRIDO R.G; SELDIN, L; MOURA-NETO, R.S. O gene *rbcL* como *Barcode* para identificação forense de *Cannabis sativa*. **Saúde, Ética & Justiça**, n.18(Ed. Especial), p. 67-71, 2013.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de Plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 29 p. 40 - 43, 1998.

ROY, S.; TYAGI, A.; SHUKLA, V.; KUMAR A et al., Universal plant DNA *Barcode* loci may not work in complex groups: a case study with Indian berberis species. **PLoS One**, v. 5, n. e13674, 2010.

ROWELL, R.M.; PETTERSEN, R.; TSHABALALA, M.A. **Cell Wall Chemistry**. In: Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites. 2 ed. CRC Press. 703p. 2012.

RUFFINATTO, F.; CRIVELLARO, A.; WIEDENHOEFT, A.C. Review of macroscopic features for hardwood and softwood identification and a proposal for a new character list. **IAWA Journal**, v.36, n.2, p.208–241, 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Rapid isolation of yeast DNA**. In: **Molecular cloning, a laboratory manual** (Sambrook J and Russel DW, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 631-632, 2001.

SBS - SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. **Fatos e números do Brasil florestal**, 106p. 2006.

SHINOZAKI, K.; OHME, M.; TANAKA, M.; WAKASUGI, T.; HAYASHIDA, N.; MATSUBAYASHI, T.; ZAITA, N.; CHUNWONGSE, J.; OBOKATA, J.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; OHTO, C.; TORAZAWA, K.; MENG, BY.; SUGITA, M.; DENO, H.; KAMOGASHIRA, T.; YAMADA, K.; KUSUDA, J.; TAKAIWA, F.; KATO, A.; TOHDOH, N.; SHIMADA, H. e SUGIURA, M. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. **EMBO Journal**, v. 5, n.9, p. 2043–2049, 1986.

SILVA, L.A.G.C. **Certificação Florestal**. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados. 2005.

SOUZA, N.D.; ABREU, H.S.; MONTEIRO, M.B.O.; PEREIRA, R.P.W.; MAEDA, J.M.; RECK, I.S. Proposta de análise metabolômica com RMN ¹³C da madeira do híbrido *Eucalyptus urograndis*. **Floresta e Ambiente**, v.15, n.1, p. 49 - 61, 2008.

SPATHELF, P.; MATTOS, P.P.; BOTOSSO, P.C. Certificação Florestal no Brasil – uma ferramenta eficaz para a conservação das florestas naturais? **FLORESTA**, v. 34, n.3, p. 373-379, 2004.

STOECKLE, M.Y.; GAMBLE, C.C.; KIRPEKAR, R.; YOUNG,G.;AHMED, S.; LITTLE, D.P. Commercial teas highlight plant DNA barcoding successes and challenges. **Scientific Reports**, v. 1, p. n.42, p.7, 2011.

SUITER FILHO, W. **A Certificação florestal e o FSC no Brasil.** In: Seminário Certificação Florestal e Movimentos Sociais na Amazônia, 1, 2002, Belém. Anais. Belém: GTNA; Fase Nacional; IMAZON, p. 7 – 9, 2002.

SUZUKI, S.; LI, L.; SUN, Y.H.; CHIANG, V.L. The cellulose synthase gene superfamily and biochemical functions of xylem-specific cellulose synthase-like genes in *Populus trichocarpa*. **Plant Physiology**, v.142, p. 1233–1245, 2006.

SWETHA, V.P.; PARVATHY, V.A.; SHEEJA, T.E.; SASIKUMAR, B. Isolation and amplification of genomic DNA from barks of *Cinnamomum* spp. **Turkish Journal of Biology**, v.38, p. 151-155, 2014.

TANI, N.; TSUMURA, Y.; SATO, H. Nuclear gene sequences and DNA variation of *Cryptomeria japonica* samples from the postglacial period. **Molecular Ecology**, v.12, n. 4, p.859-868, 2003.

