

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ
Instituto de Biologia
Departamento de Genética

Análise da diversidade genética de populações de *Araucaria
angustifolia* (Bertol.) Kuntze utilizando marcador AFLP

Maria Isabel Ferreira de Souza

Dissertação submetida ao curso
de Pós-Graduação em Genética
da Universidade Federal do Rio
de Janeiro como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas
(Genética).

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
Março, 2006

**“Análise da diversidade genética de populações de *Araucaria angustifolia*
(Bertol.) Kuntze utilizando marcador AFLP”**

MARIA ISABEL FERREIRA DE SOUZA

Orientador: Dr. Márcio Alves Ferreira

Co-orientador: Dr. Rogério Margis

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética), Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Aprovada por:

Dr. Antônio Mateo Sole-Cava / UFRJ

Dr. Dario Grattapaglia / EMBRAPA-Brasília

Dra. Tânia Wendt / UFRJ

Dr. Carlos Augusto Gomes Soares / UFRJ (Suplente)

Dra. Mônica Aires Cardoso / Instituto de Pesquisa Jardim Botânico (Suplente)

Rio de Janeiro

Março/2006.

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Maria Isabel Ferreira

Análise da diversidade genética de populações de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze utilizando marcador AFLP. – Rio de Janeiro, 2006.

xiv, 97 p.

Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia,
Departamento de Genética

1. *Araucaria angustifolia*

2. AFLP

3. Diversidade genética

4. Estruturação genética

AGRADECIMENTOS

A minha família, por todo apoio, compreensão, paciência, amizade e amor. Em especial um agradecimento aos meus pais e ao meu irmão por serem a melhor família do mundo, por me escutarem nos meus momentos de estresse, por confiarem em mim e em todo meu esforço, por me amarem do jeito que eu sou, com os meus erros e acertos.

Um obrigado a meus primos Felipe, Francine, Mila e Ana Paula pelas piadas e risadas no período da redação da minha dissertação. Vocês foram extremamente importantes para eu manter a minha sanidade mental.

Ao Zezito, meu amigo, meu namorado, minha “soul mate”, por todos os momentos em que você me entendeu, apoiou e ficou do meu lado enquanto eu trabalhava nas longas madrugadas de dezembro e janeiro. Muito obrigado por tudo, te amo muito! Você foi e é realmente extremamente importante pra mim e é meu porto seguro.

Ao Prof. Márcio Alves Ferreira, por me orientar, pela oportunidade de trabalhar com ele, por toda confiança depositada em mim, pelos conselhos, puxões de orelha enfim, muito obrigado!

Ao Prof. Rogério Margis pelas dicas, pelas discussões regadas a cerveja, por me acolher no Rio Grande do Sul para que eu pudesse realizar meu trabalho, meu muitíssimo obrigado.

A Prof. Márcia Margis pelas conversas, risadas, dicas, confiança e por me acolher no Rio Grande do Sul para que eu pudesse realizar meu trabalho.

Aos professores do Laboratório de Genética Molecular Vegetal, Gilberto Sachetto e Maité Vaslin, por todas as dicas que me foram dadas durante esses longos 2 anos de mestrado.

Aos colegas da sala 74, Lina, Mariana e Fabiano. Um agradecimento em especial para os três que trabalharam diretamente comigo, que contribuíram para o rendimento deste trabalho, que foram além de colegas de trabalho, amigos para toda vida. Guardo vocês três dentro do meu coração e espero poder contar com vocês pro resto da minha vida. Obrigada pelas risadas, pelos conselhos, pelas ajudas na bancada, pelas conversas sem sentindo, enfim por vocês terem sido tão participativos na minha formação. E também ao Rodrigo, não poderia deixar de citar, você e suas piadas nunca serão esquecidos.

Aos colegas da sala 66, Adrianinha, Emília e Vinícius, obrigada pelos toques, risadas, conselhos e simplesmente por me ouvirem sempre que eu precisei.

Aos colegas da sala 93, Régis, Anna, Felipe, Tatiane, Fernanda, Adriana e Diana por todos as dicas, trocas de informação, pelas conversas da hora do almoço e pelos conselhos para a dissertação. E em especial para Élisson e Aline. Meu muitíssimo obrigado pros dois que me aturaram, me escutaram reclamar quando meu trabalho não ia pra frente, que me fizeram rir nas nossas longas “reuniões laboratoriais” no Msn, pelo Congresso de Genética que foi divertidíssimo, enfim, meninos, vocês estão no meu coração.

Aos técnicos e secretária do LGMV, Fátima, Luis, Itamar e Kelly. Acreditem, meu trabalho não teria saído sem a participação direta de vocês.

Ao Anderson, do Laboratório de Biodiversidade Molecular, por me ajudar a desvendar os mistérios do programa Arlequin.

A Juliana Bittencourt (UFPR), pelas coletas das amostras de araucária no município de Manguueirinha, ao professor Giancarlo Pasquale (UFRGS) por abrir as portas do laboratório dele pra que eu pudesse realizar meu trabalho, muitíssimo obrigada.

A secretária da Pós-Graduação, Eliane, pelo ótimo humor, por todo carinho e por sempre ser tão prestativa quando mais precisei.

A meus grandes amigos da turma 00/1 os quais foram especiais na minha formação na graduação e não deixaram de ser participativos na minha formação como mestre. Meu muitíssimo obrigado a: Mauricio, Bruno Rosado, Bruno Graffino, Bruna, Thais, Tatiana Farias, Paula, Elisa, Lisieux, Úrsula, Lula, Peônia, Tamara, ah muita gente.

Aos amigos que fiz na faculdade, principalmente, ao Carlos Eduardo e Camila meu abraço amigo e obrigada.

Aos meus amigos de infância por me entenderem quando eu sumia de uma hora pra outra pois estava enrolada com a dissertação: Luciana, Dani, Cristina, André, Ana Luiza, Lígia e Aline.

As minhas mais novas amigas, que além de ótimas pessoas, participaram desse meu processo, me apoiando de inúmeras formas: as f-sisters (Lílian, Rejane, Manoela, Juliana, Karol, Débora, Leila e Laura), Julia, Simone, Pâmela, Eliana, Carol, Nagaissa e Layza. E ao meu amigo Rodrigo, por acreditar em mim, confiar em mim, ser essa pessoa incrivelmente cativante e que eu pretendo levar pro resto da minha vida.

E por fim, as meninas lá da UFRGS, Dani e Andréa, por simplesmente serem o máximo.

RESUMO

A espécie *Araucaria angustifolia*, também conhecida como pinheiro-brasileiro, ocorre principalmente nos três estados mais ao sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) e em manchas esparsas em São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro e ocorre na Província de Misiones, na Argentina. *A. angustifolia* é uma espécie dióica. Sua dispersão de pólen é mediada pela ação do vento e a dispersão de sementes ocorre pela ação da gravidade. Por possuir uma madeira de alta qualidade, foi altamente explorada, nas décadas de 50 a 70. Estima-se que restam cerca de 1 a 5% da área original das florestas de araucária, sendo classificada como espécie da categoria vulnerável (IUCN). Portanto, estudos que visam o entendimento da estrutura populacional e diversidade genética da araucária são extremamente importantes para que mecanismos de gerenciamento sustentável e conservação sejam desenvolvidos. Nesta dissertação, os níveis, organização e dinâmica da diversidade genética dentro e entre 5 populações de *A. angustifolia* foram analisadas, com o emprego de marcadores AFLP. Verificou-se que a maior parte da diversidade genética está presente dentro de cada população ($F_{st} = 0,15$ e $\Phi_{st} = 0,19$). Ainda, os níveis de heterozigosidade encontrados ($H_t = 0,20$) podem ser considerados intermediários indicando que a espécie mantém sua diversidade genética mesmo após ter sofrido intensa exploração humana. A respeito da correlação das distâncias genética e espacial verificou-se que indivíduos mais próximos entre si possuem cruzamento preferencial nas populações de Itatiaia (RJ) e São Francisco de Paula (RS). De forma geral, estes resultados estão de acordo com a biologia reprodutiva da espécie e com os obtidos para espécies relacionadas. E, conforme visto em outros trabalhos com a espécie, observou-se uma forte diferenciação genética entre as regiões sul e sudeste do Brasil a exceção de Itatiaia.

ABSTRACT

Araucaria angustifolia, also known as Brazil pine, occurs mainly in the three Brazilian's southernmost states (Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná) over a wide natural range. It can also spread throughout other states in Brazil such as Minas Gerais, São Paulo and Rio de Janeiro and also in the Province of Misiones, in Argentina. *A. angustifolia* is a dioecious wind-pollinated tree and its seeds are dispersed mainly by authocory. Its high quality wood led to an indiscriminate exploitation, mainly in the 1950 and 1970 decades. It is estimated that only about 1 to 5% of *A. angustifolia* natural range is still left which puts the species to the vulnerable category (IUCN). Therefore, it's important to develop strategies for conservation and sustainable management based on knowledge of population's structure. In this study, the levels and distribution patterns of genetic variation within and among five populations of Brazil pine were assessed using AFLP markers. The data analysis revealed that most of the genetic variation resides within populations ($F_{st} = 0.15$ and $\Phi_{st} = 0.19$). Which had intermediate levels of heterozigosity ($H_t = 0.20$). Even though the species' area of occurrence was drastically reduced it maintains its genetic diversity. A genetic structure within populations was observed in Itatiatia (RJ) and São Francisco de Paula (RS). The genetic distance between Individuals that are closer to each other is lower than the expected in a panmitic population. These results are in agreement with the reproductive biology characteritics of the species and are close to those found for related species. Also in agreement which what has been seen so far for the species, in this work it was observed a strong genetic differentiation among Brazil's south and southeast regions in spite of Itatiaia.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Histórico	1
1.2. A espécie <i>A. angustifolia</i>	3
1.2.1. A família Araucariaceae	3
1.2.2. Informações Gerais	6
1.2.3. Biologia Reprodutiva	7
1.2.4. Da distribuição	11
1.2.5. Importância Social	15
1.2.6. Importância Ecológica	16
1.2.7. Importância Econômica	17
1.3. Estudo de populações	21
1.3.1. Diversidade genética em espécies arbóreas	21
1.3.2. Fluxo gênico em plantas	23
1.4. Marcadores moleculares utilizados no estudo de populações	26
1.4.1. AFLP “Amplified Fragment Length Polymorfism”	28
2. Objetivo	31
3. Material e Métodos	32
3.1. Áreas de coleta	32
3.2. Coleta de material vegetal	40
3.3. Extração do DNA total	42
3.4. Quantificação do DNA	43
3.5. Reações de AFLP	44
3.6. Obtenção dos eletroferogramas e análises	46
3.7. Análise de dados	47
3.7.1. Diversidade genética	48
3.7.2. Análises de distância genética	48
3.7.3. Diferenciação intra e interpopulacional	48

3.7.4 Estrutura genética interpopulacional	49
3.7.5. Distância genética versus distância espacial	49
4. Resultados	50
4.1. Níveis de polimorfismo detectados pelo marcador AFLP	50
4.2. Análise da diversidade genética e estruturação genética interpopulacional	51
4.3. Análise de UPGMA	54
4.4. Análise de AMOVA – Níveis de estruturação populacional	56
4.5. Análise da relação da distância genética versus distância geográfica	57
4.5.1. Influência do número de locos na análise da relação da distância genética versus distância espacial	61
5. Discussão	72
6. Conclusões e Perspectivas	87
7. Referências bibliográficas	89

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1.	Quadro de eras geológicas.	2
Figura 2.	Árvore consenso da família Araucariaceae baseada nas seqüências do gene de cpDNA <i>rbcL</i>	5
Figura 3.	(A) <i>Araucaria angustifolia</i> ; (B) Vista aérea da mata de Araucária.	7
Figura 4.	(A) Estróbilo feminino não maduro; (B) estróbilo masculino não maduro; (C) e (D) Estróbilos femininos maduros (E) e (F) sementes de Araucária, pinhão, com destaque para o tamanho delas	9
Figura 5.	Ciclo reprodutivo da <i>A. angustifolia</i> .	10
Figura 6.	Mapa de distribuição atual das florestas de Araucária	12
Figura 7.	Corte ilegal de <i>A. angustifolia</i> em Santa Catarina.	18
Figura 8.	Mapa modificado de vegetações do Brasil. Em destaque os estados e seus respectivos municípios onde foram feitas as coletas.	32
Figura 9.	Região da área de coleta no município de São Francisco de Paula – RS.	35
Figura 10.	Região na área de coleta do município de Mangueirinha – PR.	35
Figura 11.	Região na área de coleta no município de Itatiaia – RJ	39
Figura 12.	Região na área de coleta do município de Teresópolis – RJ.	39
Figura 13.	Região na área de coleta do município de Liberdade – MG.	40
Figura 14.	Dendograma de UPGMA com as cinco populações de <i>Araucaria angustifolia</i> analisadas com as seis combinações iniciador-enzima (distância genética de Nei, 1978).	54
Figura 15.	(A) Gráfico gerado pelo programa SGS com o número de pares de indivíduos estudados por classes de distância espacial. (B) Distograma comparando a distância espacial e a distância genética entre os 43 indivíduos de <i>A. angustifolia</i> para todas as combinações iniciador/enzima testadas na população de Itatiaia..	58
Figura 16.	(A) Gráfico gerado pelo programa SGS com o número de pares de indivíduos estudados por classes de distância. (B) Distograma comparando a distância espacial e a distância genética entre os 84 indivíduos de <i>A. angustifolia</i> para todas as combinações	69

- iniciador/enzima testadas na população de São Francisco de Paula.
- Figura 17. (A) Gráfico gerado pelo programa SGS com o número de pares de indivíduos estudados por classes de distância. (B) Distograma gerado pelo programa SGS comparando a distância espacial e a distância genética entre os 27 indivíduos de *A. angustifolia* para cada todas as combinações iniciador/enzima testadas na população de Mangueirinha. 60
- Figura 18. Distogramas gerados pelo programa SGS para os 43 indivíduos de Itatiaia. (A)100 locos; (b) 150 locos; (C) 200 locos; (D) 300 locos; (E) 400 locos e (F) 600 locos. 64
- Figura 19. Distogramas gerados pelo programa SGS para os 84 indivíduos de São Francisco de Paula. (A)100 locos; (b) 150 locos; (C) 200 locos; (D) 300 locos; (E) 400 locos e (F) 600 locos. 68
- Figura 20. Distogramas gerados pelo programa SGS para os 27 indivíduos de Mangueirinha. (A)100 locos; (b) 150 locos; (C) 200 locos; (D) 300 locos; (E) 400 locos e (F) 600 locos. 71
- Figura 21. Distogramas gerados pelo programa SGS retirados de Salgueiro (2005). 84

LISTA DE ILUSTRAÇÕES**TABELAS**

Tabela 1.	<i>A. angustifolia</i> : populações analisadas, siglas, localização e número de indivíduos	41
Tabela 2.	Listas de iniciadores <i>EcoRI</i> e suas seqüências	46
Tabela 3.	Lista das combinações iniciador/enzima, número de bandas detectadas e a porcentagem de locos polimórficos para cada população de <i>A. angustifolia</i> .	51
Tabela 4.	Estimativas de diversidade genética e <i>Fst</i> dentre as populações de <i>A. angustifolia</i> .	52
Tabela 5.	Estimativas de <i>Fst</i> par a par feitas pelo programa TFPGA.	53
Tabela 6.	Distâncias genéticas de Nei (1978) e distâncias geográficas entre as cinco populações amostradas.	55
Tabela 7.	Resultado da análise de variância molecular (AMOVA)	56
Tabela 8.	Comparação da diversidade genética e estruturação genética em diferentes <i>Araucariaceae</i>	75

LISTA DE ABREVIações

AFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmento amplificado
AP	Antes do presente
°C	Graus Celsius
cm	Centímetros
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DAP	Diâmetro a altura do peito
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Gramas
ng	Nanograma
µg	Micrograma
h	Hora
L	Litros
m	Metros
mL	Mililitro
µL	Microlitro
M	Molar
mM	Minimolar
min	minutos
NaCl	Cloreto de sódio
PCR	Reação da polimerase em cadeia
pH	Potencial hidrogeniônico
PVP	Polivinilpirrolidona
P/V	Peso por volume
RAPD	Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
rpm	Rotações por minuto
TAE	Tampão tris, acetato e EDTA
TBE	Tampão tris, ácido bórico e EDTA
TE	Tampão tris e EDTA

Tris	Tri-hidroximetil aminometano
U	Unidades de enzima
V	Volts
v	Volume
v/v	Volume por volume

1. Introdução

1.1 Histórico

Segundo achados palinológicos, já era possível encontrar a espécie *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no Brasil a partir do Quaternário Superior (figura 1), no Pleistoceno (Salgado-Labouriau, 1994).

A sua primeira coleta foi feita apenas em 1817, no Rio de Janeiro, no cume do Corcovado, pelo naturalista italiano Giuseppe Raddi (1770 - 1829), vindo ao Brasil em expedição científica mandada pela coroa da Áustria juntamente com a comitiva da princesa Leopoldina. O naturalista coletou galhos do pinheiro com uma pequena pinha e a enviou para Europa. Apenas em 1819 a espécie teve sua primeira descrição científica feita pelo botânico Antônio Bertolini que a nomeou de *Columbea angustifolia* Bertol. (Mattos, 1994).

Inúmeras descrições da espécie foram feitas até a última efetuada por Kuntze, em 1893, em sua revisão geral, em que a araucária então chamada de *Columbea angustifolia* Bertol. (em referência a sua região de coleta e a primeira descrição) passou a ser chamada de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze.

Era	Período	Época	
Cenozóica (65 ma a hoje)	Quaternário (1.8 ma a hoje)	Holoceno (11.000 anos a hoje)	
		Pleistoceno (1.8 ma a 11.000 anos)	
	Terciário (65 a 1.8 ma)	Neogeno (23 a 1.8 ma)	Plioceno (5 a 1.8 ma)
			Mioceno (23 a 5 ma)
		Paleogeno (65 a 23 ma)	Eoceno (38 a 23 ma)
			Oligoceno (54 a 38 ma)
Paleoceno (65 a 54 ma)			
Mesozóica (245 a 65 ma)	Cretáceo (146 a 65 ma)		
	Jurássico (208 a 146 ma)		
	Triássico (245 a 208 ma)		
Paleozóica (544 a 245 ma)	Permiano (286 a 245 ma)		
	Carbonífero (360 a 286 ma)		
	Devoniano (410 a 360 ma)		
	Siluriano (440 a 410 ma)		
	Ordovícico (505 a 440 ma)		
	Câmbrico (544 a 505 ma)		

Figura 1. Quadro de eras geológicas

1.2 - A espécie *Araucaria angustifolia*

1.2.1 A Família Araucariaceae

Araucariaceae é uma família de suma importância biogeográfica devido a sua origem antiga e por ser muitas vezes componente dominante das comunidades das florestas do Hemisfério Sul (Kershaw & Wagstaff, 2001). A família ocorre na América do Sul, Austrália, Nova Zelândia, Nova Guiné, Nova Caledônia e em algumas ilhas do Pacífico Sul. A família Araucariaceae consiste em três gêneros, *Araucaria*, *Agathis* e o gênero monotípico *Wollemia*, com 40 espécies. Os dois primeiros gêneros já haviam sido reconhecidos há mais de um século. Entretanto, *Wollemia* foi primeiramente reconhecido na década passada em “New South Wales” na Austrália e descrito no ano de 1995.

Acredita-se que a família tenha origem no Triássico e que estivesse presente nos dois hemisférios durante o Jurássico e o Cretáceo Inferior, se tornando um componente significativo da vegetação da Gondwana até o Cenozóico Superior (Stockey, 1994). Embora a sua extensiva distribuição em ambos os hemisférios durante o Mesozóico, atualmente, os representantes da família estão restritos apenas a América do Sul, sudoeste da Ásia e parte oeste do Pacífico. A maioria das espécies de *Agathis* e todas as espécies de *Araucaria* são encontradas somente no Hemisfério Sul.

Araucaria é o gênero mais diversificado na família, estando distribuído por todo Hemisfério Sul (Chile, Argentina, sul/sudeste do Brasil, Nova Caledônia, Ilhas Norfolk, Austrália e Nova Guiné). Este gênero é dividido em quatro seções:

Araucaria, *Bunya*, *Eutacta* e *Intermedia*. As seções *Bunya* e *Eutacta* possuem os mais antigos achados fósseis e estavam distribuídas nos dois hemisférios durante o Jurássico. Já as seções *Araucaria* e *Intermedia* são limitadas ao Hemisfério Sul e os seus fósseis datam do Cretáceo Superior (Setoguchi *et al.*, 1998).

As espécies *Araucaria angustifolia* e *Araucaria araucana* são as únicas representantes da família Araucariaceae na América do Sul e são endêmicas desta região. Ambas pertencem ao gênero *Araucaria* e a seção *Araucaria*. O isolamento desta seção na América do Sul pode indicar divergência desde o período de efetiva separação física e de ambiente do continente sul americano e da região da Austrália durante o Cenozóico Inferior (Kershaw & Wagstaff, 2001). A respeito da seção *Araucaria*, como pode ser visto na figura 2 da filogenia da família Araucariaceae, as duas espécies, *Araucaria angustifolia* e *Araucaria araucana*, formam um grupo monofilético e possuem um ancestral em comum. Corroborando com o encontrado por Setoguchi *et al.* (1998) na filogenia da família Araucariaceae baseada nas seqüências do gene *rbcL* de cpDNA, Rambo (1951), em sua avaliação sobre os mais diversos gêneros, dentre eles *Araucaria*, argumentou que a rota de imigração desta flora para a região de ocorrência dos pinhais no Brasil procede da floresta andina meridional valdivia no Chile (região ao sul deste país, com presença de *Araucaria araucana*), indicando que ambas realmente divergiram de um ancestral comum.

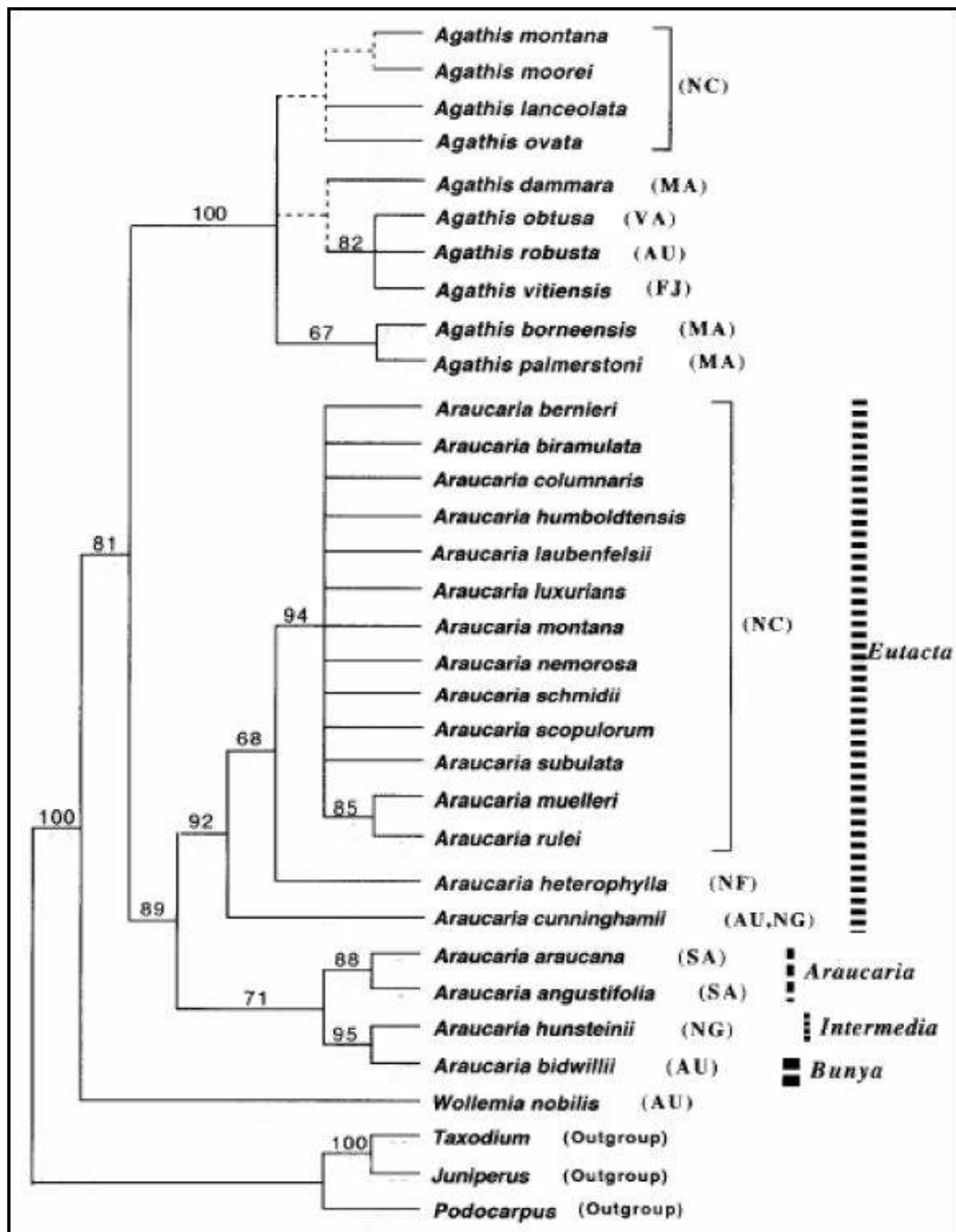


Figura 2. Árvore consenso da família Araucariaceae baseada nas seqüências do gene de cpDNA *rbcL*. Abreviações: AU= Austrália, FJ = Fiji, MA = região da Malásia, NC = Nova Caledônia, NF = Ilha Norfolk, NG = Nova Guiné, NZ = Nova Zelândia, SA = América do Sul, VA = Vanuatu. (modificada de Setoguchi *et al.*, 1998).

1.2.2 Informações gerais

Devido a sua ampla distribuição no Estado do Paraná, a espécie *Araucaria angustifolia* é bastante conhecida por pinheiro-do-paraná. Entretanto, outras denominações são também empregadas, são elas: araucária, pinheiro-brasileiro, pinho, curi, pinheiro-das-missões, pinheiro-são-josé, pinheiro-elegante e pinheiro-cajová (Reitz *et al.*, 1988). A araucária é uma espécie tipicamente perene, com altura que varia entre 20 a 50 m e com 50 a 120 cm de DAP (diâmetro a altura do peito). Seu tronco é cilíndrico, reto e em raros casos ramificados em dois ou mais. Sua casca é grossa (15 cm), resinosa, cuja superfície externa se desprende em placas, cinzento-escuras (Reitz *et al.*, 1988). Fuste com até 20 m ou mais. As árvores jovens apresentam a copa em forma cônica. Já nos indivíduos mais velhos os ramos se encontram dispostos em 8 a 15 verticilos cujo afastamento se reduz gradualmente até o ápice, formando uma umbela terminal. Sua madeira é moderadamente densa (0,50 a 0,61 g/cm³) (Carvalho, 2003). As folhas possuem de 3 a 6 cm de comprimento e 4 a 10 mm de largura, são simples, alternas, coriáceas, sésseis, espiraladas e lanceoladas (Reitz *et al.*, 1988; Mattos, 1994; Carvalho, 2003) (figura 3).

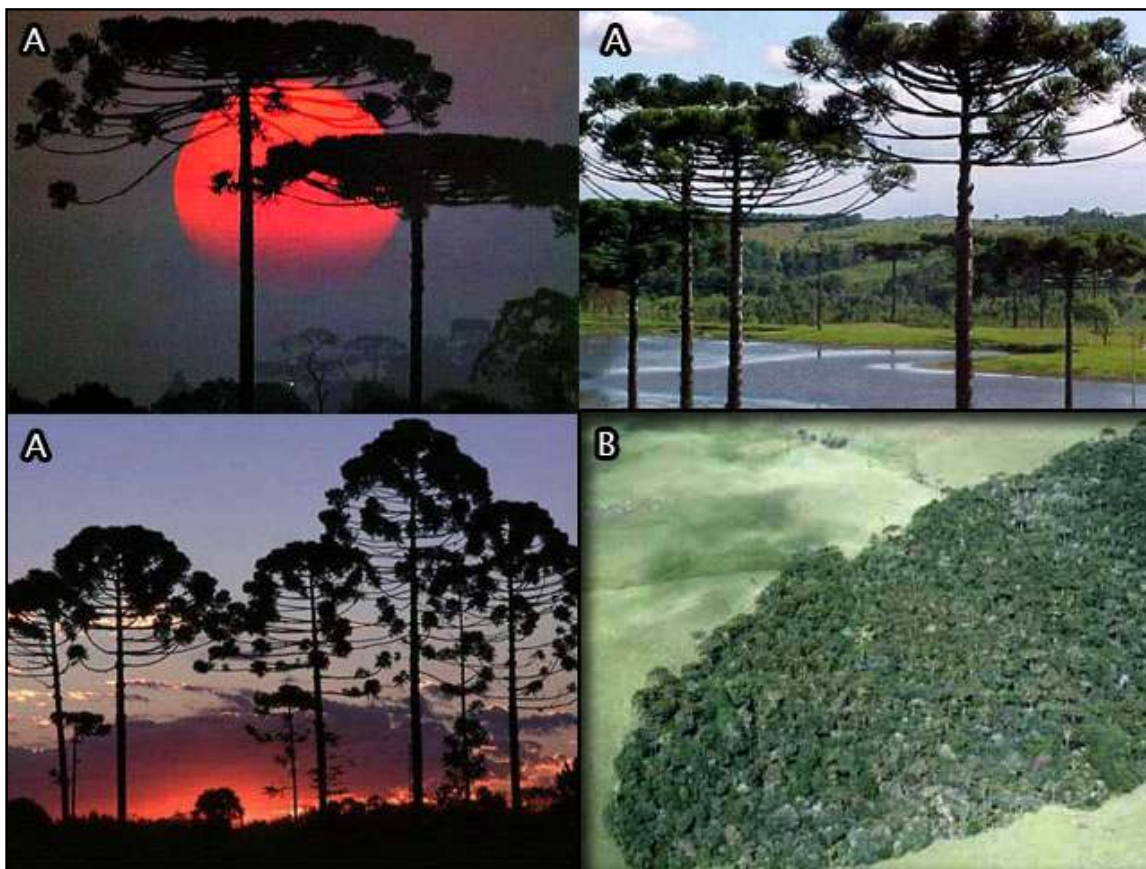


Figura 3. (A) *Araucária angustifolia*; (B) Vista aérea da mata de Araucária (forestry images, 2005)

1.2.3 Biologia reprodutiva

A araucária é uma espécie tipicamente dióica, raramente apresentando indivíduos monóicos. Esta característica pode gerar um desvio na proporção sexual dos indivíduos nas populações. Conforme visto por Sousa (2000) em um estudo realizado em populações naturais de araucária em Santa Catarina, no Paraná e em São Paulo, a proporção de machos e fêmeas é de 1:1 nestas áreas. Entretanto, Carvalho (2003) comenta que em levantamentos feitos em povoamentos naturais não desbastados há uma proporção estatisticamente

significativa de 52,4 % a 55,2 % de árvores masculinas para 44,8 % a 47,6 % de árvores femininas.

A espécie possui o estróbilo masculino em amento (conhecidas localmente como mingote), com 10 a 15 cm de comprimento por 2 a 4 cm de diâmetro (figura 3). Cada estróbilo masculino é constituído de uma escama coriácea, mais ou menos côncava, achatada, pedicelada e com 10 a 25 anteras alongadas, presas na face ventral de cada escama. As flores femininas em estróbilo (pinha) ou cone sub-arredondado (figura 4), estão presentes no ápice de um ramo protegido por numerosas folhas muito próximas entre si. Quando maduros os estróbilos possuem de 10 a 20 cm de diâmetro, com cerca de 10 a 150 sementes (pinhão). É possível se verificar, em alguns casos, uma a duas pinhas por ramo. As sementes são bastante carnosas e possuem de 3 a 8 cm de comprimento, por 1 a 2,5 cm de largura. Estima-se que o peso médio de cada semente é de cerca de 8,7 g. Não possuem grande longevidade natural e é possível que haja perda da viabilidade das sementes em apenas um ano após a coleta (Reitz *et al.*, 1988; Mattos, 1994; Carvalho, 2003).

Por ser uma espécie dióica, o sistema reprodutivo da araucária é alógamo. A produção do pólen pelos estróbilos masculinos e a polinização se dá de setembro a outubro. A maturação das pinhas se dá de abril a junho, normalmente vinte meses após a formação dos estróbilos femininos (figura 5) (Lorenzi, 1992). Cabe ressaltar que tanto o desenvolvimento reprodutivo quanto à formação das sementes para araucária é um processo extremamente longo, podendo levar até 4 anos (Shimoya, 1962).

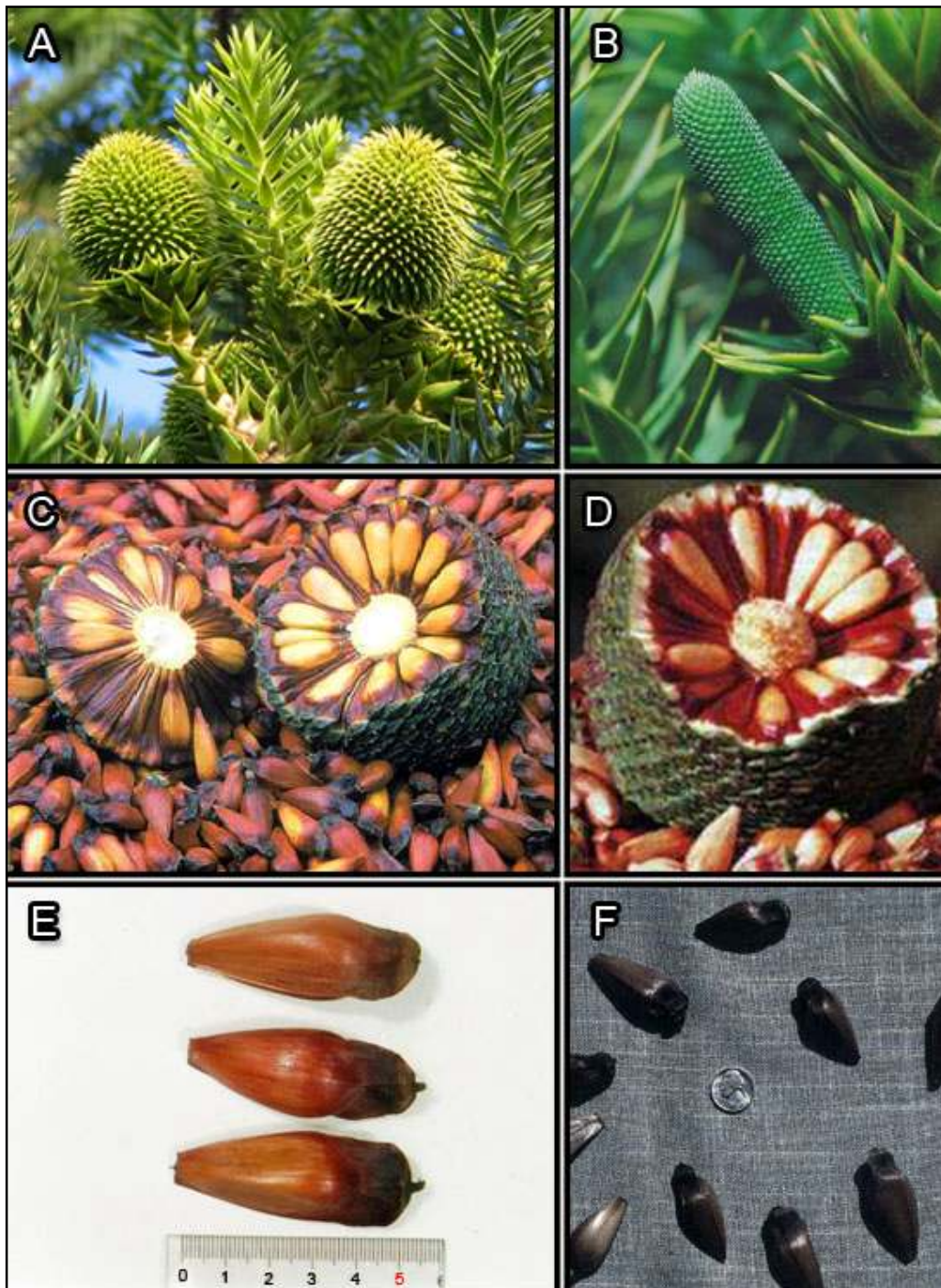


Figura 4. (A) Estróbilo feminino não maduro; (B) estróbilo masculino não maduro; (C) e (D) Estróbilos femininos maduros (<http://www.cnbb2.org.br>); (E) e (F) sementes de Araucária, pinhão, com destaque para o tamanho delas (E -<http://ftbc.job.affrc.go.jp> e F – <http://www.fao.org>).

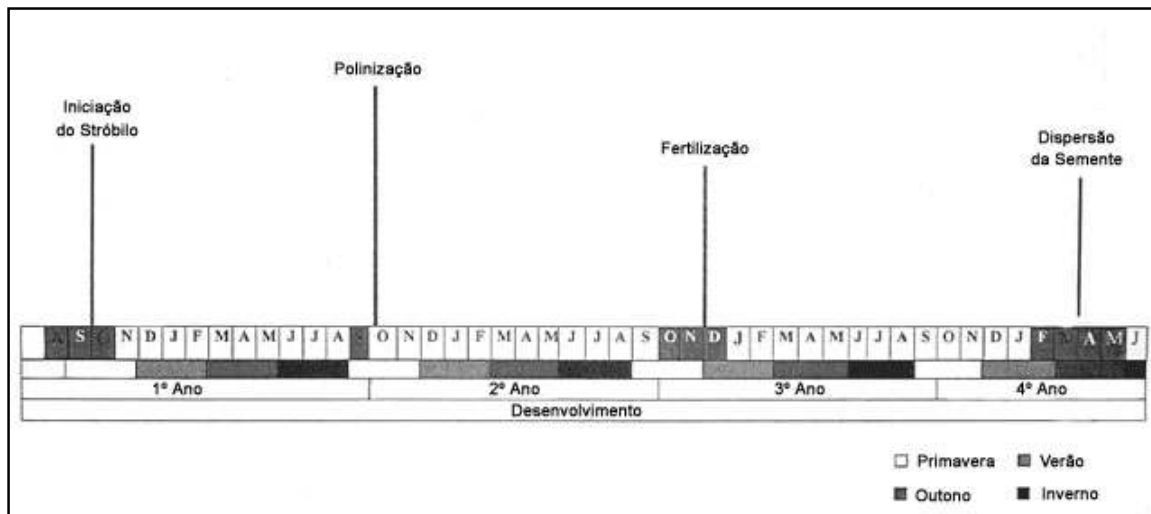


Figura 5. Ciclo reprodutivo da *A. angustifolia* (modificado de Lorenzi, 1992).

Quanto à polinização, é de comum conhecimento que a espécie *Araucaria angustifolia* é anemófila e possui grande produção de pólen. Sabe-se também que tanto a direção dos ventos quanto à velocidade dos mesmos influencia diretamente na polinização (Mattos, 1994). Além do vento, Boçon (1995) cita que uma ave, conhecida como grimpeirinho (*Leptastenura setaria*), também atuaria como polinizador. A ave transportaria pólen de um pinheiro para o outro durante a procura por alimento.

A dispersão de frutos e sementes se dá por barocoria, limitada às redondezas da árvore mãe (60 a 80 m). Tal comportamento pode ser explicado, principalmente, pelo peso das sementes, que normalmente são bastante pesadas para serem transportadas pelo vento ou por animais de menor porte. Entretanto, a dispersão também pode se dar por zoocoria sendo realizada, por roedores e aves (Carvalho, 2003). Dentre os roedores os que mais se destacam são: o rato-domato (*Oryzomys ratticeps*), a paca (*Agouti paca*), a cutia (*Dasyprocta azarae* e *D.*

aguti), o ouriço (*Coendo villosus*) e o esquilo-brasileiro (*Sciurus aestuans*). O pinhão possui grande importância na dieta da cutia *D. azarae*. Por ter o hábito de enterrar as sementes para comê-las depois, este roedor provavelmente é o mais importante disseminador de araucária (Carvalho, 2003). Dentre as aves dispersoras de semente pode-se citar: o papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), a gralha-picaça (*Cyanocorax chrysops*), a gralha azul (*Cyanocorax caeruleus*) e na Serra da Mantiqueira, em Minas Gerais, o aiuru (*Amazona farinosa*), os tucanos, entre outros (Carvalho, 2003). Por se alimentar do pinhão, o homem, em menor nível, também pode atuar como dispersor das sementes (Mattos, 1994).

1.2.4 Da distribuição

O bioma da Floresta de Araucária ou Floresta Ombrófila Mista localiza-se entre as latitudes 24° a 31°30'S, em regiões com altitude entre 500 e 1.500 m no sul do Brasil. Nesta região, o pinheiral se encontra formando agrupamentos densos, principalmente na parte leste do Planalto Meridional, abrangendo os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Reitz *et al.*, 1988; Carvalho, 2003). No sudeste brasileiro, as florestas de araucária ocorrem entre as latitudes 18° e 24°S formando manchas esparsas em São Paulo, se internalizando na Serra da Mantiqueira em Minas Gerais e no Rio de Janeiro (figura 6). Nesta região as populações são normalmente encontradas isoladas no topo das montanhas entre cotas altitudinais que variam de 1.400 a 2.300 m. Em relação à longitude, os pinheirais se estendem de 41°30'O a 54°30'L (Reitz *et al.*, 1988;

Behling, 2002; Carvalho, 2003). Há relatos de que a *Araucaria angustifolia* também ocorre no leste da Província de Misiones, na Argentina (Mattos, 1994).

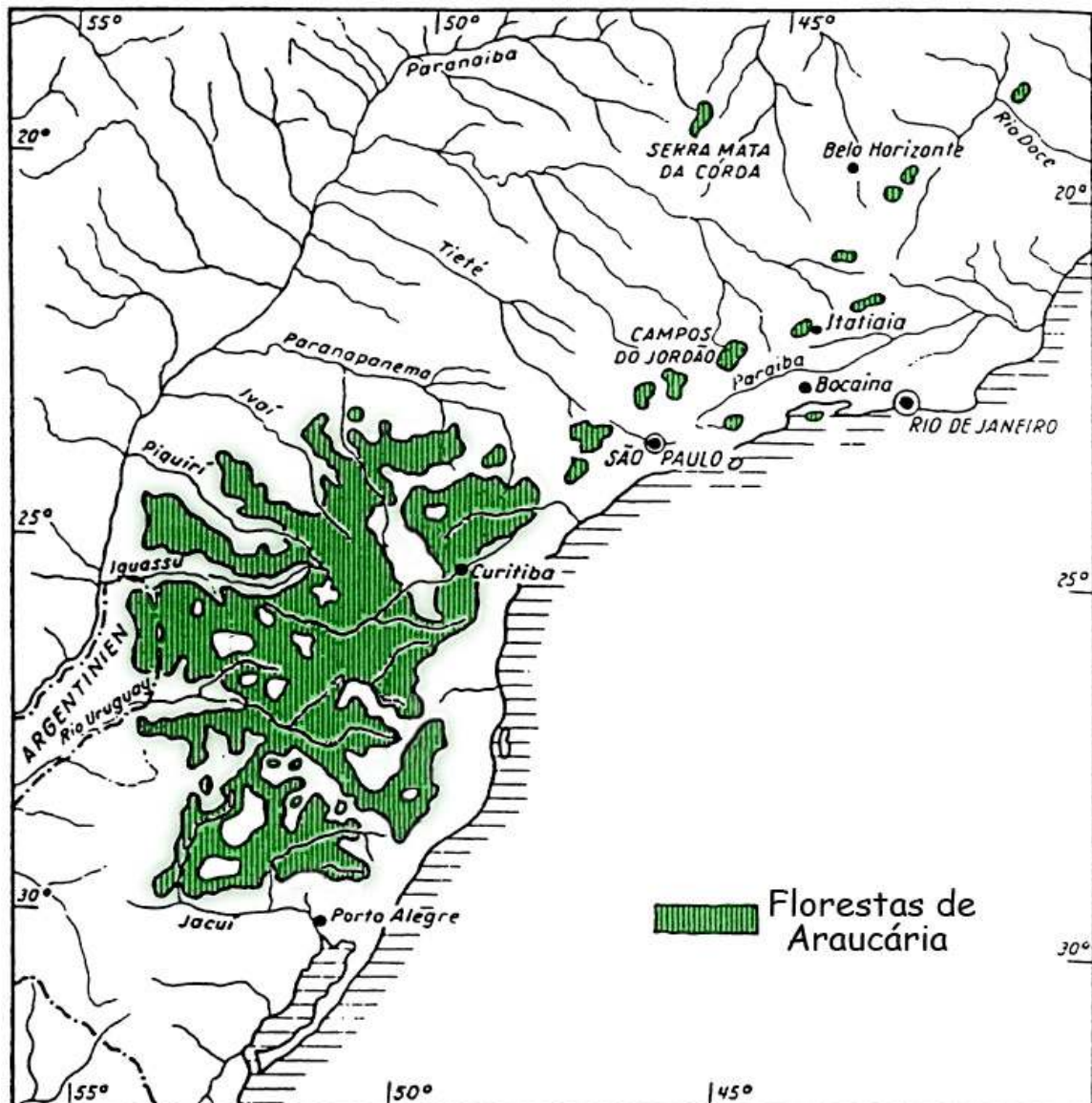


Figura 6. Mapa de distribuição original das florestas de Araucária (modificado de Behling et al., 2001).

Behling (2002) descreve que as matas de araucária são geralmente encontradas em regiões com clima tipicamente temperado e úmido, não havendo

estações secas demarcadas. Mais especificamente, segundo a classificação de Köppen, o bioma Floresta de araucária ocorre em regiões de clima temperado úmido (Cfb). Além disso, ele pode ocorrer também em áreas com clima subtropical úmido (Cfa) e subtropical de altitude (Cwb). Quanto à temperatura, nas áreas de ocorrência natural de araucária, as temperaturas mínimas médias anuais variam de 8,2° a 17,3°C e as máximas médias anuais variam entre 17,2° a 24,6°C (Carvalho, 2003). Como já foi descrita por Hueck (1966), a espécie requer cerca de 1400 mm de chuva anual. Portanto, a precipitação média das suas áreas de ocorrência no sul é de 1.400 a 2.300 mm e entre 1.200 e 2.000 mm no sudeste. A araucária ocorre naturalmente em vários tipos de solo. Mas, o solo considerado ideal para o crescimento da espécie são os Latossolos Vermelhos distróficos (Carvalho, 2003).

No Brasil, a área original da floresta de araucária correspondia à cerca de 200 mil km² (figura 6). Cerca de 40 % da superfície do estado do Paraná era coberto por pinheirais, 31 % em Santa Catarina, 25 % no Rio Grande do Sul, 3 % em São Paulo e 1 % em Minas Gerais e no Rio de Janeiro (Reitz *et al.*, 1988; Mattos, 1994; Carvalho, 2003) .

Devido a uma grande quantidade de registros fósseis de araucária datados do Quaternário superior, encontrados na região Central e Sudeste do Brasil, é possível que a distribuição de *A. angustifolia* tenha sido muito mais ampla no passado (Behling, 1998; Ledru *et al.*, 1998; Behling, 2002).