TECHNICAL BULLETIN. **Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios.** Thermo Scientific NanoDrop Products, T123– Rev 1/2012.

TUSKAN, G.A.; DIFAZIO, S.; JANSSON, S.; et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). **Science**, v. 313, p.1596–1604, 2006.

TSUCHIKAWA, S.; KOBORI, H. A review of recent application of near infrared spectroscopy to wood science and technology. **Journal of Wood Science**, n.61, p. 213-220, 2015.

VARUZZA, L. **Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração Versão 2.0.1.** 2013. Disponível em <http://lvaruzza.com/files/apostila_bioinfo_2.0.1.pdf> Acesso: em 23.04.2015.

VASCONCELOS, T.S. **Caracterização molecular, expressão gênica e atividade enzimática tecido-específicas das proteínas PAL e CAD durante a formação de madeira em *Tectona grandis* L.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 77p., 2012.

VERBYLAITÉ, R.; BEYSIS, P.; KUUSIÉNE, S. Comparison of ten DNA extraction protocols from wood of european Aspen (*Populus tremula* L.). **Baltic Forestry**, v.16, n1, p. 35-42, 2010.

VINOD, K.K. **Total genomic DNA extraction, quality check and quantitation.** In: Proceedings of the training programme on Classical and modern plant breeding techniques – A hands on training, 109 – 121p, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India, 2004.

WANG, M.; QI, X.; ZHAO, S.; ZHANG, S.; LU, M.Z. Dynamic changes in transcripts during regeneration of the secondary vascular system in *Populus tomentosa* Carr. revealed by cDNA microarrays. **BMC Genomics**, v.10, 215, 2009.

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

- WILFINGER, W.W.; MACKEY, K.; CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. **Biotechniques**, v.22, p.474–481, 1997.
- WICKER, T. et al., 454 sequencing put to the test using the complex genome of barley. **BMC genomics**, v.7, p.275, 2006.
- WILKINS, O.; NAHAL, H.; FOONG, J.; PROVART, N.J.; CAMPBELL, M.M. Expansion and diversification of the *Populus* R2R3-MYB family of transcription factors. **Plant Physiology**, v.149, p. 981–993, 2009.
- YANG, H., GOLENBERG, E.M., SHOSHANI, J. Proboscidean DNA from museum and fossil specimens: an assessment of ancient DNA extraction and amplification techniques. **Biochemical Genetics**, v. 35, p.165 – 179, 1997.
- YE, Z.H.; ZHONG, R. Molecular control of wood formation in trees. **Journal of Experimental Botany - Review Paper**, 13p., 2015.
- YU, J.; XUE, J.H.; ZHOU, S.L . New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 49, n.3, p.176–181, 2011.
- YU, M.; ZHANG, H.; JIN, Q.; LIU, S. Wood identification of *Dalbergia odorifera* T. Chen based on DNA barcoding sequences. Identification of Tember Species and Origins, **Regional Workshop for Asia, Pacific & Oceania**, 20-21 August 2013, Beijing, China. Disponível em <http://www.globaltimbertrackingnetwork.org/fileadmin/templates/globaltimbertrackingnetwork.org/upload/Regional_Workshop_for_Asia_Pacific_Oceania/Shengquan_Liu.pdf> Acesso em: 21.10.2014.
- ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v.21, n. 6, 1998.
- ZENID, G.J.; NAHUZ, M.A.R.; MIRANDA, M.J.A.C.; FERREIRA, O.P.; BRAZOLIN, S. **Madeira: uso sustentável na construção civil**. Geraldo José Zenid - Coordenador. 2. ed.São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas:SVMA,103p. 2009.
- 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.
- ZURAWSKI, G.; PERROT, B.; BOTTOMLEY, W.; WHITEFIELD, P.R. The structure of the gene for the large subunit of ribulose-1,5 -bisphosphate carboxylase from spinach chloroplast DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 9, n.14, p. 3251–3270, 1981.