A vegetação atual brasileira e a maneira como esta se organiza se deve, principalmente, a alterações ocorridas nos últimos 1,6 milhões anos AP (antes do presente), durante o Quaternário (Salgado-Labouriau, 1994; Behling, 1998;

Behling, 2002) (figura 1). No Quaternário, as glaciações, períodos de intenso frio e seca, alternaram-se com fases mais curtas e abruptas, de temperaturas mais quentes, os interglaciais (Salgado-Labouriau, 1994). A respeito da vegetação do Brasil, sabe-se que as alterações climáticas ocorridas durante o Pleistoceno e o Holoceno geraram uma série de contrações e expansões das florestas de araucária, por exemplo. Acredita-se que em períodos mais frios e secos, os pinheirais tenham ficado restritos às matas de galeria, seguindo o curso de rios (regiões que eram normalmente mais úmidas). Já no caso de períodos com temperaturas mais elevadas, verificava-se a expansão das florestas tropicais em detrimento às matas de araucária, que ficavam restritas a regiões de temperatura mais amena, umidade mais alta e precipitação regular (Ledru *et al.*, 1996; Behling, 1998; Behling, 2002). A última mudança para um clima mais úmido foi iniciada há aproximadamente 6.000 a 5.000 anos AP na Região Sudeste e há 3.000 anos AP na Região Sul. A última grande expansão das florestas de Araucária, substituindo a vegetação de campos de altitude, ocorreu a partir das florestas de galeria, seguindo o curso dos rios. Mais precisamente a partir de 1.000 anos AP em Santa Catarina e 1.500 anos AP no Paraná (Behling, 1997; Behling *et al.*, 2001). De acordo com Behling & Lichte (1997), o clima era predominantemente mais seco nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil durante o Holoceno inferior. É descrito na literatura que este último período do Holoceno é caracterizado por um clima bastante úmido, não havendo uma estação seca determinada (Behling *et al.*, 2001) caracterizando então o clima ideal para a expansão da *A. angustifolia*. É interessante acrescentar que se acredita que esta condição de clima mais úmido ocorreu devido a uma forte influência de frentes frias, principalmente entre os anos

de 1.000 e 1.500 AP, havendo um menor impacto das massas secas continentais. Massas de ar tropical provindas do Atlântico podem ter exercido uma grande influência durante este último período do Holoceno (Behling *et al.*, 2001).

1.2.5 Importância social

O principal valor da araucária está relacionado ao consumo de suas sementes e a utilização de sua madeira para confecção de artesanatos e obras de marcenaria por populações que habitam as regiões próximas as matas naturais da espécie. Devido ao alto valor nutritivo (Auler *et al.*, 2002), sendo rico em amido (Reitz *et al.*, 1988), o pinhão é bem utilizado na dieta humana. Ainda, é muitas vezes empregado na alimentação de animais domésticos, além de ser componente da alimentação da fauna silvestre (Carvalho, 2003).

O pinhão foi durante um longo período bastante utilizado na alimentação de alguns grupos de indígenas e dos primeiros colonos. Isso se deu principalmente devido aos atributos da fécula branca (obtida quando o pinhão é seco ao calor e moído a pó) que é delicada, nutritiva e de fácil conservação. Atualmente, nos estados do Paraná e Santa Catarina, no período correspondente entre os meses de março a junho, é possível se observar um grande número de famílias vendendo pinhão às margens das rodovias (Carvalho, 2003).

1.2.6 Importância ecológica

A araucária pode ser caracterizada como uma espécie heliófila e secundária longeva, mas que apresenta um comportamento tipicamente pioneiro, avançando e irradiando pelos campos, levando a uma formação contínua de novos capões. Entretanto, destaca-se o fato que a espécie apresenta regeneração fraca tanto no interior da floresta como em locais pouco perturbados. Os capões são preferencialmente iniciados em regiões de pequenas depressões nos campos, cursos d'água, entre outros (Reitz *et al.*, 1988). Devido a características de seu comportamento, as populações de indivíduos adultos de araucária propiciam a criação de um ambiente microcósmico ideal para plantas de outras taxa, tolerantes a sombra, crescerem e se desenvolverem bem (Auler *et al.*, 2002). As matas de araucária primárias são compostas por uma grande diversidade de espécies e são usualmente caracterizadas por ter três níveis. O nível mais alto é composto pelas copas das araucárias mais antigas que permite a entrada de considerável quantidade de luz. O nível intermediário é formado basicamente por espécies da família Lauraceae. E o nível mais baixo é composto por espécies da família Myrtaceae e pela espécie *Ilex paraguariensis*, conhecida popularmente como erva-mate. Dentre as espécies que se encontram associadas ao pinheiro-do-paraná destacam-se as espécies dos gêneros *Ilex* (Erva-mate), *Ocotea* (Embuia) e *Podocarpus* (Pinheiro-bravo) (Angeli & Stape, 2003).

1.2.7 Importância econômica

A exploração comercial da madeira da araucária foi uma das atividades mais importantes economicamente para o sul do Brasil até o final da década de 70 (Guerra *et al.*, 2002) (figura 7). Esta madeira foi a maior fonte de desenvolvimento social e econômico dessa região fornecendo matéria-prima para a indústria de construção e de móveis. Por ser uma madeira que produz celulose de fibras longas também foi bastante empregada como matéria prima pela indústria do papel. A araucária também fornece outros produtos além da madeira. Através da fermentação da casca é possível se obter uma bebida de paladar bastante agradável (Carvalho, 2003). Ainda, a resina liberada pela casca, após sofrer o processo de destilação, fornece uma série de produtos com importância para a indústria química, são eles: alcatrão, óleos, terebintina, breu, vernizes, acetona e ácido pirolenhoso.

Além dessas utilizações, a araucária também é aplicada na medicina popular por indígenas de várias etnias do Paraná e de Santa Catarina para o tratamento de reumatismo, contusões oculares, feridas, dores nos rins e doenças sexualmente transmissíveis (Marquesini, 1995).



Figura 7. Corte ilegal de *A. angustifolia* em Santa Catarina (<http://www.ipef.br>)

A exploração das florestas de araucária foi intensificada após 1934 quando projetos de rodovias e indústrias foram colocados em prática nos estados do Paraná e Santa Catarina. Neste mesmo período houve um aumento na necessidade da existência de terras próprias para agricultura e para o pastoreio devido, principalmente, ao crescimento populacional do país. Cerca de 15 milhões de m³ de madeira de araucária foram exportados entre os anos de 1958 e 1987. (Reitz *et al.*, 1988). Até 1978, a área das matas de araucária já havia sido reduzida a apenas 8% da sua distribuição original (FUPEF, 1978). Nos dias atuais, estima-se que restam apenas cerca de 1 a 5 % da distribuição original, com apenas 0,7 % ocorrendo na forma de floresta primária (FUPEF, 2001; Carvalho, 2003). A espécie encontra-se na lista de espécies vulneráveis (IUCN) tendendo a uma iminente extinção. Laboriau & Matos Filho (1948) citam que grande parte das

matas de araucária foi explorada em três fases: a primeira, quando as árvores de maior valor foram exploradas e devastadas; a segunda em que as árvores restantes da primeira fase foram cortadas e terceira quando as terras sofreram queimadas objetivando a criação de áreas de pastoreio e de agricultura.

Desde o início de exploração comercial da espécie, as práticas de desmatamento não foram baseadas em mecanismos de gerenciamento sustentável e conseqüentemente resultaram em uma mudança significativa na aparência das matas de araucária.

As transformações de grande parte das florestas nativas de araucária em áreas destinadas a pecuária e agricultura causaram a depleção de grande parte das populações naturais. É possível que esta devastação indiscriminada tenha contribuído de forma bastante significativa para a redução da variabilidade genética a níveis que poderiam comprometer a sua utilização para conservação. Embora a araucária seja uma espécie tipicamente secundária longeva de comportamento pioneiro (Reitz *et al.*, 1988) tentativas de reflorestamento dos pinheirais não foram bem sucedidas (Hampp *et al.*, 2000). Schönherr & Pedrosa-Macedo (1979) citam que uma das dificuldades para o reflorestamento da araucária é causada pela ação de formigas que cortam as acículas das plântulas. Além disso, é necessário saber a proveniência das sementes antes de plantá-las, Gurgel & Gurgel Filho (1965) recomendam para plantios no Sul e Sudeste do Brasil a utilização de sementes selecionadas da mesma zona ecológica. Daí a importância de se conhecer mais sobre o ecossistema desta floresta tropical única para que então sejam propostos métodos eficazes para o reflorestamento.

Alia-se a isso a necessidade de se desenvolver estudos baseados no entendimento da estrutura genética populacional dos remanescentes de araucária para que se definam estratégias de conservação e de desenvolvimento sustentável adequado.

Uma série de estudos já foram feitos visando o entendimento da distribuição da diversidade genética da espécie *A. angustifolia*. No estudo de uma população de *A. angustifolia* remanescente do Parque Nacional do Iguaçu utilizando isoenzimas, Shimizu *et al.*, (2000) observaram um alto nível de heterozigosidade esperada em comparação com outras espécies de coníferas e, ainda, verificaram a manutenção do equilíbrio de Hardy-Weinberg, possivelmente devido a pouco impacto humano nesta população específica. Sousa *et al.*, (2004) avaliaram a variação genética e a estruturação populacional de araucária em populações de São Paulo e Santa Catarina utilizando aloenzimas como marcador. Neste trabalho, os autores detectaram que o nível de variação genética observada nos locos de aloenzima são maiores do que os já determinados para outras coníferas. Além disso, verificaram que a população de São Paulo, de distribuição mais a norte da espécie é a mais variável. Observaram também que a diferença genética entre as populações analisadas é relativamente baixa. Apesar da pouca mobilidade da semente e da polinização da espécie ser anemocórica este estudo mostrou um alto nível de fluxo gênico entre as populações de São Paulo e Santa Catarina. Em um outro sobre os efeitos do gerenciamento florestal na diversidade genética da espécie em uma população de Santa Catarina, utilizando RAPD, feita por Medri *et al.*, (2003), observou-se que o gerenciamento florestal reduz a variabilidade genética em populações remanescentes. Salgueiro, (2005),

utilizando marcadores microssatélites e de cloroplasto, verificou em seu estudo com populações de pinheiro-brasileiro do Rio Grande do Sul, Paraná e Rio de Janeiro um nível de heterozigosidade e estruturação populacional compatível ao visto em outros estudos com a espécie. Um grande número de outras análises utilizando AFLP, microssatélites nucleares e outros marcadores moleculares já foram feitos e mostraram que embora as florestas de araucária tenham passado por uma drástica redução de seu tamanho, a espécie ainda mantém uma diversidade relativamente alta se comparada a outras coníferas e a outras espécies que são vistas como vulneráveis. Ressalta-se a importância de que mais estudos com outras populações da espécie sejam feitos para que se conclua qual foi o real impacto da exploração humana nas florestas de araucária e se há a tendência de estruturação das populações insulares do Sudeste do Brasil.

1.3 Estudo de populações

1.3.1 Diversidade genética em espécies arbóreas

A diversidade genética representa um componente intra-específico da biodiversidade.

De acordo com Hamrick (1983) e Loveless & Hamrick (1987), o estudo da diversidade genética em populações naturais corresponde à descrição dos níveis de variação genética mantida dentro das populações, bem como a forma em que a variação genética é dividida entre populações. A diversidade genética e a estruturação genética podem ser mensuradas lançando mão de caracteres

quantitativos, avaliados em testes de procedências e progênies, e com base em dados de marcadores genéticos.

A diversidade genética intrapopulacional pode ser determinada pelos índices de percentagem de locos polimórficos, número médio de alelos por loco, heterozigosidade esperada (H_e) em equilíbrio de Hardy-Weinberg, heterozigosidade observada (H_o) e índice de fixação (F) (Berg & Hamrick, 1997). Loveless & Hamrick (1984) apontam que espécies tipicamente alógamas apresentam uma alta variação genética intrapopulacional em detrimento a variação genética interpopulacional que é menor, sendo que a divergência dentro de populações é inversamente proporcional a quantidade de fluxo gênico (quanto maior o fluxo menor a divergência intrapopulacional).

Em populações que apresentam baixa densidade de indivíduos pode-se verificar o aumento da endogamia que tem efeitos deletérios sobre a sobrevivência e vigor das espécies florestais arbóreas (Park & Fowler, 1982; Eldridge & Griffin, 1983). A grande fragmentação das populações submete-as a um acentuado efeito de borda e à redução do seu tamanho efetivo, comprometendo a sustentabilidade de plantas ou animais associados (Viana *et al.*, 1992). No caso particular da *A. angustifolia*, grande parte do remanescente de florestas pode estar se tornando inviável e sujeita ao desaparecimento, devido ao rompimento da dinâmica da sua regeneração, amadurecimento e reprodução. Ainda, mesmo que esse ciclo se torne completo, o pequeno tamanho efetivo das populações nos fragmentos torna as futuras gerações cada vez mais frágeis devido ao aumento da endogamia e perda de alelos em consequência da ação da deriva genética (Shimizu *et al.*, 2000).

Desta forma, para efetiva conservação genética ou exploração de uma espécie deve-se conhecer de que forma a variação genética ocorre dentro e entre populações, bem como compreender como ocorre essa variação de acordo com o tempo e o espaço. Alguns estudos de estrutura intrapopulacional de espécies arbóreas têm demonstrado que a distribuição de alelos e genótipos não é aleatória dentro das populações (Coles & Fowler, 1976; Loveless & Hamrick (1984); Chung & Epperson, 2000). Tal estrutura pode ser determinada pela dispersão de pólen e sementes (fluxo gênico), habitat de distribuição da espécie e seleção microambiental (Hamrick, 1983).

1.3.2 Fluxo gênico em plantas

A perda de variabilidade genética é o tópico central da conservação genética (Avice, 1994). Áreas fragmentadas onde existem pequenas populações principalmente de plantas alógamas estão propensas à endogamia e deriva gênica resultante dessa subdivisão. A endogamia pode atuar mascarando determinados alelos deletérios recessivos, diminuindo em um curto espaço de tempo o valor adaptativo das populações, nas quais ocorre a redução da heterozigosidade, podendo resultar em perda da diversidade alélica. Essa diversidade deve ser mantida pois promove a matéria prima para adaptação, evolução e sobrevivência das espécies e indivíduos, especialmente sobre mudanças ambientais e condições de doenças.

A terminologia aplicada para o modelo de fluxo gênico em modelos populacionais é confusa devido a uma série de significados dos termos migração e

dispersão, que em geral não correspondem aos seus significados quando aplicados ao fluxo. A migração, em seu âmbito maior, pode ser definida como qualquer movimento, incluindo movimentos cíclicos que podem regularmente retornar o organismo ao seu local de origem. Em contrapartida, o termo dispersão é mais restrito a movimentos que aumentam a distância entre organismos, gametas ou propágulos da fonte dispersora (Neigel, 1997).

De acordo com Slatkin (1981) fluxo gênico é um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam no movimento de alelos de uma população para a outra.

Há diversos fatores que influenciam e condicionam o fluxo de genes dentro de populações de plantas. O reconhecimento desses fatores e o entendimento de seu papel são essenciais para se poder compreender como o fluxo gênico afeta a estrutura da população e sua adaptação a condições específicas de habitat.

Levin (1984) considera que o fluxo gênico dentre populações de plantas é restrito, contrastando com a proposição de que espécies vegetais seriam populações mendelianas integradas pelo fluxo gênico. Desta forma, é possível explicar a divergência local de populações de plantas em função do fluxo gênico limitado. Entretanto, Ritland & Jain (1981) apontam que a interpretação do papel do fluxo gênico, bem como a de outros parâmetros microevolutivos, deve ser feita considerando-se tanto a dinâmica dos indivíduos, como a dinâmica dos genes em uma população.

Levin & Kerster (1974) definem fluxo gênico potencial em plantas como a deposição do pólen e sementes a partir de uma população fonte em função da distância. O fluxo gênico efetivo refere à incidência de fertilização (no caso de

pólen) e ao estabelecimento de indivíduos reprodutivos (no caso de sementes), em função da distância da população fonte e o fluxo gênico no tempo. Devido à ocorrência de dormência das sementes em algumas espécies, pode ocorrer a sobreposição de gerações sucessivas. Com isso, esta pode funcionar como fluxo gênico no tempo.

O fluxo gênico tem sido amplamente discutido em relação a sua magnitude e sua influência na estruturação genética das populações de plantas. Este proporciona a homogeneização das freqüências alélicas entre populações pequenas. Deste modo, mesmo que separadas geograficamente, elas se comportam como populações panmíticas. A sua maior importância está na manutenção da diversidade genética e do polimorfismo. Em plantas essa transferência de genes se dá pelo movimento de organismos individuais (sementes, rizomas, estolões) e pelo movimento de gametas (pólen).

A quantificação do fluxo de pólen pode ser feita através de medidas diretas e indiretas. Os métodos diretos são: observação direta dos polinizadores e marcadores morfológicos. Estes marcadores subestimam o fluxo gênico em potencial, pois este tipo de análise não leva em consideração os eventos posteriores, são eles: viabilidade e compatibilidade do pólen, competição polínica, aborto precoce dos óvulos fecundados, entre outros. Os mecanismos indiretos são os marcadores genéticos que através da análise de parentesco fornecem uma estimativa mais precisa do fluxo gênico real (Streiff *et al.*, 1999; Gerber *et al.*, 2000; Trapnell & Hamrick, 2005).

As análises de fluxo de semente também podem ser inferidas por marcadores físicos, mas como já citado, também se subestima o real fluxo de

sementes. Para minimizar este problema pode-se lançar mão de marcadores moleculares. Um marcador de bastante interesse para essa análise é o DNA cloroplástico (cpDNA). Em geral este marcador é uniparental, de herança materna na maior parte das angiospermas (Petit *et al.*, 2005) e paterna em gimnospermas. Graças a esta característica desta organela esta se torna bastante interessante para estudos de fluxos de semente através das análises de parentesco, permitindo, em teoria, a identificação da planta mãe em angiospermas e a planta pai em gimnospermas. Porém, dentre os marcadores genéticos existentes para o cpDNA nos dias atuais, não há nenhum suficientemente polimórfico para garantir uma probabilidade confiável de exclusão nos testes de parentesco. Uma saída para este problema é a utilização de marcadores nucleares em testes de parentesco. Contudo, após a identificação dos genitores, a dificuldade reside em distinguir o sexo de cada um deles. Uma nova alternativa para solucionar este problema é a utilização em conjunto de marcadores cloroplastidiais e nucleares. Com a utilização de ambos após a identificação dos progenitores é possível lançar mão dos marcadores de cloroplasto para determinar o sexo dos indivíduos (Kremer & Mariette, 2003).

1.4 Marcadores moleculares utilizados no estudo de populações

A avaliação da variabilidade genética sempre foi de grande interesse para os geneticistas, que desenvolveram uma série de métodos para detectá-la e analisá-la.

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, normalmente fenótipos facilmente identificados visualmente, como nanismo, deficiência de clorofila, cor da pétala ou morfologia foliar. Devido a isso, a disponibilidade desses marcadores era restrita a algumas espécies de plantas (em geral as que eram utilizadas como sistema modelo para o estudo genético) são elas: milho, tomate e ervilha. O marcador molecular pode ser definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um determinado segmento específico de DNA que corresponde a uma região do genoma que pode ser expressão ou não. Adiciona-se a isso que a seqüência de um marcador molecular pode ser conhecida ou não (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

A revolução dos marcadores moleculares teve seu início com o surgimento de marcadores bioquímicos, conhecidos como isoenzimas. O número de marcadores genéticos disponíveis foi aumentado bem como sua aplicabilidade que passou em incluir todas as espécies de plantas e animais. Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismos da molécula de DNA. Os marcadores moleculares baseados em DNA (RFLP, RAPD, SSR, AFLP, entre outros) permitiram uma maior cobertura genômica, quando comparados com as isoenzimas.

Entretanto, devido à realidade dos laboratórios que estudam genética de populações, até recentemente, estes estavam limitados a utilização de isoenzimas pelo fato de serem marcadores codominantes e de fácil elaboração da técnica. Dentre os marcadores moleculares destacam-se os codominantes (RFLP, SSR, isoenzimas) pois estes permitem a distinção do genótipo homozigoto do

heterozigoto. Já os marcadores dominantes (RAPD, AFLP, VNTR, etc) apresentam mais limitações por não discriminarem o heterozigoto. Desta forma, os marcadores codominantes são mais informativos, enquanto que com os dominantes, só é possível o cálculo das freqüências alélicas sob condições especiais: equilíbrio em autogamia, quando o valor de $f = 1,0$ ou equilíbrio em alogamia (ou equilíbrio de Hardy-Weinberg), quando $f = 0,0$.

1.4.1 AFLP “Amplified Fragment Length Polymorfism”

A análise de AFLP (Vos *et al.*, 1995) representa uma das tecnologias mais recentes para a obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos nos genomas de procariotos e eucariotos. O AFLP combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR (Polymerase Chain Reaction) (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

A técnica de AFLP consiste essencialmente de quatro etapas. Na primeira etapa o DNA genômico total do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição (uma de corte raro combinada com uma de corte freqüente) A segunda etapa consiste na ligação de adaptadores específicos aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Na terceira etapa, uma parcela dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR utilizando iniciadores especificamente desenhados para reconhecer seqüências nos adaptadores. Esta etapa é seletiva, para uma seleção branda, com a adição de apenas um nucleotídeo arbitrário. Esta fase é seguida por uma amplificação radioativa (ou

marcada por fluorocromos) também seletiva com a adição aos iniciadores três¹ nucleotídeos também arbitrários. Se não adotado esse procedimento o número de fragmentos gerados seria muito grande, impossibilitando a análise dos resultados. A etapa final os fragmentos amplificados são separados em eletroforese de gel de poliacrilamida de alta resolução. Os iniciadores são marcados por radioisótopos para posterior detecção das bandas em eletro-radiografias. No caso da utilização de iniciadores marcados por fluorocromos a detecção dos eletroferogramas é feita em seqüenciador automático. As principais vantagens dos marcadores AFLP são: (a) não é necessário conhecimento prévio do genoma da espécie a ser estudada; (b) entre todos os marcadores disponíveis é o que fornece o maior número de fragmentos em uma única análise; (c) maior reprodutibilidade em comparação ao RAPD e (d) são altamente polimórficos. Como já mencionado, a principal desvantagem dos marcadores AFLPs, assim como nos RAPDs, é sua característica dominante, que acarreta um baixo conteúdo de informação por loco. Outras desvantagens são: (a) necessidade de um DNA puro e íntegro para que não ocorra nenhuma alteração nos padrões de banda; (b) comparado ao RAPD, exige uma infraestrutura maior e é mais trabalhoso, pois requer um número maior de etapas até obter-se o resultado final; (c) em geral utiliza marcação radioativa dos iniciadores para posterior visualização das bandas (Ferreira & Grattapaglia, 1995, Vos *et al.*, 1995); (d) impossibilidade de garantir homologia e (e) possibilidade de desequilíbrio de ligação sério entre as bandas. Os marcadores AFLP são muito utilizados para estudos de detecção de variedades vegetais

¹ - Nesse trabalho, adicionou-se aos iniciadores ECO duas bases seletivas e aos iniciadores MSE quatro bases seletivas.

(Manubens *et al.*, 1999), diversidade genética intrapopulacional e interpopulacional (Keiper & McConchie, 2000), análises de parentesco (Geiber *et al.*, 2000), filogeografia (Muellner *et al.*, 2005) e construção de mapas genéticos (Chagne *et al.*, 2002).

2. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo analisar a diversidade genética da espécie *Araucaria angustifolia* [Bert] O. Kuntze em diferentes pontos de sua área de ocorrência utilizando o marcador molecular AFLP.

Objetivos específicos:

- Estimar os índices de diversidade genética de *A. angustifolia*;
- Analisar a estrutura genética inter e intrapopulacional da espécie;
- Relacionar a distância genética e a distância espacial (geográfica) intrapopulacional;

3. Material e Métodos

3.1 Áreas de coleta

Visando cobrir grande parte da área de ocorrência da *Araucaria angustifolia*, as coletas foram feitas em 5 pontos diferentes entre o limite sul e norte de sua distribuição. Indivíduos de duas populações foram coletados no sul do Brasil: no município de São Francisco de Paula (RS), na área do Projeto Pró-Mata; e no município de Mangueirinha (PR). E em três populações do sudeste: no município de Teresópolis (RJ), em Itatiaia (RJ) no Parque Nacional do Itatiaia e em Liberdade (MG) (figura 8)

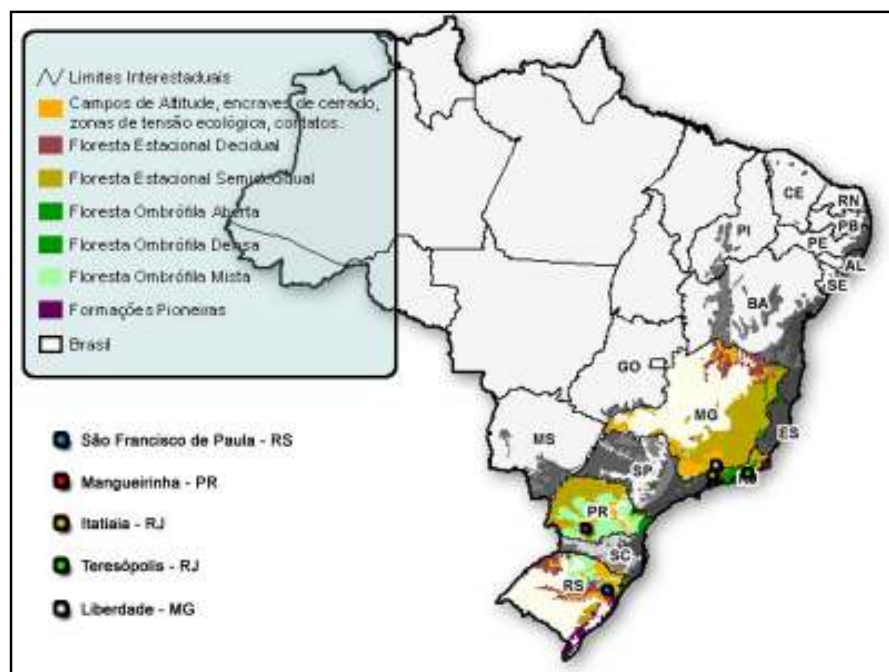


Figura 8. Mapa modificado de vegetações do Brasil. Em destaque os estados e seus respectivos municípios onde foram feitas as coletas. (SOS Mata Atlântica, 2005).

A população do Rio Grande do Sul se encontra na reserva do Pró-Mata e é mantida pela Pontifícia Universidade Católica (PUC-RS), no município de São Francisco de Paula, no nordeste do estado do Rio Grande do Sul (figura 9). A área é constituída pela formação Serra Geral. Localiza-se na borda leste do Planalto das Araucárias com altitudes que variam de 600 a 970 m. O clima local caracteriza-se por ser de superúmido a úmido com um total pluviométrico de cerca de 2.252 mm ao ano (PUC-RS, 2004). A média de temperatura na região, durante o inverno, é inferior a 15 °C e esta se mantém por um período de sete meses (de abril a outubro). Quanto à vegetação, a área encontra-se na interseção de três Regiões Fitoecológicas: a Floresta Ombrófila Mista (Mata de Araucária), a Floresta Ombrófila Densa (Mata Atlântica) e estepes (campos) (PUC-RS, 2004).

A segunda população estudada, também do sul do Brasil, encontra-se no estado do Paraná, no município de Mangueirinha, na Latitude: 25° 56' 28" S e Longitude: 52° 10' 32" O (figura 10). A região está localizada na bacia do rio Iguaçu e possui um relevo plano a levemente ondulado com altitude variando de 700 a 1.100 m. Segundo o sistema de classificação de Köppen, o clima caracteriza-se como temperado (Ctb) com temperaturas médias anuais que variam da mínima de 12 °C a máxima de 25 °C. A precipitação média é de 1.800 a 2.000 mm de chuva por ano. A região apresenta de 5 a 25 dias com geada por ano. Quanto à vegetação, na área de ocorrência da Floresta com Araucária (241.367ha) cerca de 67.171 ha (27,8 %) correspondem a florestas nativas. A Floresta em estado avançado apresenta poucas lianas e uma maior abundância de epífitas. Caracteriza-se por possuir dois estratos. O superior pode ser formado apenas por indivíduos de *Araucaria angustifolia* que atingem cerca de 20 a 25 m

de altura e diâmetros que variam entre 80 a 200 cm. Quando se encontram em baixa abundância, normalmente estão associadas a outras espécies, com árvores de altura média de 18 metros e variação diamétrica de 30 a 60 cm. As principais espécies encontradas são *Casearia obliqua*, *Ilex paraguariensis*, *Lamanolia speciosa*, *Ocotea porosa*, *Roupala brasiliensis* e *Sloanea lasiocomma* (Castella & Britez, 2004).



Figura 9. Região da área de coleta no município de São Francisco de Paula (RS).



Figura 10. Região na área de coleta do município de Mangueirinha (PR).

O Parque Nacional do Itatiaia (PNI) foi criado em 14 de junho de 1937 e constitui-se o primeiro Parque Nacional do país. Localizado no sudoeste do estado do Rio de Janeiro (figura 11) entre as latitudes 22°19' e 22°45' S e longitudes 44°45' e 44°50' O com altitudes entre 700 e 2.787 m, o Parque abrange hoje 30.000 ha. A região do Parque abrange a parte mais elevada da Serra da Mantiqueira, tendo como ponto culminante às "Aguilhas Negras" com 2.787 m (Jardim Botânico, 2005). Tanto as condições fisiográficas quanto a florística do parque são diretamente dependentes da altitude da região. Em relação a fisiografia local observa-se uma temperatura média anual nos platôs mais elevados de cerca de 11 °C, o clima se caracteriza por um verão úmido e ameno e um inverno seco. Entre 1.600 m até as altitudes dos platôs há um aumento na temperatura média anual que passa a ser de 14 °C com verões também amenos. Já em altitudes mais baixas o aumento da temperatura média anual é significativo, esta varia entre 20 °C a 22 °C e o inverno é mais chuvoso (Drummond, 1997). Quanto à flora do parque é possível se verificar uma combinação de florestas primárias, secundárias e campos de altitude. A fisionomia atlântica predominava na fisionomia original das partes mais baixas e atualmente os remanescentes nativos dela convivem com capoeiras ralas e pastos. Em altitudes maiores que 1.200 m, devido principalmente ao frio e aos solos pobres, predominam florestas alpinas com árvores de menor porte. Acima dos 1.600 m verifica-se a predominância de campos com gramas e ervas misturadas com florestas subtropicais mistas de coníferas e algumas florestas tropicais de altitude. Já nos platôs, acima de 2.000 m, encontram-se os campos de altitude mais característicos, com gramas e ervas mais tolerantes as secas, geadas e aos

periódicos fogos espontâneos que são responsáveis por ajudar a moldar a ecologia local. As chuvas abundantes características das altitudes médias auxiliam a formação e a preservação das densas florestas tropicais com árvores de grande porte, inclusive madeiras-de-lei e palmeiras. Em altitudes mais elevadas, observa-se a presença de espécimes de *Araucaria angustifolia* (pinheiro-do-paraná) e do *Podocarpus lambertii* (pinheirinho), as duas únicas espécies de coníferas nativas do território nacional, árvores de clima subtropical ou temperado (Drummond, 1997). Uma particularidade da formação das araucárias do PNI foi descrita por Brade (1956), do lado ocidental (região onde foi coletada a população analisada nesse trabalho) a araucária ocorre numa altitude de 1.600 m. Em contrapartida, a espécie só aparece entre 2.000 e 2.200 m no lado oriental. Esta diferença estaria provavelmente associada às diferenças climáticas existentes entre essas regiões.

O município de Teresópolis se localiza no estado do Rio de Janeiro na Latitude 22° 24' 44" S e Longitude 42° 57' 56" O (figura 12). A região é caracterizada pelo aspecto de um relevo montanhoso, em algumas áreas bastante escarpado com altitude que varia de 400 m a 2.263 m. Possui clima ameno, tropical de altitude com temperatura média anual de 17 °C, chuvas concentradas nos meses de primavera e verão, e uma estação seca nos meses de inverno (Oliveira, 1999). Sua umidade relativa atinge média anual de 84 %. A área de Teresópolis está classificada, de acordo com Köppen, como clima de inverno seco e verão chuvoso com temperaturas no mês mais quente superiores a 22 °C (Cwa) e clima de verão fresco, com temperaturas variando de 10 °C a 22 °C (Cwb) (Oliveira, 1999). A média de pluviosidade é de cerca de 1.671,6 mm por ano.

Quanto à vegetação, Teresópolis apresenta diferentes Regiões Fitoecológicas: Floresta Ombrófila Densa Montana, Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Atlântica.

A última população estudada foi coletada em Liberdade, localizada no sul do estado de Minas Gerais, entre as latitudes 22° 01' S e longitude 44° 19' O (figura 13). Localiza-se na bacia do rio Grande, no Maciço do Itatiaia, seu relevo é tipicamente montanhoso. Sua altitude varia entre cerca de 1.152 a 1.360 m. Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo úmido mesotérmico a subtropical (Cb), com temperatura média anual de 16,7 °C. A média pluviométrica é de cerca de 2.108 mm ao ano. (Prefeitura de Liberdade, 2005). Quanto à vegetação o município apresenta a Floresta Ombrófila Densa Montana, além de capões de *Araucaria angustifolia*.

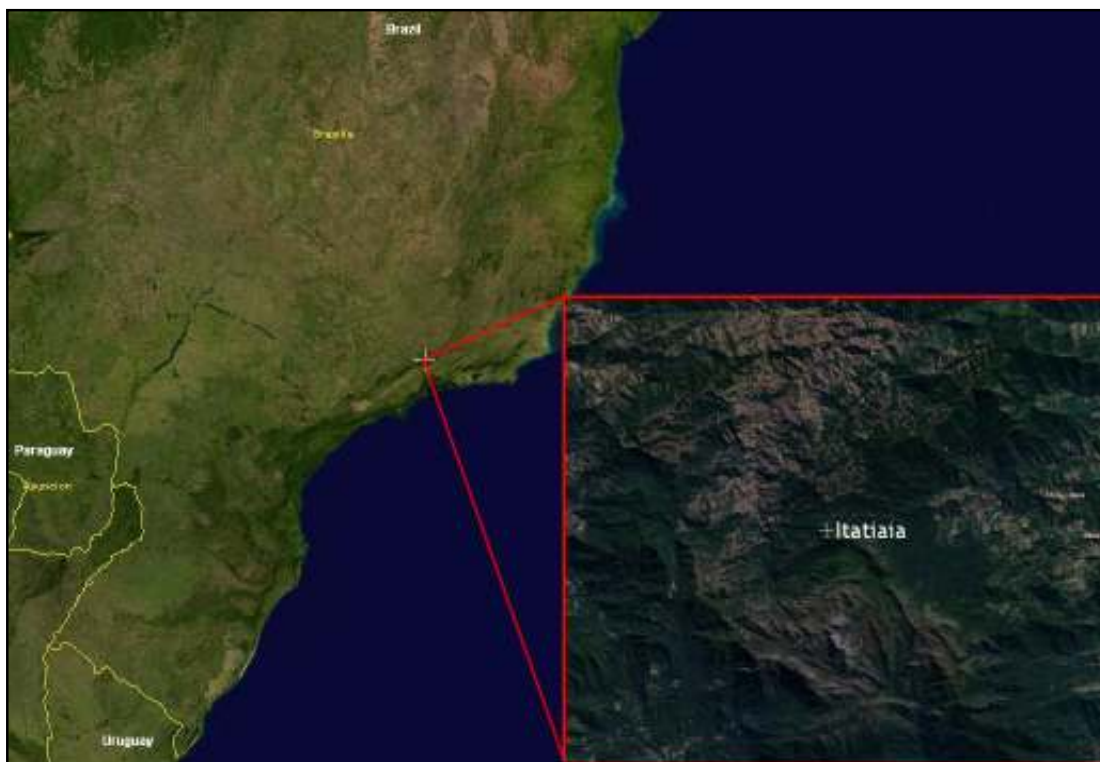


Figura 11. Região na área de coleta no município de Itatiaia (RJ).



Figura 12. Região na área de coleta do município de Teresópolis (RJ).

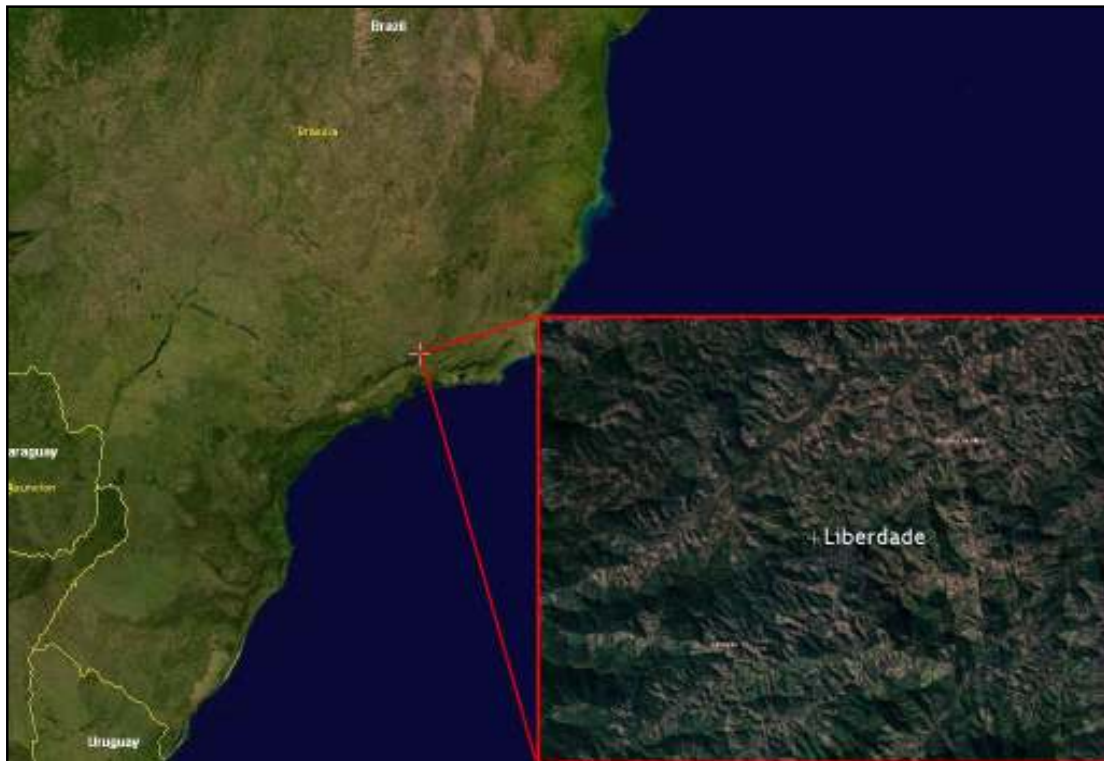


Figura 13. Região na área de coleta do município de Liberdade (MG).

3.2 Coleta do Material Vegetal

Para as análises de diversidade genética deste trabalho foram coletados 243 indivíduos nas cinco populações (tabela 1) previamente descritas: São Francisco de Paula (RS) (n=84) Mangueirinha (PR) (n=51), Itatiaia (RJ) (n=44), Teresópolis (RJ) (n=35) e Liberdade (MG) (n=29).

Tabela 1. *A. angustifolia*: populações analisadas, siglas, localização e número de indivíduos.

Populações	Sigla	Lat	Long	N° de indivíduos	Material coletado
Itatiaia (RJ)	ITA	22°24'	44°50'	44	folha
Teresópolis (RJ)	TERE	22°24'	42°57'	35	câmbio
São Francisco de Paula (RS)	SFPA	29°30'	50°10'	84	câmbio
Mangueirinha (PR)	MANG	25°56'	52°10'	51	câmbio
Liberdade (MG)	LIB	22°01'	44°19'	29	folha

Nas populações do Parque Nacional do Itatiaia, em Itatiaia (RJ) e de Liberdade (MG), foram coletados folhas jovens, com boa saúde sanitária, não apresentando manchas ou qualquer sinal de ação de agentes patogênicos e/ou herbivoria. Para as populações do Rio Grande do Sul, Paraná e Teresópolis utilizou-se um “furador de coco” para coletar um pequeno cilindro de câmbio de cada indivíduo (cerca de 1 cm³). Ainda no local de coleta, todo o material coletado foi armazenado em tubos plásticos contendo sílica gel (sulfato de cobre) como agente dessecante. Esse processo de desidratação auxilia na conservação do DNA, evitando a ação de DNases. Chegando ao laboratório todo o material foi transferido para um freezer a – 80 °C.

É importante ressaltar que em todas as populações procurou-se coletar amostras dos indivíduos que possuíam DAP (diâmetro a altura do peito) superiores a 15 cm. Além do DAP, também se determinou às coordenadas geográficas dos indivíduos. Na população de Itatiaia, cada indivíduo teve sua coordenada geográfica determinada com o auxílio de um GPS (*global positioning system*). As populações do Rio Grande do Sul e do Paraná fazem parte de áreas

já mapeadas em outros tipos de estudos feitos em diferentes instituições, portanto possibilitou a obtenção da posição relativa entre os indivíduos. Para a população de Liberdade e de Teresópolis não foi possível determinar as coordenadas geográficas dos indivíduos devido à falta do equipamento GPS durante as coletas. Quando possível, procurou-se ainda determinar o sexo dos indivíduos pela presença dos cones masculinos e femininos.

3.3 Extração do DNA Total

Foi macerado, em nitrogênio líquido, aproximadamente 150 mg de material vegetal de cada indivíduo, até tornar-se pó, de espessura fina. Logo após, adicionou-se 0,9 mL de tampão de extração (CTAB 2 %; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl 100 mM; PVP 2 %; pH 8,0; 0,2 % de β -mercaptoetanol). A mistura obtida foi agitada em vórtex por alguns segundos. Em seguida, incubada em banho-maria por uma hora, a 65 °C, e agitada por inversão do tubo a cada 10 minutos.

Imediatamente após, acrescentou-se 0,7 mL de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1, v:v). O passo seguinte consistiu em agitar a mistura por inversão durante 5 minutos e centrifugação por mais 5 minutos a 10.000 g, a 4 °C. Transferiu-se a fase aquosa a um novo tubo no qual adicionou-se 1/10 do volume de uma solução CTAB 10 %, NaCl 1,4 M e agitou-se por inversão de tubo até que a mistura ficasse viscosa. Repetiu-se, então, por mais duas vezes a etapa de lavagem com clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1, v:v).

Em um novo tubo adicionou-se cerca de 2/3 do volume de isopropanol frio (-20 °C) e submeteu-se a mistura a uma nova agitação por inversão durante 5 minutos. Logo após, as amostras foram incubadas a 4 °C por aproximadamente 16 horas.

Depois das 16 horas, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 20 minutos a 4 °C. Posteriormente, a fase aquosa foi descartada e o precipitado foi submetido a duas lavagens com 1 mL de etanol 70 % (-20 °C) por 5 minutos e a uma lavagem com 1 mL de etanol 100 % (-20 °C) por 3 minutos. Após as três lavagens com etanol, o precipitado ficou exposto a temperatura ambiente por 30 minutos para que este secasse. O precipitado obtido foi então ressuspensão em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 mM) e estocado indefinidamente a -20 °C.

3.4 Quantificação do DNA

O DNA genômico extraído teve sua concentração e integridade determinados em gel de agarose 0,8 % e TAE 1X (Tris base 24,3 g/L; ácido acético glacial 5,7 mL (P/V); EDTA 10 %; pH 8,0). A quantificação do DNA extraído foi feita comparando-se este DNA com concentrações padrão conhecidas de DNA do fago λ . O DNA padrão foi utilizado nas concentrações de 25, 50, 100, e 200 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$.

Realizou-se a migração eletroforética em uma cuba contendo tampão TAE 1X e brometo de etídeo (1,2 μL de uma solução 10 mg/mL para cada 100 mL de tampão) para posterior visualização do DNA em transiluminador com luz

ultravioleta. Adicionou-se a cada amostra 1/10 do volume de uma solução contendo 25 % ficol e 0,06 % de azul de bromofenol. As amostras foram aplicadas no gel e a migração eletroforética foi realizada a voltagem constante de 100 V. Após aproximadamente 30 minutos de migração, o DNA foi observado em um transiluminador de luz ultravioleta e a imagem digitalizada e fotografada (sistema EagleEye da Stratagene®).

3.5 Reações de AFLP

Todos os indivíduos coletados nas cinco populações de *Araucaria angustifolia* anteriormente mencionadas foram analisadas utilizando-se o marcador molecular AFLP (Amplified Fragment Length Polimorfism) (Vos *et al.*, 1995). Esse marcador se caracteriza por ser altamente polimórfico, permitindo a diferenciação dos indivíduos de uma mesma espécie. Este ainda apresenta uma alta taxa de resolução, sendo altamente reprodutível com a vantagem de não requerer nenhum tipo de conhecimento prévio sobre o genoma da espécie analisada. Entretanto, trata-se de um marcador neutro e dominante, portanto, para as análises, é necessário que seja assumido o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o cálculo da frequência dos genótipos é feito a partir dos fenótipos (ausência de banda). Seis combinações iniciador/enzima foram utilizadas para as análises: *EcoRI* (Hex – 6 -hexaclorofluoresceína) - CA x *MseI* - GACC, *EcoRI* (Hex) - CA x *MseI* GCAC, *EcoRI* (Fam – 6-carboxifluoresceína) - CC x *MseI* - GACC, *EcoRI* (Fam) - CG x *MseI* - GACC, *EcoRI* (Fam) - CG x *MseI* - GCAC e *EcoRI* (Hex) - CT x *MseI* - GACC.

As digestões com as enzimas *EcoRI* e *MseI* foram feitas a partir de 50 ng iniciais de DNA genômico total. Utilizaram-se 0,5 U de cada uma das enzimas e 2 µL do tampão 5x reaction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,3, 20 mM Mg-acetato, 250 mM K-acetato) (Invitrogen®) em um volume final de 10 µL. A digestão foi feita durante 16 h a 37 °C.

Ao término da digestão, os fragmentos foram ligados a adaptadores *EcoRI* (5'AATT 3') e *MseI* (5'AT 3') complementares aos sítios de corte. Para tal, misturou-se 5 pmol do adaptador *EcoRI*, 50 pmol do adaptador *MseI* e 0,2 U de T4 DNA ligase (Invitrogen®). A reação foi feita em um volume final de 5 µL e incubada a 20°C por 3 horas.

Subseqüentemente, foi feita uma pré-amplificação seletiva dos fragmentos previamente ligados a seus adaptadores. Para o volume final de 20 µL utilizou-se: 5 µL do DNA digerido e ligado a adaptadores; 50 ng do iniciador *EcoRI* (5' AGACTGCGTACCAATTC 3') + oligo seletivo C; 50 ng do iniciador *MseI* (5' GACGATGAGTCCTGAGTAA 3') + oligo seletivo G, 1 µL de dNTP (5 mM); 2 µL do tampão 10x PCR (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3) e 0,5 U da enzima Taq DNA polimerase platinum (Invitrogen®). As reações de pré-amplificação seguiram as seguintes etapas: 5 minutos de desnaturação a 94 °C; 12 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Ao final dos ciclos, uma etapa de extensão de 72 °C por 5 minutos. A cada ciclo a temperatura do pareamento dos iniciadores decrescia 0,7 °C. A última etapa da reação de AFLP consistiu em uma nova rodada de amplificação seletiva. Para isso, utilizou-se iniciadores (tabela 2) marcados com fluorocromos azul e verde (Invitrogen®) e

estes eram complementares aos adaptadores *EcoRI*, com as bases seletivas CA, CC, CG e CT. E os iniciadores não marcados, complementares aos adaptadores *MseI*, com as bases seletivas GACC e GCAC. Para um volume final de 10 μL , foram utilizados: 1 μL do tampão 10X PCR; 0,5 U da enzima Taq polimerase platinum (invitrogen®), 0,4 μL do iniciador *EcoRI* marcado; 0,4 μL do iniciador *MseI* e 0,2 μL de dNTP (5 mM). Os marcadores utilizados foram fluorocromos azuis, FAM (6 – carboxifluoresceína), e verdes, HEX (6 – hexaclorofluoresceína) (invitrogen®) As condições de PCR para essa segunda etapa de amplificação foram idênticas às utilizadas na etapa de pré-amplificação. Ao final das reações acrescentou-se: 0,35 μL do padrão interno (Gene Scan® -500® Size Standard; com amplitude de 35 a 500 pb) e 9,65 μL de um tampão contendo formamida (98 % formamida, 10 mM EDTA pH 8.0, 0,1 % de azul de bromofenol e xileno cianol).

Tabela 2. Listas de iniciadores *EcoRI* e suas seqüências

Iniciadores marcados	Seqüência (5' – 3')
<i>EcoRI</i> + CC(FAM)	5' AGACTGCGTACCAATTCCC 3'
<i>EcoRI</i> + CA(HEX)	5' AGACTGCGTACCAATTCCA 3'
<i>EcoRI</i> + CT (HEX)	5' AGACTGCGTACCAATTCCT 3'
<i>EcoRI</i> + CG(FAM)	5' AGACTGCGTACCAATTCCG 3'

3.6 Obtenção dos eletroferogramas e análises

Posteriormente, para a obtenção dos eletroferogramas das amostras, utilizou-se o seqüenciador automático 3100 Genetic Analyzer ABI Prism 777 (Applied Biosystem®). Esse sistema de seqüenciamento por fluorescência possui 16 capilares de 50 cm (para melhor resolução e visualização) permitindo a análise de

até 192 amostras de uma só vez. As amostras anteriormente misturadas a formamida e ao padrão interno foram aplicadas em uma placa própria do aparelho. Cabe ressaltar que é possível analisar duas combinações de iniciador/enzima de uma só vez. Cada fragmento de DNA, marcado com fluorocromo, resulta em picos de pesos moleculares diferentes.

Os tamanhos de fragmentos foram determinados pela comparação com um padrão de peso molecular. Posteriormente, os dados foram exportados do seqüenciador para o programa Gene Mapper versão 3,5 (Applied Biosystem®). Este programa permite a detecção do tamanho dos fragmentos encontrados em cada amostra. O resultado é apresentado em forma de gráficos em que cada pico encontrado corresponde ao tamanho dos fragmentos amplificados. Subseqüentemente, esses dados são exportados para uma tabela Excel® formando matrizes de presença e ausência (0 e 2 para ausência e 1 para presença de banda, dependendo do programa utilizado).

3.7 Análise dos dados

O estudo populacional foi realizado a partir dos dados obtidos com as seis combinações de iniciador/enzima EcoRI (Hex) - CA x Msel - GACC, EcoRI (Hex) - CA x Msel GCAC, EcoRI (Fam) - CC x Msel - GACC, EcoRI (Fam) - CG x Msel - GACC, EcoRI (Fam) - CG x Msel - GCAC e EcoRI (Hex) - CT x Msel - GACC.) em todos os 243 indivíduos analisados.

3.7.1 Diversidade genética

Como o marcador utilizado neste trabalho é de caráter dominante, assume-se, primeiramente, que as populações testadas neste trabalho encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e, portanto, as frequências alélicas são estimadas baseadas na raiz quadrada da frequência do genótipo recessivo. Foram computados a frequência alélica, a heterozigosidade esperada (Nei, 1978), a heterozigosidade total, a percentagem de locos polimórficos para cada população com o programa TFPGA “Tool for population genetics analyses” (Miller, 1997).

3.7.2 Análises de distância genética

Para as análises de distância genéticas deste trabalho o programa TFPGA (Miller, 1997) também foi utilizado. As identidades e distâncias genéticas entre as populações foram calculadas pelo método da distância genética de Nei (1978). Para a construção da árvore de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) também se utilizou o método da distância genética de Nei (1978) e o teste do bootstrap dos ramos com 2000 permutações.

3.7.3 Diferenciação intra e interpopulacional

A diferenciação genética intra e entre populações (grupos) foi testada pela análise de variância molecular (AMOVA) utilizando o programa Arlequin (versão 3.0b; Excoffier & Schneider, 2005) com 5 % de tolerância para dados faltantes e com dois níveis hierárquicos definidos: entre populações e dentro das populações. A significância da diferenciação foi testada com 1000 permutações, onde P denota

a probabilidade de se observar um valor ao acaso igual ou maior ao valor observado.

3.7.4 Estrutura genética interpopulacional

A estrutura genética populacional foi determinada a partir da estatística f de Wright (Wright, 1965) pelo método de Weir & Cockerham (1984). Estas estimativas foram obtidas com a utilização do programa TFPGA (Miller, 1997) onde foram feitas 1000 replicações em um intervalo de confiança de 95%.

3.7.5 Distância genética versus distância espacial

A análise da relação das distâncias genética e espacial foi feita utilizando-se o programa SGS “Spatial Genetic Software” (Degen *et al.*, 2001a). Esta análise consiste na correlação entre as distâncias espacial e genética entre os indivíduos de uma população. Para a construção do distograma foi utilizada a distância de Tanimoto bem como um teste de permutação (1000 replicações) baseado na simulação de Monte-Carlo, com intervalo de confiança de 95 %. Cabe ressaltar que para as diferentes populações analisadas os números de classes de distância e os tamanhos da distância das classes variaram sendo maiores dependendo da distribuição máxima dos indivíduos. Ainda, esta alteração nas classes de distância foram feitas visando respeitar o limite mínimo de 30 pares de indivíduos abordados em cada classe de distância espacial proporcionando assim uma maior robustez dos resultados (Degen *et al.*, 2001a).

4. Resultados

4.1. Níveis de polimorfismo detectados pelo marcador AFLP

Foram usadas neste trabalho seis combinações de iniciador/enzima nos 243 indivíduos das cinco populações de *Araucaria angustifolia* amostradas. Como pode se verificar na tabela 3, as seis combinações de iniciador/enzima revelaram um total de 683 locos. A combinação *EcoRI*+CA/*MseI*+GCAC detectou o maior número de locos informativos (155) enquanto a combinação *EcoRI*+CG/*MseI*+GCAC revelou o menor número de bandas informativas (87).

A percentagem média de locos polimórficos detectados em cada população variou de 41,3 % em Teresópolis (RJ) a 66,5 % em Mangueirinha (PR). Quando as seis combinações de iniciador/enzima foram analisadas em conjunto verificou-se que a população de São Francisco de Paula (RS) apresentou a maior percentagem de locos polimórficos (66,6 %), seguida por Mangueirinha (PR) (65,4 %). As populações de Itatiaia (RJ) e Teresópolis (RJ) apresentaram níveis intermediários de polimorfismo (50% e 44,9 %, respectivamente), enquanto a população de Liberdade, em Minas Gerais, apresentou a menor percentagem de polimorfismo, cerca de 40,4 % (tabela 3).

Tabela 3. Lista das combinações iniciador/enzima, número de bandas detectadas e a porcentagem de locos polimórficos para cada população de *A. angustifolia*.

Iniciadores Eco+2/Mse+4	Número de locos	% de locos polimórficos				
		Itatiaia (n = 44)	Teresópolis (n = 35)	São Francisco de Paula (n = 84)	Mangueirinha (n = 51)	Liberdade (n = 29)
CT/GACC	97	44,3	31,9	46,3	59,7	53,6
CG/GACC	106	60,3	44,3	72,6	80,1	34,9
CC/GACC	106	48,1	42,4	51,8	65,0	52,8
CA/GACC	132	47,7	34,0	53,7	46,2	24,2
CG/GCAC	87	42,2	52,8	81,6	91,9	66,6
CA/GCAC	155	54,2	42,5	87,7	56,1	26,4
Média		49,4	41,3	65,6	66,5	43,1
TOTAL	683	50,0	44,9	66,6	65,4	40,4

n = número de indivíduos amostrados em cada população.

4.2. Análise de diversidade genética e estruturação genética interpopulacional

A heterozigosidade esperada em cada população (H_e) foi inicialmente calculada levando em consideração as seis combinações separadamente e, posteriormente analisou-se o mesmo índice considerando todas as combinações em conjunto. Para o cálculo da heterozigosidade total (H_t) nas cinco populações amostradas foram utilizadas as mesmas abordagens citadas para a H_e (as seis combinações analisadas separadamente e em conjunto).

Na tabela 4 de estimativas de diversidade genética verifica-se que a heterozigosidade esperada calculada para cada população variou de 0,14 em Liberdade (MG) e Teresópolis (RJ) a 0,21 em São Francisco de Paula (RS) e

Mangueirinha (PR). A população de Itatiaia apresentou um nível intermediário de heterozigidade esperada média ($He=0,16$). Quando analisadas todas as combinações em conjunto é possível notar que a população de São Francisco de Paula continua apresentando a maior He (0,22) seguida pela população de Mangueirinha (0,21). Corroborando com o visto anteriormente, as populações de Teresópolis e Liberdade apresentaram os menores índices de heterozigidade esperada média ($He=0,14$) (tabela 4).

A respeito da heterozigidade total (Ht) observa-se que a média das análises de cada uma das combinações e a análise de todas as combinações em conjunto resultaram no mesmo valor de 0,20.

Tabela 4. Estimativas de diversidade genética e Fst dentre as populações de *A. angustifolia*.

Iniciadores	Ht	$HeITA$	$HeTERE$	$HeSFPA$	$HeMANG$	$HeLIB$	Fst
CT/GACC	0,17	0,14	0,11	0,14	0,19	0,17	0,17 (0,022)
CG/GACC	0,21	0,18	0,15	0,21	0,24	0,11	0,14 (0,015)
CC/GACC	0,18	0,15	0,14	0,16	0,21	0,19	0,12 (0,014)
CA/GACC	0,17	0,17	0,12	0,18	0,16	0,08	0,15 (0,014)
CG/GCAC	0,26	0,14	0,18	0,29	0,29	0,22	0,15 (0,015)
CA/GCAC	0,23	0,19	0,15	0,29	0,18	0,10	0,15 (0,010)
Média	0,20	0,16	0,14	0,21	0,21	0,14	0,14
6 combs	0,20	0,17	0,14	0,22	0,21	0,14	0,15 (0,006)

Ht = heterozigidade total;

He = heterozigidade esperada em cada população e;

Fst = estimativa da diferença entre as heterozigidades esperada e total das populações.

() = Desvio padrão obtido por 1.000 re-amostragens.

Analisando-se o valor encontrado de *Fst*, verifica-se que grande parte da variação genética encontra-se dentro de cada população ($Fst = 0,15 \pm 0,006$).

Quando analisadas as estimativas de *Fst* par a par (tabela 5) verifica-se uma maior diferenciação genética entre as populações de Itatiaia e Liberdade ($Fst = 0,28$). As duas populações do sul do Brasil, Mangueirinha e Rio Grande do Sul apresentam o menor índice de diferenciação genética ($Fst = 0,08$). Pode-se observar também, que a população de Itatiaia apresenta índices intermediários de diferenciação genética em relação às duas populações do sul ($Fst = 0,10$). (tabela 5). É possível notar ainda que o *Fst* par a par entre Teresópolis e Itatiaia e Teresópolis e Liberdade é de 0,19 e 0,16, respectivamente. Além disso, verifica-se uma relativa diferenciação genética das populações de São Francisco de Paula e Mangueirinha (sul do Brasil) com as de Teresópolis e Liberdade (sudeste do Brasil) (tabela 5).

Tabela 5. Estimativas de *Fst* par a par feitas pelo programa TFPGA.

Pops	ITA	TERE	SFPA	MANG	LIB
ITA	---				
TERE	0,1981± 0,0168	---			
SFPA	0,1085±0,0072	0,1852±0,0114	---		
MANG	0,1063±0,0086	0,1224±0,0097	0,0838±0,051	---	
LIB	0,2798±0,0164	0,1625±0,0108	0,2142±0,0118	0,1442±0,0114	---

Desvio padrão obtido por 5.000 re-amostragens.

As siglas ITA, TERE, SFPA, MANG e LIB correspondem, respectivamente a Itatiaia, Teresópolis, São Francisco de Paula, Mangueirinha e Liberdade.

4.3. Análise de UPGMA

Na figura 14 pode-se observar que as populações de São Francisco de Paula e Mangueirinha são geneticamente mais relacionadas entre as populações analisadas. Este resultado é sustentado por um alto valor do teste de bootstrap. A população de Itatiaia, localizada no sudeste do Brasil, é mais relacionada geneticamente às duas populações do sul do Brasil do que às populações do sudeste (Liberdade e Teresópolis).

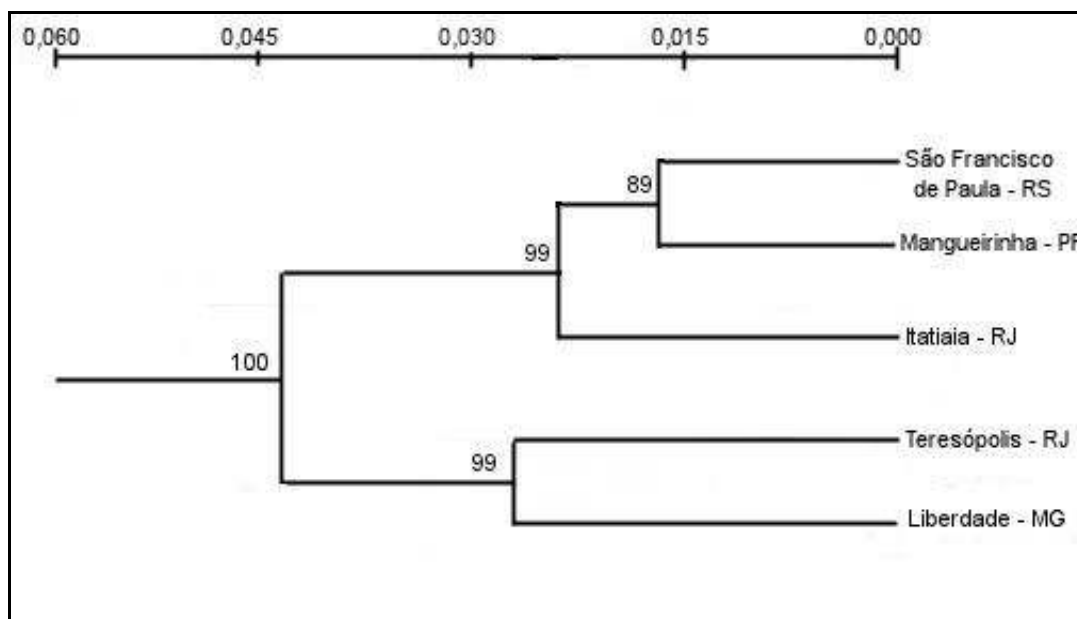


Figura 14. Dendrograma de UPGMA com as cinco populações de *Araucaria angustifolia* analisadas com as seis combinações iniciador/enzima (distância genética de Nei, 1978). Os números descritos nos ramos foram obtidos para o teste de bootstrap após 2.000 reamostragens.

A respeito das distâncias genéticas de Nei (1978) nota-se o mesmo padrão observado nas análises de *Fst* par a par (tabela 6). Embora as populações de Liberdade e Itatiaia sejam bastante próximas geograficamente, as duas

apresentam a maior distância genética observada. A população de Itatiaia é geneticamente mais relacionada à Mangueirinha que dista, aproximadamente, 866 km da primeira e as populações de Liberdade e Teresópolis, assim como visto nos cálculos de *Fst* par a par, apresentam uma grande diferenciação genética em relação as Mangueirinha e São Francisco de Paula. Conforme esperado, as duas populações localizadas na região sul do país apresentam a menor distância genética observada (tabela 6).

Tabela 6. Distâncias genéticas de Nei (1978) e distâncias geográficas (km) entre as cinco populações amostradas.

População	ITA	TERE	SFPA	MANG	LIB
ITA	---	171	964	866	54
TERE	0,047	---	1092	1021	150
SFPA	0,030	0,055	---	371	1012
MANG	0,027	0,030	0,025	---	911
LIB	0,075	0,033	0,068	0,038	---

Acima da diagonal: distância geográfica (km); abaixo da diagonal: distância genética

4.4. Análises de AMOVA – Níveis de estruturação populacional

Através das análises de AMOVA “Analysis of Molecular Variance” (Análise da variância molecular), com base nos 683 locos informativos, pôde-se verificar que 19,96 % da variabilidade genética está entre populações e cerca de 80 % se encontra entre indivíduos dentro das populações. O valor de Φ_{st} foi igual a 0,19, conforme visto na tabela 7. Cabe ressaltar que todos os valores encontrados foram altamente significativos ($p < 0,001$).

Tabela 7. Resultado da análise de variância molecular (AMOVA)

Fontes de variação	g.l	Soma dos quadrados	Componentes da variância	% da variação
Entre populações	4	3827,324	18,86931 Va	19,96
Dentro das populações	238	18012,034	75,68081 Vb	80,04
Total	242	21839,358	94,55013	
$\Phi_{st} = 0,19^*$				

g.l = graus de liberdade;

Φ_{st} = estimativa da diferença entre as heterozigosidades esperada e total das populações.

* Diferença significativa ($p < 0,001$).

4.5. Análise da distância genética versus distância espacial

Com base nas coordenadas obtidas por GPS, a localização dos indivíduos coletados em Itatiaia, São Francisco de Paula e Mangueirinha foi identificada em um mapa da área de coleta. É importante ressaltar que para as outras populações estudadas neste trabalho não se obteve coordenadas precisas para cada amostra, portanto foram excluídas desta análise.

Visando o entendimento da relação entre a distância genética e a distância espacial de *A. angustifolia*, a distância genética dos indivíduos foi comparada com a distância espacial entre eles utilizando o programa SGS “Spatial Genetic Software” (Degen *et al.* 2001a).

Observando a figura 15, onde se analisou todos os 683 locos encontrados para os indivíduos da população de Itatiaia, pode-se verificar um cruzamento preferencial entre indivíduos que distam em até 50 m entre si e uma distância genética maior do que o esperado para uma população tipicamente panmítica entre indivíduos que distam entre si entre 425 e 450 m.

Itatiaia - RJ; (683 locos AFLP)

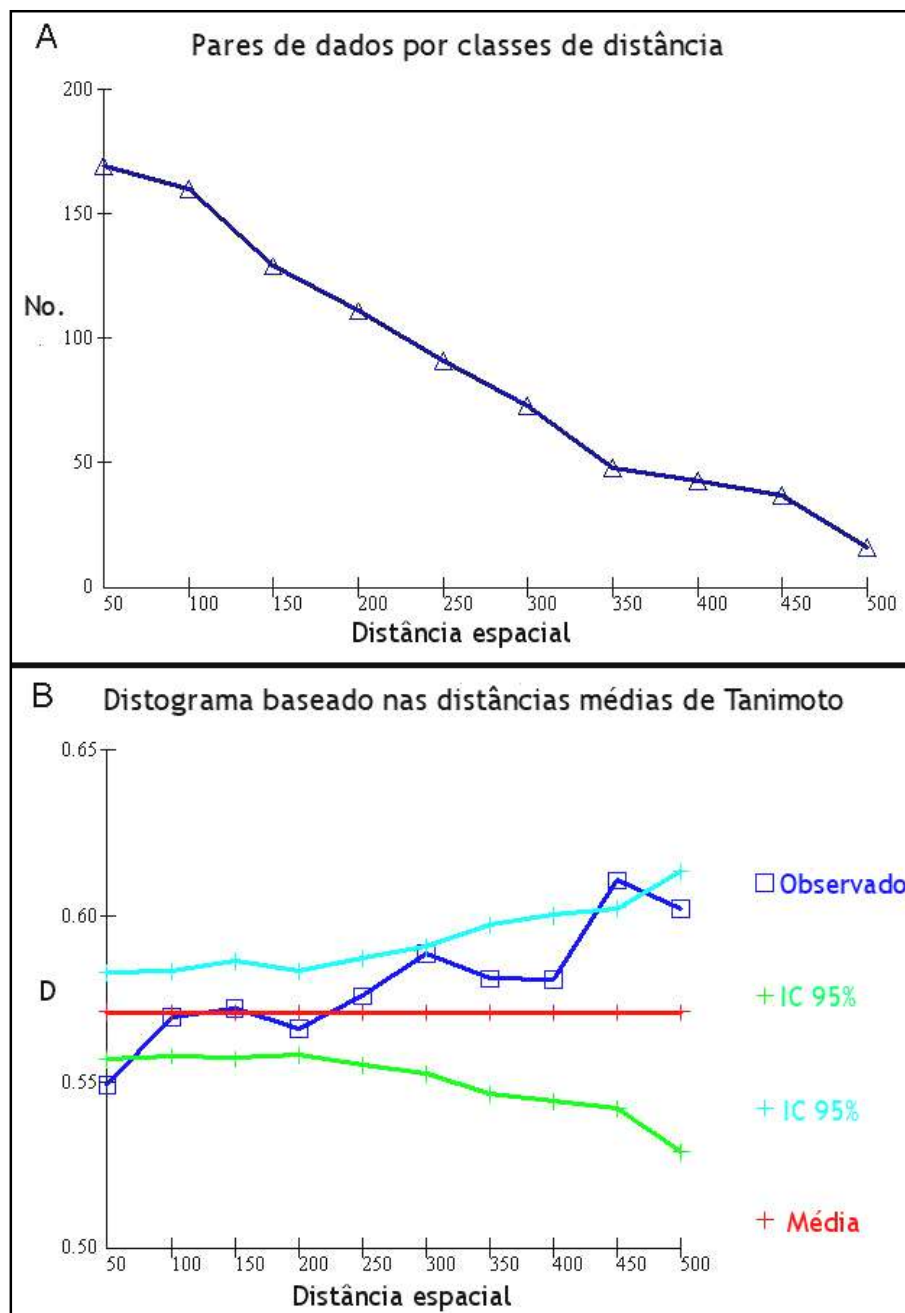


Figura 15. (A) Gráfico gerado pelo programa SGS com o número de pares de indivíduos estudados por classes de distância espacial. (B) Distograma comparando a distância espacial e a distância genética entre os 43 indivíduos de *A. angustifolia* para todas as combinações iniciador/enzima testadas na população de Itatiaia - RJ. (-) distância genética média observada entre todos os pares de indivíduos da população; (-) distância genética média observada entre todos os indivíduos compreendidos em uma determinada classe de distância espacial, (- e -) limites do teste de permutação (Intervalo de Confiança de 95%), No = número de pares de indivíduos e D = distância genética.

São Francisco de Paula - RS; (683 locos AFLP)

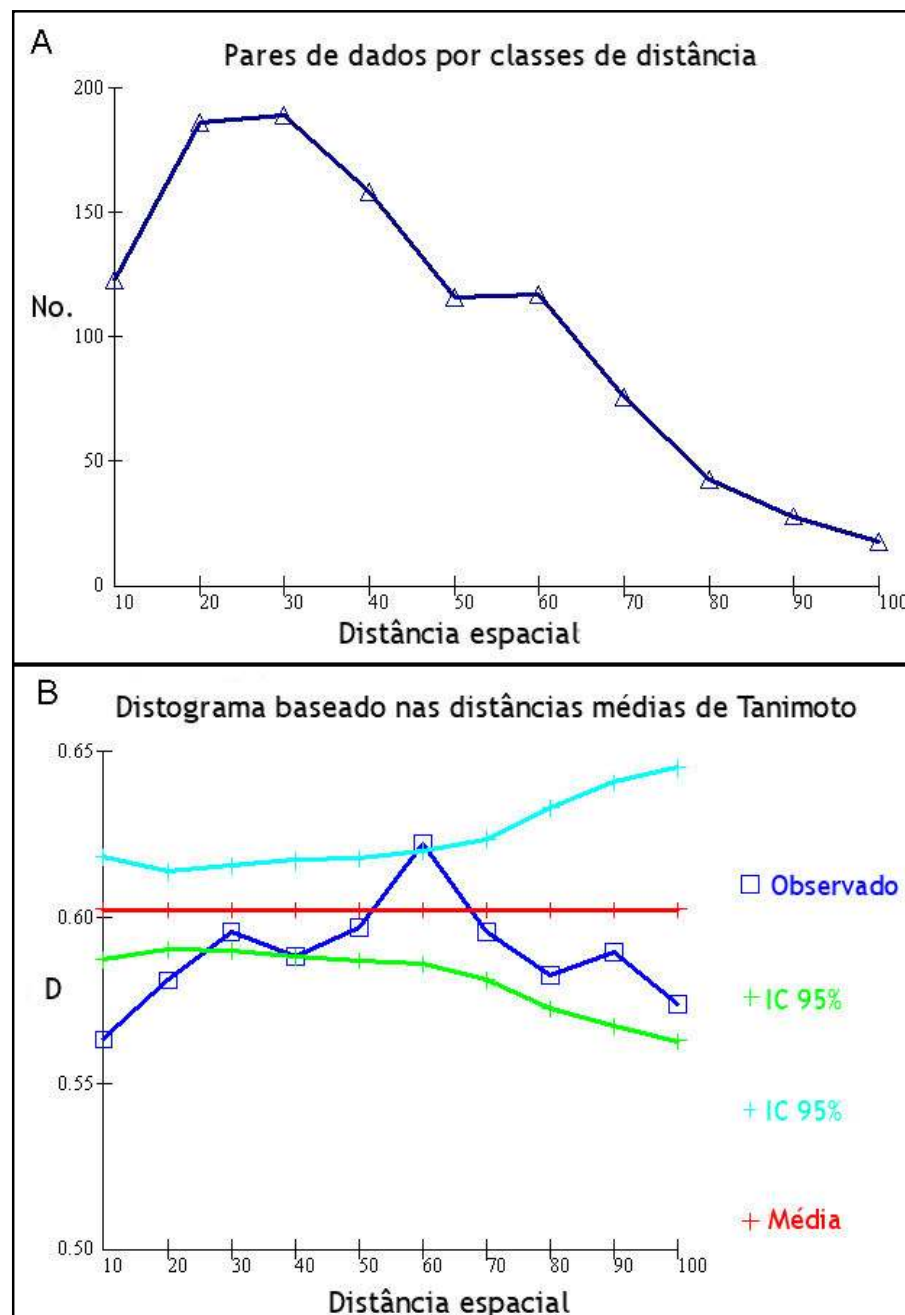


Figura 16. (A) Gráfico gerado pelo programa SGS com o número de pares de indivíduos estudados por classes de distância. (B) Distograma comparando a distância espacial e a distância genética entre os 84 indivíduos de *A. angustifolia* para todas as combinações iniciador/enzima testadas na população de São Francisco de Paula - RS. (-) distância genética média observada entre todos os pares de indivíduos da população; (-) distância genética média observada entre todos os indivíduos compreendidos em uma determinada classe de distância espacial e (- e -) limites do teste de permutação (Intervalo de Confiança de 95%). No = número de pares de indivíduos e D = distância genética.

Mangueirinha – PR, (683 locos AFLP)

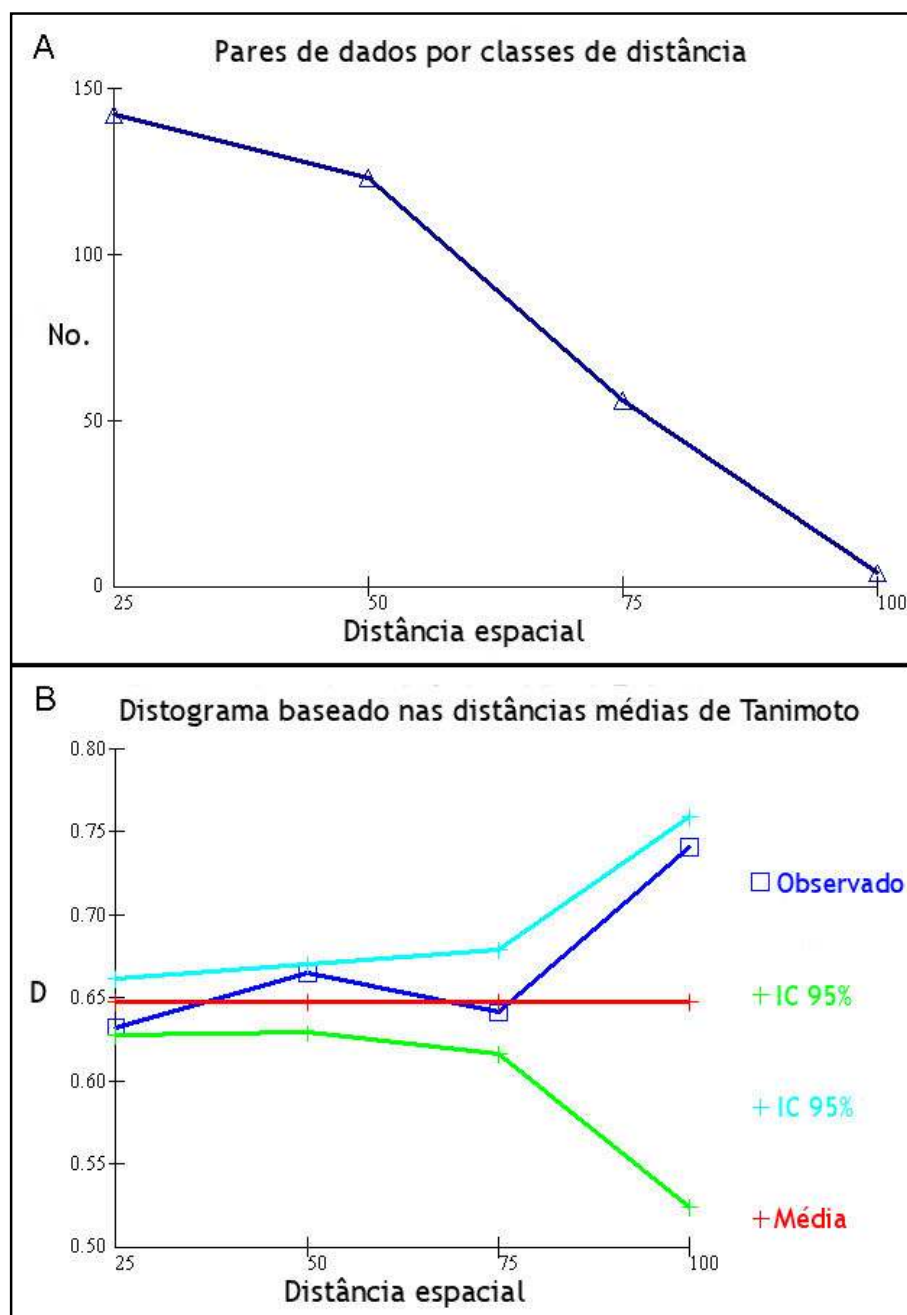


Figura 17. (A) Gráfico gerado pelo programa SGS com o número de pares de indivíduos estudados por classes de distância. (B) Distograma gerado pelo programa SGS comparando a distância espacial e a distância genética entre os 27 indivíduos de *A. angustifolia* para cada todas as combinações iniciador/enzima testadas na população de Mangueirinha - PR. (-) distância genética média observada entre todos os pares de indivíduos da população; (-) distância genética média observada entre todos os indivíduos compreendidos em uma determinada classe de distância espacial e (- e -) limites do teste de permutação (Intervalo de Confiança de 95%). No = número de pares de indivíduos e D = distância genética.

Da mesma forma que Itatiaia, a população de São Francisco de Paula também apresentou relação entre as distâncias genética e espacial (figura 16). Indivíduos que distam em até 20 m entre si são mais próximos geneticamente do que o esperado para uma população onde todos os indivíduos cruzam ao acaso.

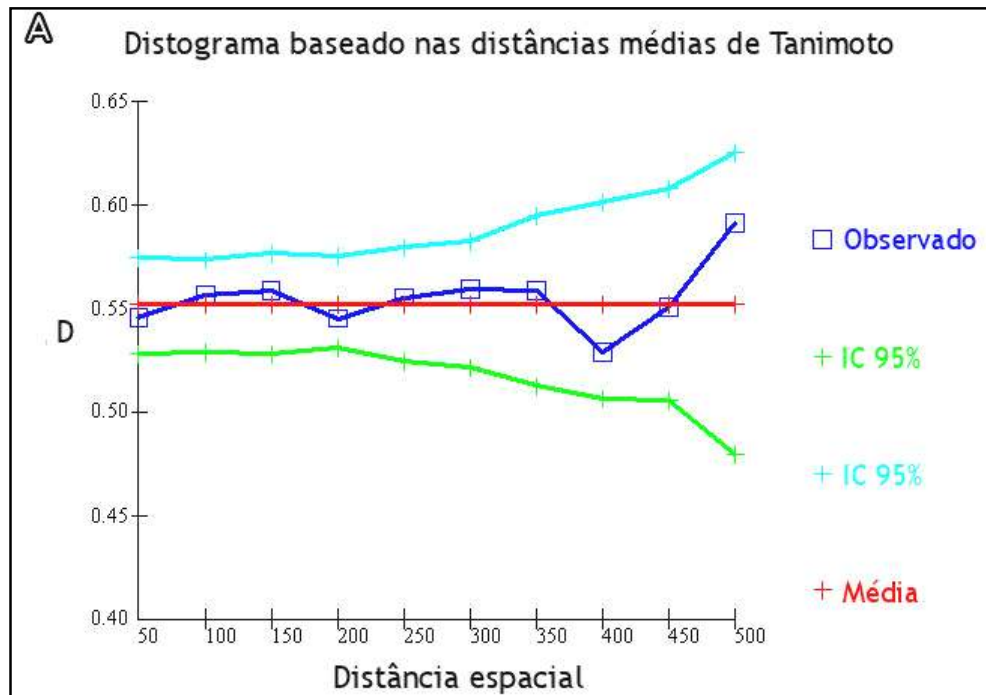
Entretanto, não se verificou nenhum tipo de relação entre a distância genética e a distância espacial na população de Mangueirinha, ou seja a população se comporta de forma panmítica. (figura 17). Cabe ressaltar que apenas 27 dos 51 indivíduos coletados nesta população foram analisados a relação entre a distância genética e a distância espacial.

4.5.1. Influência do número de locos na análise da relação da distância genética versus distância espacial

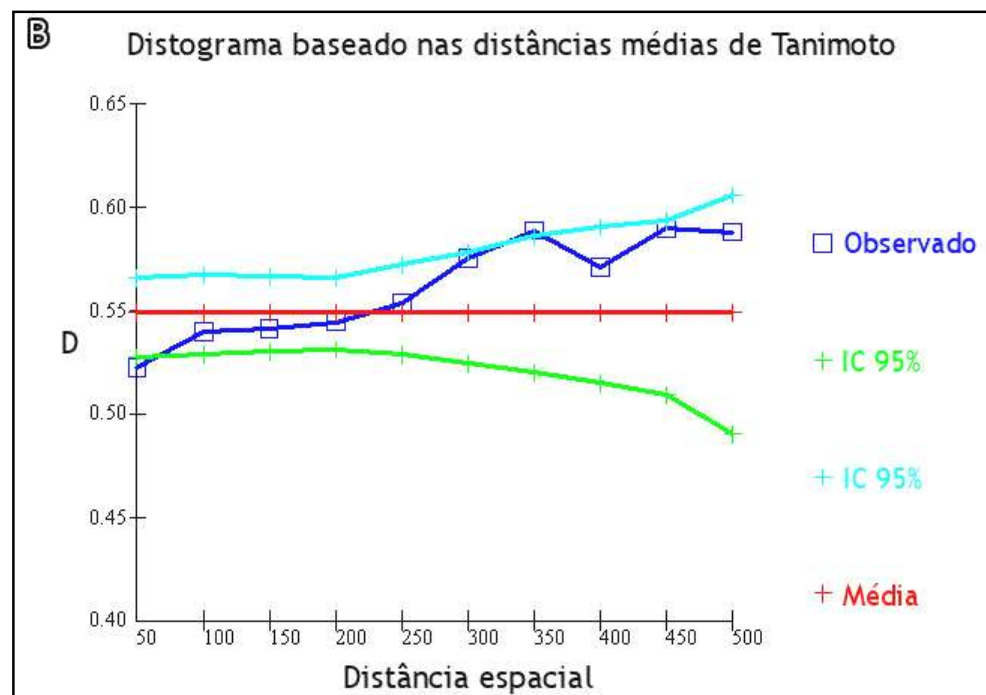
Para testar a influência do número de locos na análise da relação da distâncias genética versus distâncias espacial foram escolhidos 100, 150, 200, 300, 400 e 600 locos ao acaso nas populações de Itatiaia, São Francisco de Paula e Mangueirinha.

Itatiaia

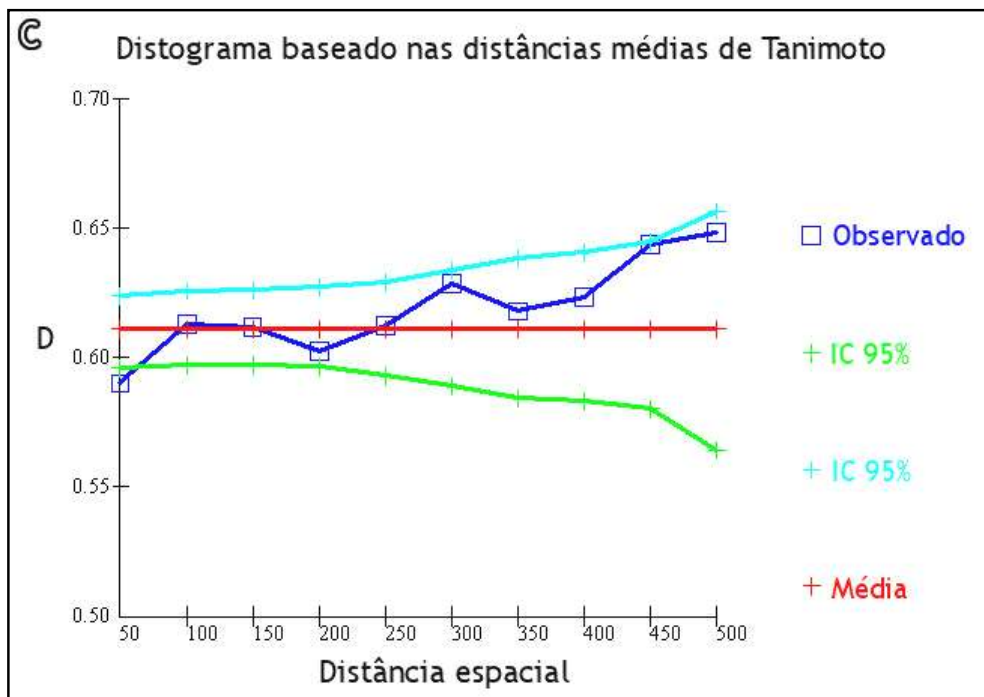
100 locos escolhidos ao acaso



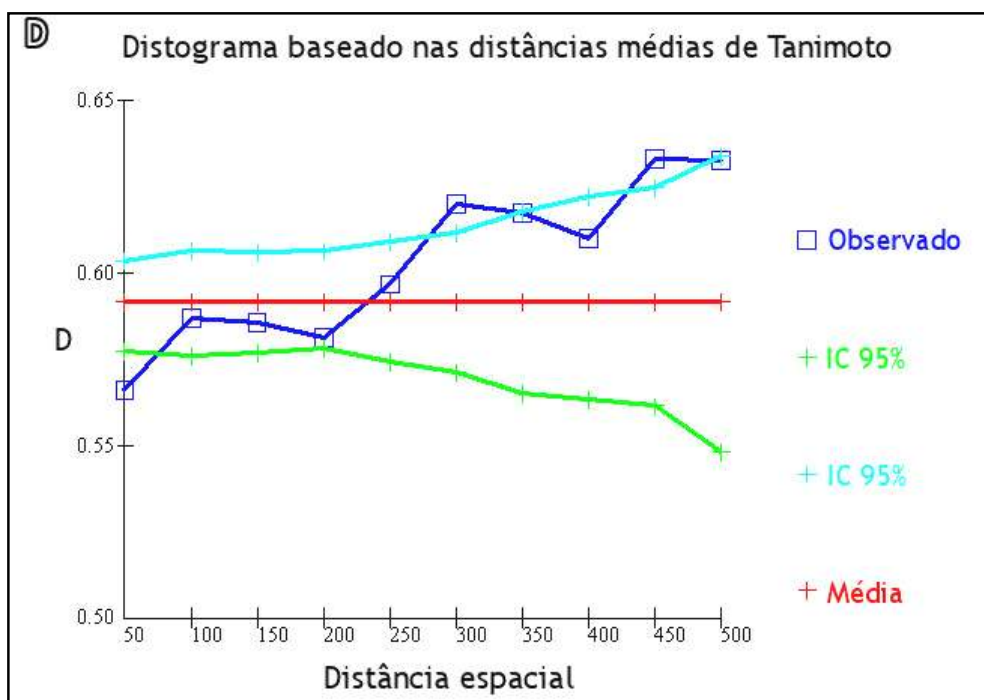
150 locos escolhidos ao acaso



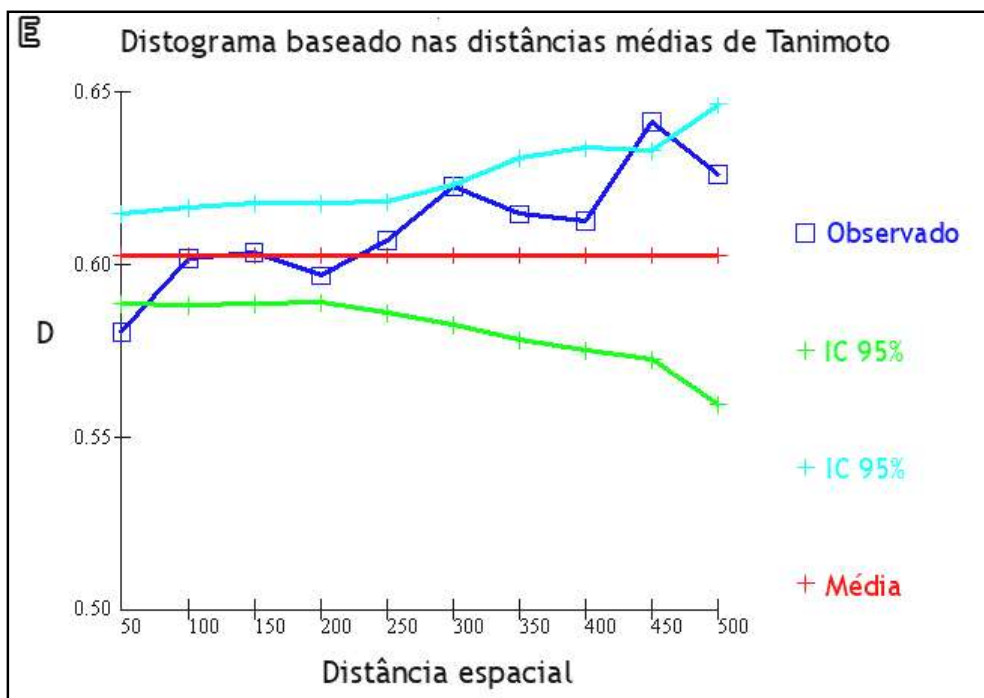
200 locos escolhidos ao acaso



300 locos escolhidos ao acaso



400 locos escolhidos ao acaso



600 locos escolhidos ao acaso

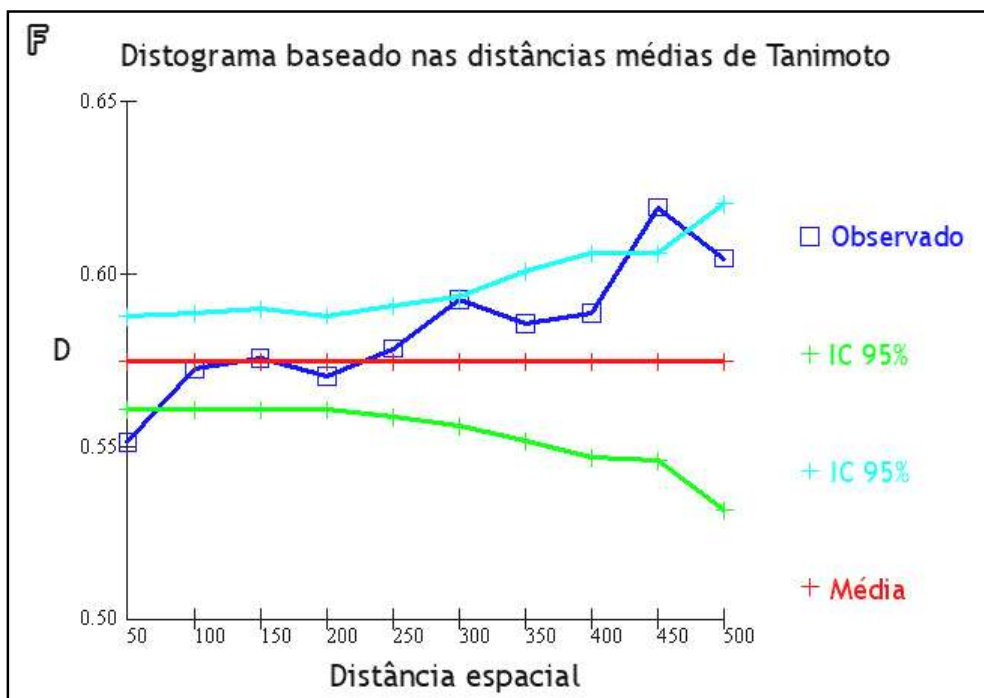


Figura 18. Distogramas gerados pelo programa SGS para os 43 indivíduos de Itatiaia. (A) 100 locos; (b) 150 locos; (C) 200 locos; (D) 300 locos; (E) 400 locos e (F) 600 locos. (-) distância genética média observada; (- - -) distância genética média observada e (- - -) limites do teste de permutação (Intervalo de Confiança de 95%).

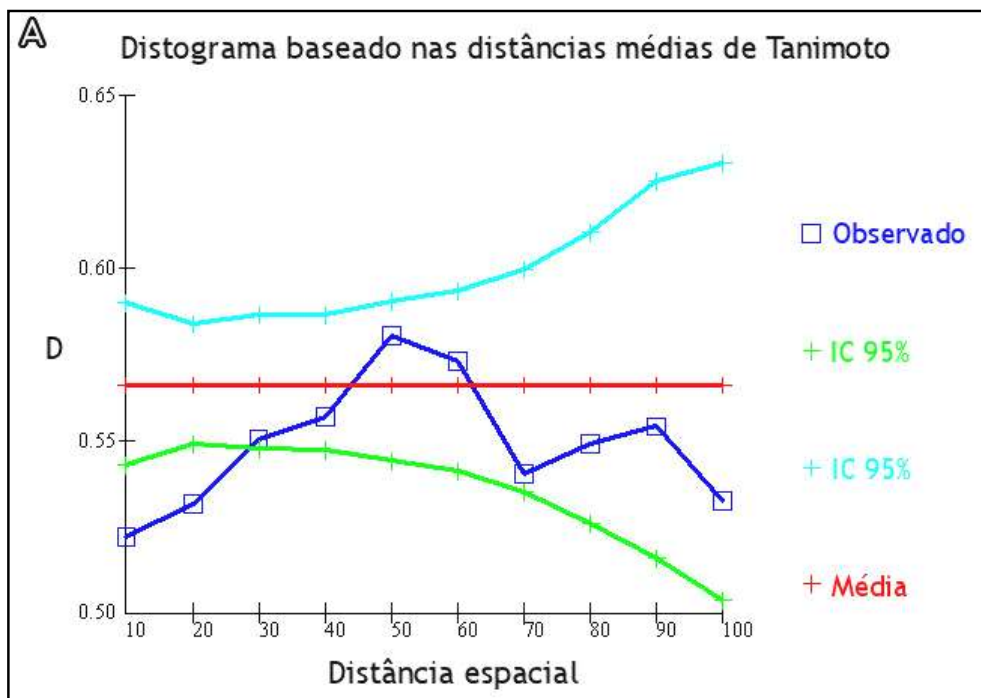
Verifica-se na figura 18B que a partir da escolha de 150 locos já se pode observar relação entre a distância genética e a distância espacial na população de Itatiaia (indivíduos que distam até 50 m entre si cruzam mais do que o esperado ao acaso). Portanto, para a detecção de relação entre as distâncias genética e espacial nesta população o número de locos mínimos a ser utilizado deve ser superior a 150. Ainda, pode-se observar que a distância genética observada entre indivíduos distantes em 300 e 450 m hora é maior do que o esperado para cruzamentos ao acaso, hora não é.

Para a população de São Francisco de Paula já é possível detectar relação entre as distâncias genética e espacial apenas com a utilização de 100 locos (figura 19A). Além disso, analisando as figuras 19E e F (distogramas das análises com 400 e 600 locos escolhidos ao acaso) pode-se observar o mesmo padrão visto com os 683 locos utilizados neste trabalho.

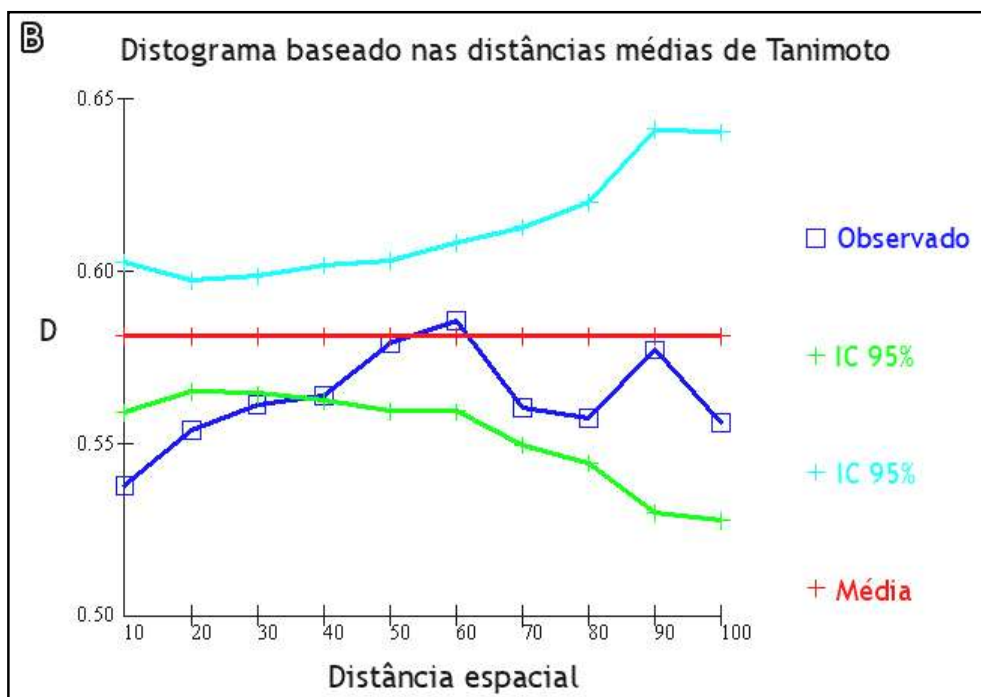
Contudo, nas análises feitas com a população de Mangueirinha, ao utilizar-se 100 locos escolhidos ao acaso (figura 20A), verifica-se uma pequena correlação entre a distância genética e a distância espacial, com indivíduos próximos entre si cruzando mais do que o esperado para uma população panmítica. Conforme é aumentado o número de locos empregados na análise nota-se que esta correlação desaparece (figuras 20 C,D, E e F).

São Francisco de Paula

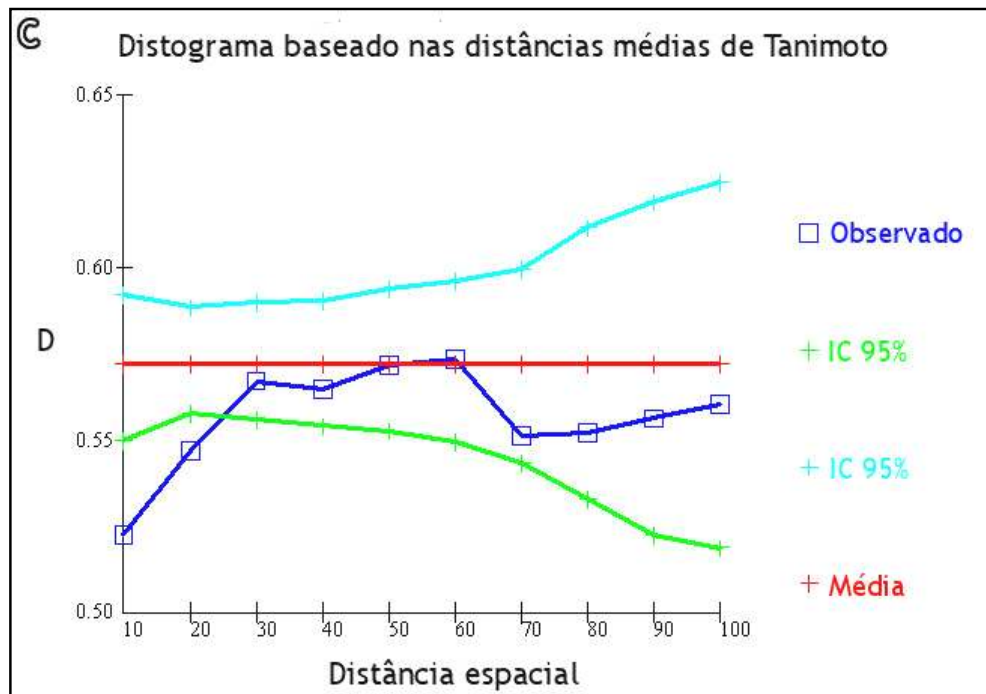
100 locos escolhidos ao acaso



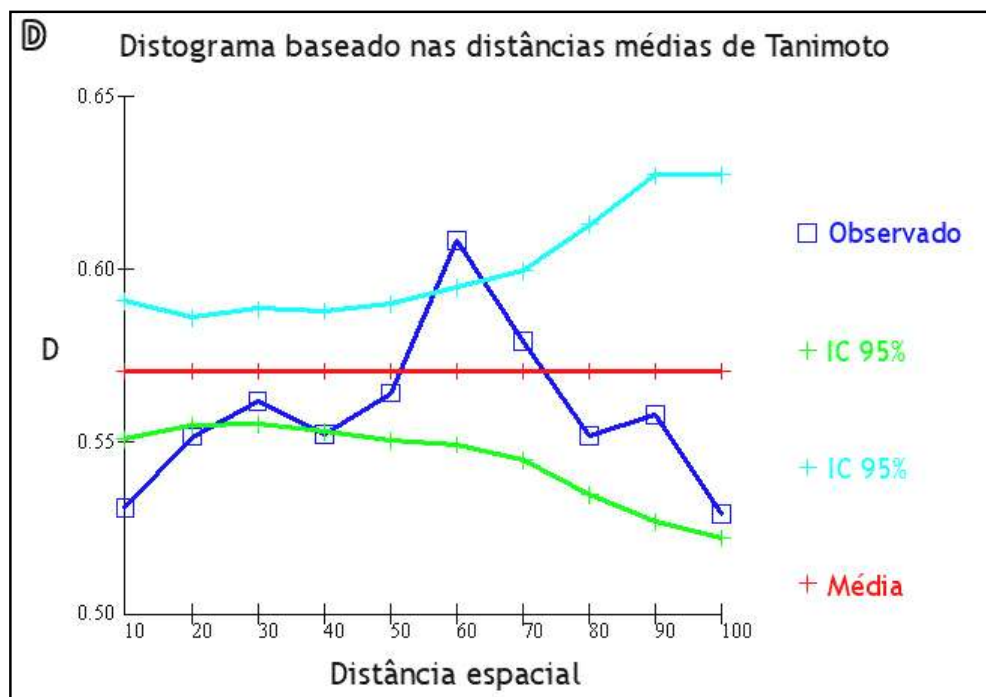
150 locos escolhidos ao acaso



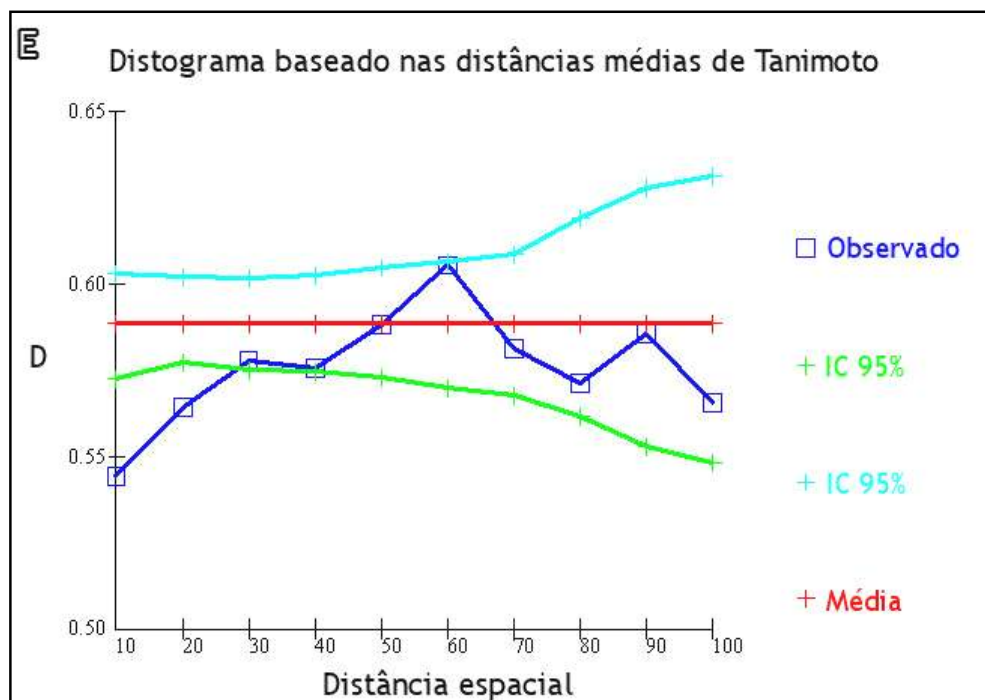
200 locos escolhidos ao acaso



300 locos escolhidos ao acaso



400 locos escolhidos ao acaso



600 locos escolhidos ao acaso

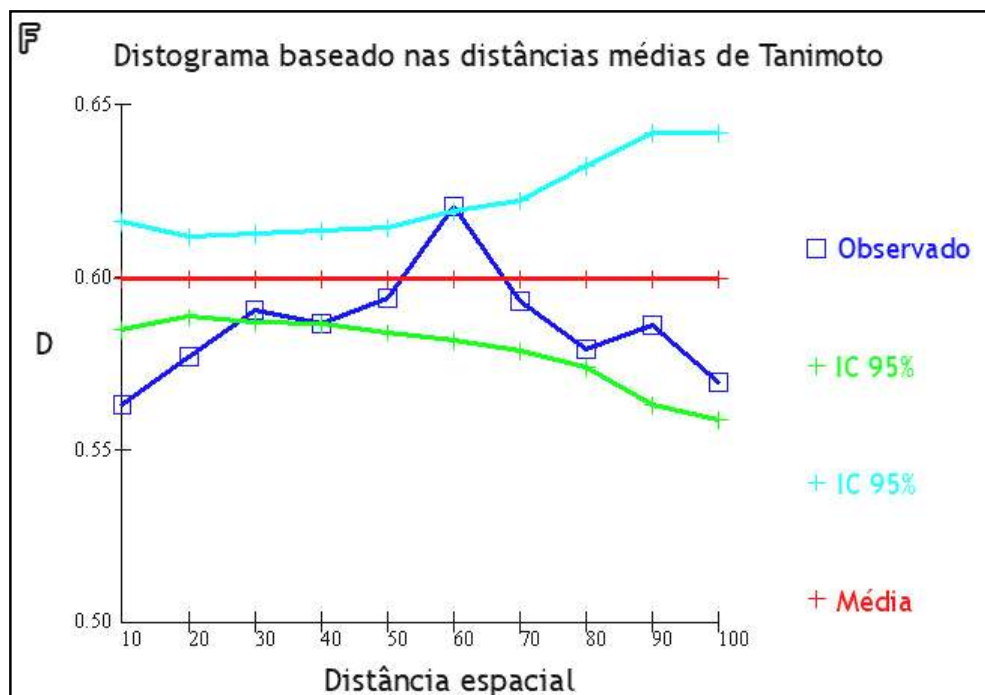
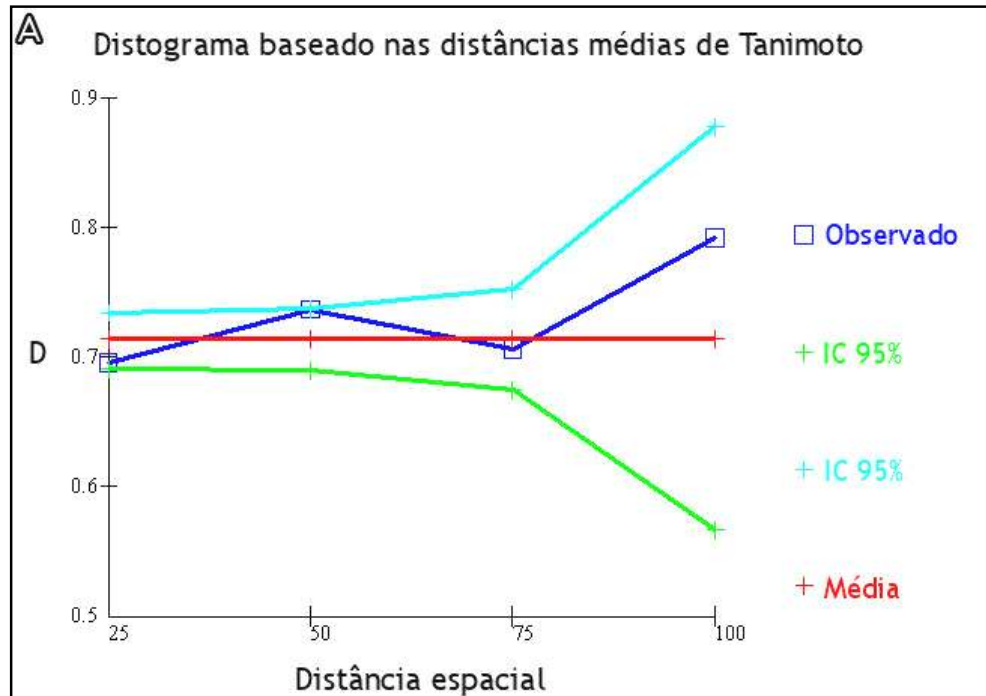


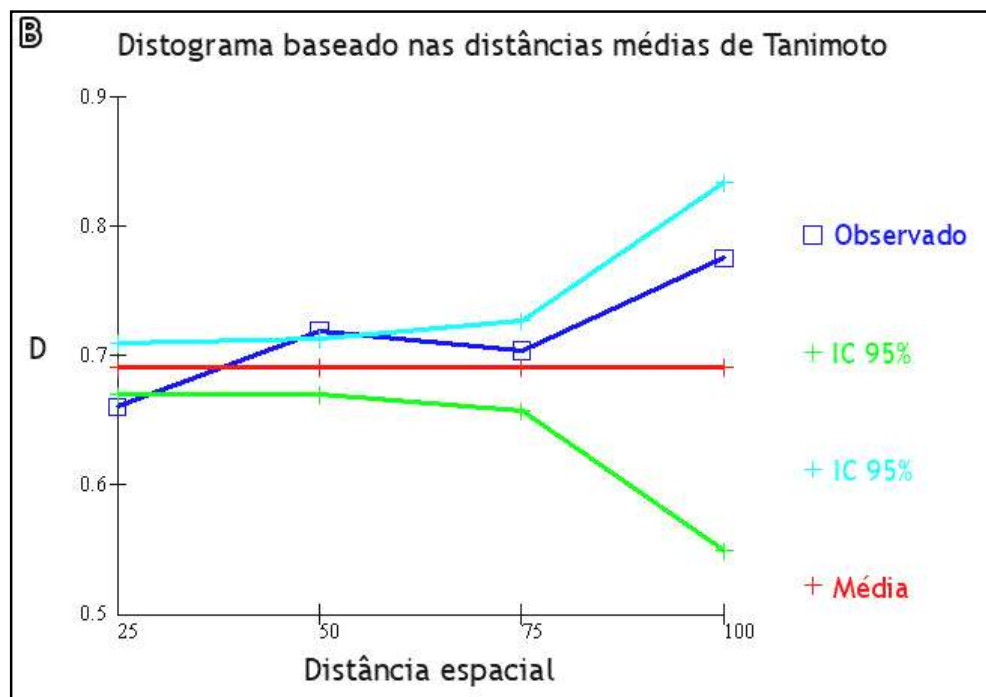
Figura 19. Distogramas gerados pelo programa SGS para os 84 indivíduos de São Francisco de Paula. (A)100 locos; (b) 150 locos; (C) 200 locos; (D) 300 locos; (E) 400 locos e (F) 600 locos. (-) distância genética média observada; (-) distância genética média observada e (- e -) limites do teste de permutação (Intervalo de Confiança de 95%).

Mangueirinha

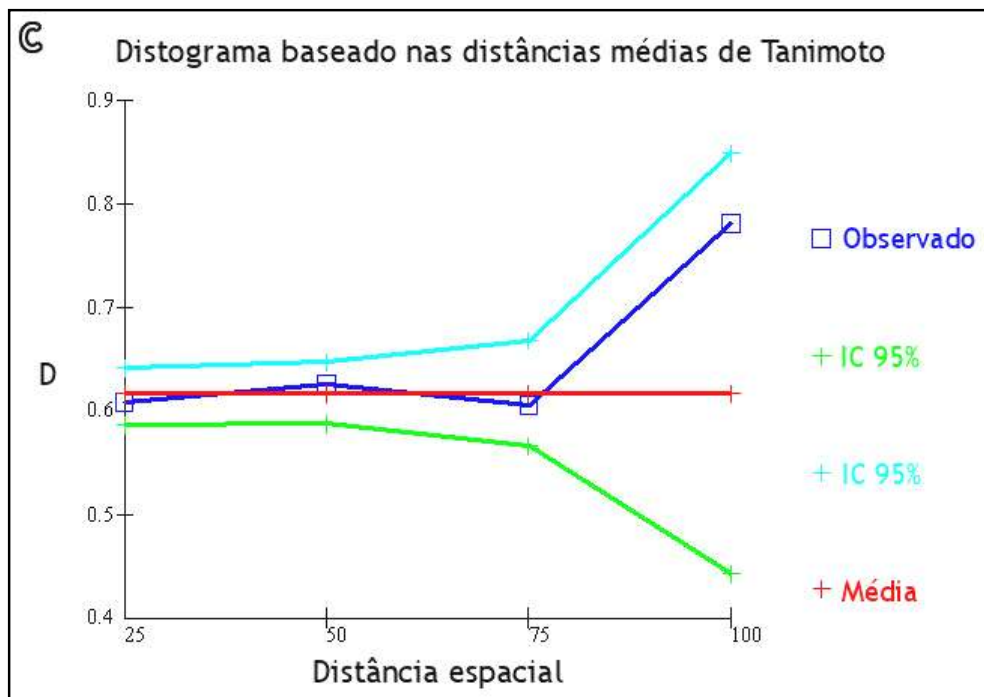
100 locos escolhidos ao acaso



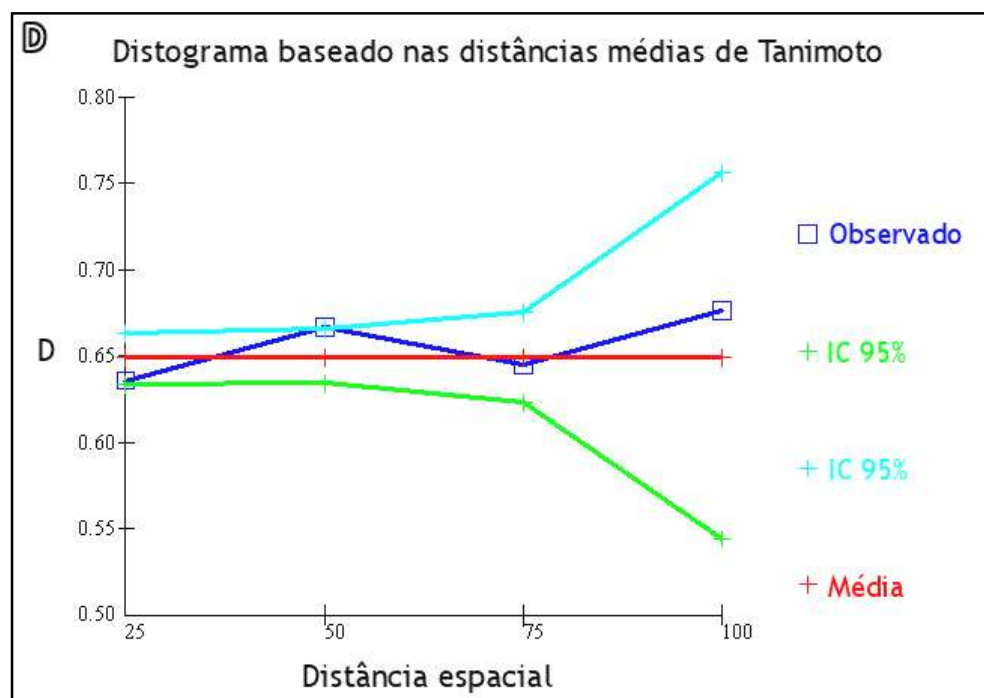
150 locos escolhidos ao acaso



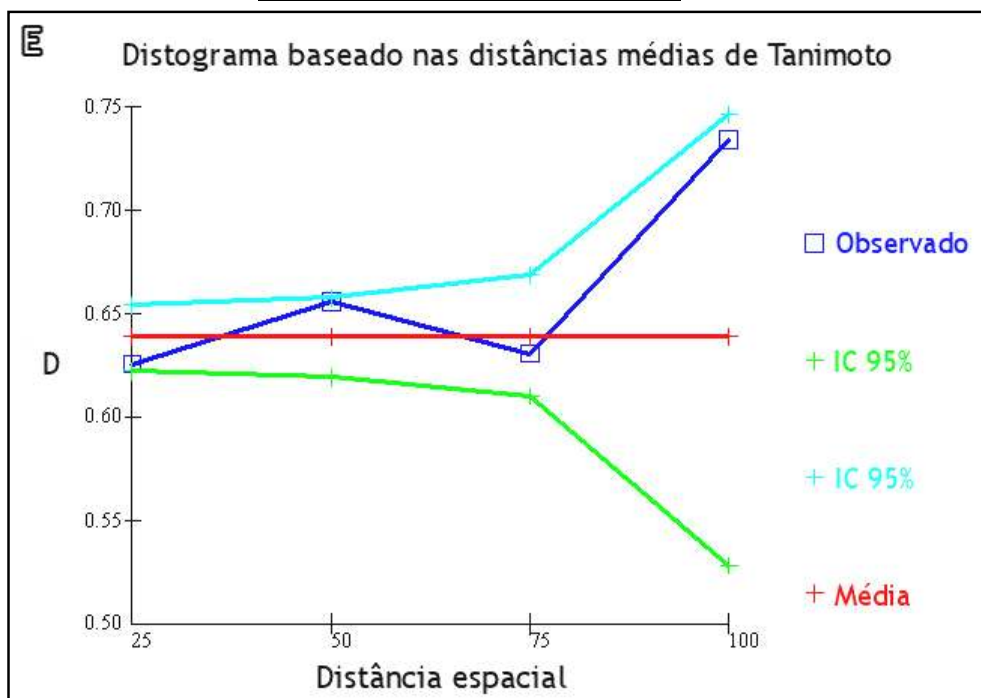
200 locos escolhidos ao acaso



300 locos escolhidos ao acaso



400 locos escolhidos ao acaso



600 locos escolhidos ao acaso

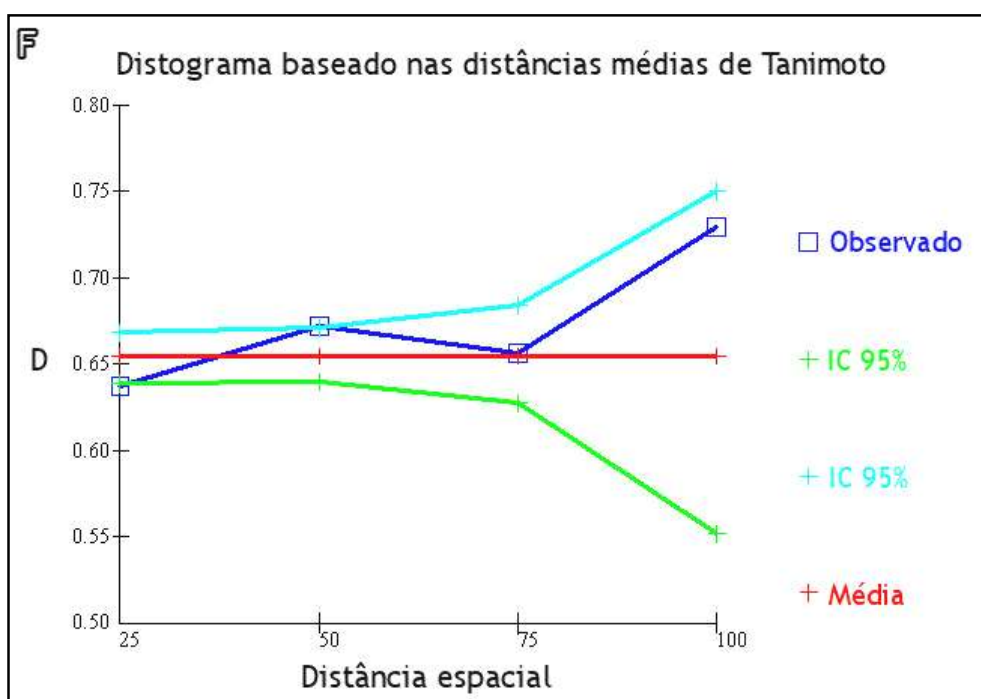


Figura 20. Distogramas gerados pelo programa SGS para os 27 indivíduos de Mangueirinha. (A) 100 locos; (b) 150 locos; (C) 200 locos; (D) 300 locos; (E) 400 locos e (F) 600 locos. (-) distância genética média observada; (- e -) limites do teste de permutação (Intervalo de Confiança de 95%).

5. Discussão

O conhecimento da distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações naturais de *A. angustifolia* é importante para o entendimento de como a distribuição desta espécie evoluiu durante as variações climáticas na América do Sul e essencial para a adoção de estratégias eficientes para conservação da espécie

Neste trabalho, com o emprego de 683 locos AFLP, foi possível verificar que embora a espécie *A. angustifolia* tenha sofrido uma intensa exploração no século passado, reduzindo sua área de distribuição, ela ainda apresenta níveis intermediários de heterozigosidade total ($H_t = 0,20$) e mantém um polimorfismo relativamente alto em cada uma das populações analisadas. Além disso, observou-se que grande parte da variação genética encontrada na espécie se deve a diferenças intrapopulacionais ($F_{st} = 0,15$ e $\Phi_{st} = 0,19$). Conforme o visto em outros trabalhos, há uma significativa diferenciação genética entre as regiões Sul e Sudeste do Brasil a exceção de Itatiaia que possui uma maior identidade genética com a população de Mangueirinha. Em relação à análise de correlação da distância espacial e genética, pôde-se verificar uma relação entre a distância genética e a distância espacial em duas das três populações analisadas (Itatiaia e São Francisco de Paula).

Observações feitas até recentemente indicavam um baixo nível de polimorfismo na espécie, com base nos caracteres morfológicos que, segundo Golfari (1971), é decorrente do fato do gênero *Araucaria* ser muito antigo, cujos registros fósseis datam do período do Médio Jurássico (160 milhões a 180 milhões

de anos atrás) (Ntima, 1968). Corroborando com trabalhos morfológicos, Peakall e colaboradores 2003, utilizando aloenzimas, marcadores microssatélites e AFLPs, verificaram polimorfismos nulos para as espécies do gênero *Wollemia* e *Agathis*, *Wollemia nobilis* e *Agathis robusta*, e baixo polimorfismo para a espécie do gênero *Araucaria*, *Araucaria cunninghamii*. Entretanto, não se verifica o mesmo padrão para as espécies da família Araucariaceae da América do Sul, Bekessy e colaboradores 2002, estudando a espécie *Araucaria araucana*, empregando marcadores RAPDs verificaram um valor de polimorfismo que pode ser considerado alto e se equipara ao visto para *Araucaria angustifolia*, no presente trabalho.

Valores próximos de heterozigidade foram encontrados em outros trabalhos com a espécie e com outras coníferas. Stefenon e colaboradores 2003, empregando o marcador AFLP, verificaram um valor de 0,156 de diversidade genética e Shimizu e colaboradores 2000, em uma população de *A. angustifolia* do Paraná, com a utilização de isoenzimas, verificaram um valor intermediário de heterozigidade (0,24), assim como o visto neste trabalho. Essa diferença encontrada pode ser devido a uma série de fatores: a natureza do marcador empregado, o número de indivíduos amostrados, o número de populações analisadas e a fitofisionomia das matas de araucária destas populações em cada um desses trabalhos. Em pinheiros do leste asiático, Kim & Lee (1998), empregando a técnica de isoenzimas, verificaram valores de heterozigidade média total de 0,205, para *Pinus sylvestris*. Em um estudo com coníferas da América do Norte, com o emprego de isoenzimas, a média de heterozigidade esperada em 20 espécies de coníferas foi de 0,207, com uma grande variação

entre espécies ($He = 0,000$ em *Pinus resinosa* a $He = 0,341$ em *Picea abies*) (Hamrick *et al.*, 1981).

Neste trabalho, tendo em vista as heterozigosidades de cada população (tabela 4), constatou-se que em populações de *A. angustifolia* que formaram contínuos florestais no passado recente (São Francisco de Paula - RS e Mangueirinha - PR) apresentam a heterozigosidade maior do que a observada nos fragmentos de populações do Sudeste brasileiro (tabela 4).

Nybom (2003), em seu trabalho, fez um apanhado de artigos sobre a diversidade genética intraespecífica de diversas espécies de plantas Gimnospermas e Angiospermas que utilizaram como marcador o RAPD. Neste trabalho, o autor procurou determinar médias de heterozigosidade dessas plantas de acordo com suas características e comportamentos (forma de vida, distribuição geográfica, sistema de cruzamento, dispersão de sementes, entre outras). Comparando o valor de heterozigosidade encontrado neste trabalho a média vista no trabalho de Nybom (2003) pôde se verificar que o índice de diversidade genético observado para a espécie *Araucaria angustifolia* é equiparado à vista para plantas perenes de ciclo longo, de ampla distribuição geográfica e que possui a dispersão de sementes por barocoria.

Com respeito da variabilidade genética, grande parte dela ocorre dentro das populações ($Fst = 0,15$, tabela 4) e este valor é próximo ao obtido com o teste de AMOVA ($\Phi st = 0,19$, tabela 7). Tal comportamento da espécie, que é tipicamente alógama e de ciclo longo, era o esperado. De acordo com Loveless & Hamrick, (1984) espécies predominantemente perenes, anemocóricas, alógamas e de ciclo longo apresentam maior variabilidade intrapopulacional do que interpopulacional.

Além disso, os valores encontrados neste trabalho são muito próximos aos de outros autores em estudos com a espécie *A. angustifolia* e outros membros da família Araucariaceae (tabela 8). É possível que o padrão observado para diferentes espécies da família Araucariaceae esteja relacionado à biologia reprodutiva dos membros desta família, que apresentam dispersão de pólen por vento e dispersão de sementes por barocoria. Com isto, é esperado que o fluxo gênico através de sementes seja limitado a curtas distâncias e que portanto, o pólen assuma uma maior importância a longas distâncias.

Tabela 8. Comparação da diversidade genética e estruturação genética em diferentes Araucariaceae

Espécies de Araucariaceae	Marcador	Nº de populações	Nº de indivíduos	Locais	<i>Fst</i>	Referências
<i>A. angustifolia</i>	AFLP	5	243	RJ, MG, PR e RS	0,15	Presente Trabalho
	AFLP	1	30	SC	-	Stefenon <i>et al.</i> , 2003
	SSR	3	60	RJ, PR e RS	0,10	Salgueiro, 2005.
	RAPD	4	72	PR	0,14	Mazza & Bittencourt, 2000
	RAPD	3	72	SC	0,06	Medri <i>et al.</i> , 2003
	Isoenzima	1	120	PR	-	Shimizu <i>et al.</i> , 2000
	Isoenzima	3	851	SP, PR e SC	0,08	Sousa <i>et al.</i> , 2004
	Isoenzima	9	328	SC	0,04	Auler <i>et al.</i> , 2002
<i>A. araucana</i>	RAPD	13	195	Chile/Argentina	0,12	Bekessy <i>et al.</i> , 2002
<i>A. bidwillii</i>	RAPD	6	131	Austrália	0,12	Pye & Gadek, 2004

RJ = Rio de Janeiro; MG = Minas Gerais; SP = São Paulo; PR = Paraná; SC = Santa Catarina; RS = Rio Grande do Sul

Em relação ao *F_{st}* par a par (tabela 5) há uma forte estruturação entre as populações do Sul e Sudeste, a exceção de Itatiaia que apresentou uma estruturação mais leve. É possível que Itatiaia tenha mantido um fluxo gênico mais intenso com a população de Mangueirinha por matas de galeria durante os períodos de contração e expansão das matas de araucária, o que explicaria a maior proximidade dessa população com as populações no sul do Brasil. Em contrapartida, observou-se uma grande estruturação entre as populações de Itatiaia (RJ) e Liberdade (MG). Provavelmente, o fluxo gênico existente entre as populações de *A. angustifolia* do Sudeste pode ser insuficiente para sobrepor os efeitos da seleção natural e da deriva genética.

A Serra da Mantiqueira, onde se encontram estas populações analisadas neste trabalho, estende-se pelo leste do Estado de São Paulo, sul de Minas Gerais e sudoeste do Rio de Janeiro, sendo um divisor de águas entre as bacias do rio Grande, em Minas Gerais, e a do rio Paraíba do Sul, em São Paulo e Rio de Janeiro. Segundo Ponçano *et al.* (1981), a Serra da Mantiqueira é formada por escarpas elevadas e morros, nos quais o planalto mineiro termina diante do Vale do Paraíba, e encontra-se dividida nesta zona em duas porções, a Serra da Mantiqueira Oriental e a Serra da Mantiqueira Ocidental. Itatiaia (RJ) está localizada na região oriental desta serra mantendo contato com Campos do Jordão (SP), enquanto Liberdade (MG) encontra-se na porção ocidental. Entre estas duas regiões há a elevação de escarpas festonadas, bastante altas (Braga & Andrade, 2005). É possível que esta elevação ocorrida no Cretáceo (Joinhas, 2002), anterior ao período de expansões e retrações das matas de araucária, possa ter dificultado um maior fluxo genético entre estas duas populações. Como

conseqüência seria esperado o valor de *Fst* relativamente alto, encontrado neste trabalho, em regiões que geograficamente são próximas entre si. Ainda, é possível que a Serra da Mantiqueira tenha servido como divisor de águas e que mesmo as prováveis dispersões de semente e fluxo de pólen, à longa distância, provindas do Sul do Brasil possam ter seguido estas duas rotas (oriente e ocidente da Serra da Mantiqueira) e com o passar de gerações as duas populações de araucária, possivelmente vicariantes, acabam por acumular diferenças genéticas entre si. Isso também não exclui que ambos os fenômenos possam ter atuado de maneira sinérgica resultando nos valores encontrados de *Fst* entre as populações.

O cálculo das distâncias genéticas de Nei (1978) (figura 14 e tabela 6) resultou em um padrão similar ao verificado nas análises de *Fst* par a par, ou seja, a diferenciação genética entre as populações do Sul e Sudeste do Brasil, a exceção de Itatiaia, e uma relativa distância entre as populações do Sudeste do Brasil (Itatiaia, Liberdade e Teresópolis).

Essa forte diferenciação entre Sul e Sudeste já foi verificada em outros trabalhos. Salgueiro (2005), em seu trabalho com araucárias do Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul, empregando marcadores microssatélites nucleares, verificou valores de distância genética de aproximadamente 0,22 entre Rio de Janeiro e Paraná e 0,29 entre Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Demarcando, então, uma forte diferenciação genética entre as duas regiões do Brasil. Sousa e colaboradores 2004, utilizando 7 locos de isoenzimas, analisaram a diferenciação genética entre populações de araucária de São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Os resultados obtidos na presente dissertação corroboram com o encontrado nestes trabalhos. A população de Campos do Jordão (SP) apresentou uma forte

diferenciação em relação às populações de Irati (PR) e Caçador (SC). Acredita-se que esta diferenciação parece estar ligada a eventos ocorridos durante o Quaternário.

Entretanto, não se pode descartar o fato de que em algum período da história evolutiva da espécie tenha ocorrido algum tipo de fluxo gênico (mediado pelo pólen ou pela dispersão de sementes) entre as duas regiões do país. É possível que, durante as alterações climáticas ocorridas no Quaternário, durante o Pleistoceno e o Holoceno (que provocaram fases de expansão e retração das florestas de araucária) tenha havido algum tipo de conexão via matas de galeria entre Itatiaia e o sul do Brasil, seguindo curso de rios. É pertinente supor que essas conexões podem ter sido o limite mais ao norte de ligação entre as bacias hidrográficas do Sul e Sudeste do Brasil. Esta conexão levou a aproximação entre as duas regiões, tornando possível algum fluxo entre populações consideradas relativamente distantes geograficamente.

Em geral, durante períodos mais frios e secos, espera-se que os pinheirais tenham ficado restritos às matas de galeria. Já em períodos com temperaturas mais altas, tenha havido a retração da área de ocorrência das florestas de araucária, que ficaram restritas a regiões mais altas, com temperaturas mais amenas, úmidas e com precipitação regular. Acredita-se que durante esses períodos a migração da *A. angustifolia* tenha ocorrido a partir de planícies de Minas Gerais e São Paulo em direção as regiões mais ao sul do Brasil (Kershaw & McGlone, 1995; Behling, 1995; Ledru *et al.*, 1996; Kershaw & Wagstaff, 2001). Ainda, existe uma grande quantidade de registros fósseis datados do Quaternário Superior encontrados nas Regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Esses

fósseis sugerem que a distribuição da araucária pode ter sido muito mais ampla no passado (Behling, 1998; Ledru *et al.*, 1998; Kershaw & Wagstaff, 2001; Behling *et al.*, 2004). Sabe-se que a expansão das florestas de araucária estaria associada principalmente a períodos mais frescos e úmidos, sem uma estação seca bem definida (Behling & Lichte, 1997; Behling, 1998; Behling, 2002, Behling *et al.*, 2004). No sul do Brasil esta expansão se deu a partir de 3.000 AP (Behling, 2002). Entretanto, pouco se sabe das expansões e retrações das matas de araucária no Sudeste do Brasil.

No entanto, não se pode abandonar a hipótese de que o homem, que utiliza o pinhão como fonte nutritiva, além de utilizar a espécie para fins de ornamentação, tenha atuado como dispersor de sementes secundário carregando sementes dos estados do Sul do Brasil para o Sudeste.

A intervenção do homem transportando sementes de uma região pra outra diminuindo a estruturação genética entre populações e aumentando a identidade genética das mesmas não é só vista na espécie *A. angustifolia*. Petit e colaboradores 2002, em seu trabalho com diversas espécies de carvalho da Europa, empregando marcadores de DNA cloroplasto, verificaram que em populações de espécies que sofreram algum tipo de gerenciamento humano (transporte de sementes, seja para ornamentação ou mesmo por interesse econômico) observou-se a diminuição do *Gst*. Para a espécie *Quercus robur* os autores verificaram uma diminuição da diferenciação genética regional na Grã-Bretanha. Eles acreditam que essa redução na diferenciação genética tenha direta relação com transferências de sementes e programas de plantação de *Q. robur* ocorridas no passado na região.

É plausível pensar que em uma população de *A. angustifolia* como a de Teresópolis pode estar ocorrendo algo semelhante ao visto com *Q. robur*, ou seja sementes de araucária provindas da região sul ou mesmo de outras regiões de floresta nativa tenham sido introduzidas no local.

Não há relatos bibliográficos sobre a presença nativa da espécie na flora do município e no local o clima e altitude propiciam o desenvolvimento da espécie.

Portanto, é possível que a interferência do homem, no provável transporte de sementes para Teresópolis, seja o fator que explique a diminuição da diferenciação genética desta população em relação a outras do Sul ou Sudeste do Brasil.

Os resultados encontrados nesse trabalho sugerem que embora grande parte da variação genética da espécie esteja a nível intrapopulacional, há uma sensível diferenciação genética entre populações de araucária localizadas em diferentes pontos da Mata Atlântica.

A diferenciação genética entre regiões aparenta estar mais relacionada a eventos naturais, relativos a história evolutiva da espécie do que a um processo atual de fragmentação da Mata Atlântica. Portanto, planos de manejo e conservação dos recursos genéticos para esta espécie podem levar isso em consideração. Para que se garanta que a grande parte da variabilidade genética exibida seja preservada, populações localizadas em cada uma dessas regiões devem ser conservadas.

Estudos de estruturação genética espacial em populações de plantas podem ser de grande importância para indicar a chave operacional dos processos evolutivos. Quando a estruturação genética espacial aumenta, ela pode influenciar

os padrões de cruzamento local e a evolução das espécies. Devido a isso, o entendimento da estrutura genética espacial ao nível populacional é crucial para o gerenciamento e conservação dos recursos genéticos visando à preservação da biodiversidade e para assegurar a sustentabilidade no meio ambiente (Frankham *et al.*, 2003; Kevin *et al.*, 2004). Florestas naturais manejadas para a produção ou conservação, costumam apresentar uma ruptura nesta estruturação genética espacial (Lowe *et al.*, 2003). Desta forma, o desenvolvimento de planos de manejo que evitem este impacto deveria ser incentivado, de maneira que a estrutura genética seja suficiente para promover a regeneração natural e manter a diversidade genética. Tendo em vista estes objetivos, uma série de estudos bastante recentes vem tentando entender a relação entre fluxo limitado de pólen e semente e os padrões de variação genética encontrados (Degen *et al.*, 2001a).

Levando isso tudo em consideração, buscou-se neste trabalho analisar a correlação entre a distância genética e a distância espacial de *A. angustifolia*.

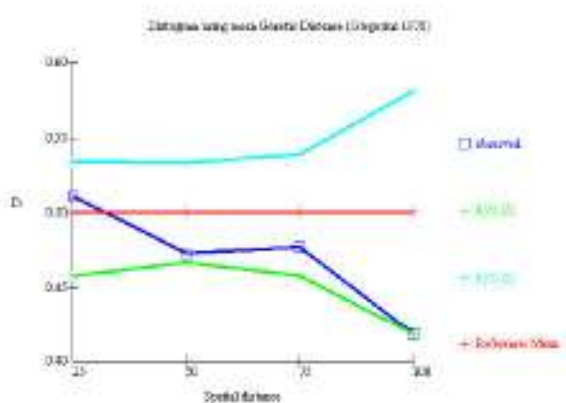
Três populações foram estudadas com base no marcador AFLP. Observou-se relação entre a distância genética e a distância espacial na população de Itatiaia (RJ) e em São Francisco de Paula (RS). No primeiro caso, a distância genética entre pares de indivíduos distantes entre si em até 50 m, foi significativamente menor do que o esperado para uma população com cruzamentos ao acaso entre os indivíduos. Isto indica que há um fluxo gênico preferencial entre indivíduos geograficamente mais próximos. Em pares de indivíduos que distam de 425 a 450 m entre si, a distância genética foi maior do que o esperado ao acaso (figura 15), indicando que o fluxo gênico é menor do que o esperado para uma população panmítica. Já na população de São Francisco de

Paula (RS) observa-se que a distância genética entre indivíduos que distam em até 20 m entre si é menor do que o esperado para uma população tipicamente em panmixia (figura 16). Uma explicação para esses cruzamentos preferenciais entre indivíduos fisicamente mais próximos entre si pode ser a própria biologia reprodutiva da espécie. A dispersão da semente da araucária é limitada a área da árvore mãe (Carvalho, 2003) e portanto é esperado que indivíduos mais próximos entre si sejam mais parecidos geneticamente. No caso particular de Itatiaia pode-se citar que esta se trata de uma população relictual. Observam-se, nessa população, manchas isoladas de vegetação compostas exclusivamente de araucária, muito próximas umas das outras. Como a polinização se dá basicamente pelo vento, isto pode favorecer cruzamentos de árvores mais próximas entre si. Além disso, em populações tipicamente fragmentadas, também há uma limitação na dispersão de sementes por animais (zoocoria), como consequência direta há o aumento da estruturação genética populacional. Essa limitação da dispersão de sementes em regiões fragmentadas é gerada por uma série de fatores: predação das sementes, diminuição da fertilização do óvulo e como resultado o decréscimo na produção de sementes (Bruna, 2002; Cascante, 2002). Já no caso de Mangueirinha (figura 17), não se verificou esta relação. Esta população é um fragmento de uma floresta contínua, não sendo totalmente isolada. Além disso, à distância entre os indivíduos adultos de araucária é maior, com poucos indivíduos jovens no interior da mata. Portanto, pode-se imaginar que o fluxo gênico não seja tão restrito, sendo mais homogêneo nessa área. Conseqüentemente, não há cruzamentos preferenciais entre indivíduos mais próximos entre si.

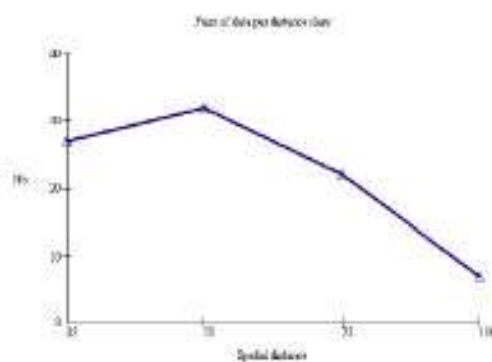
No estudo feito por Salgueiro (2005) com as mesmas populações analisadas neste trabalho, utilizando 6 a 7 locos de microsatélites nucleares, não se verificou nenhum tipo de estruturação intrapopulacional (figura 21). Neste trabalho, o autor encontrou indícios de que uma única mãe recebe pólen de vários machos, ou seja, a nuvem de pólen é heterogênea.

A) Rio Grande do Sul (SSR Nuclear)

i) Distograma

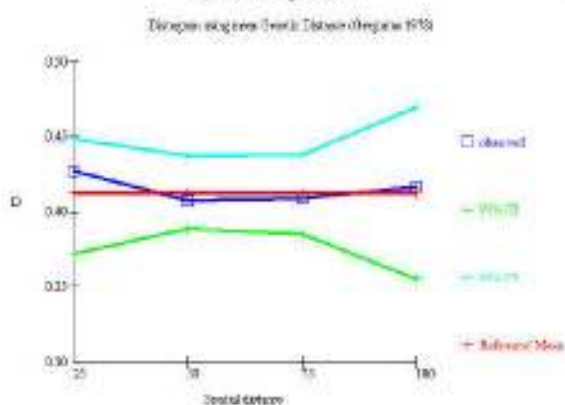


ii) Pares de dados por classe de distância física

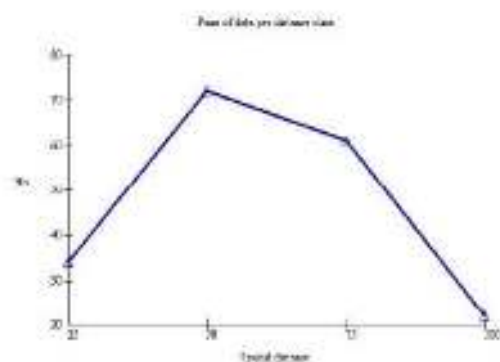


B) Paraná (SSR Nuclear)

i) Distograma



ii) Pares de dados por classe de distância física



C) Rio de Janeiro (SSR Nuclear)

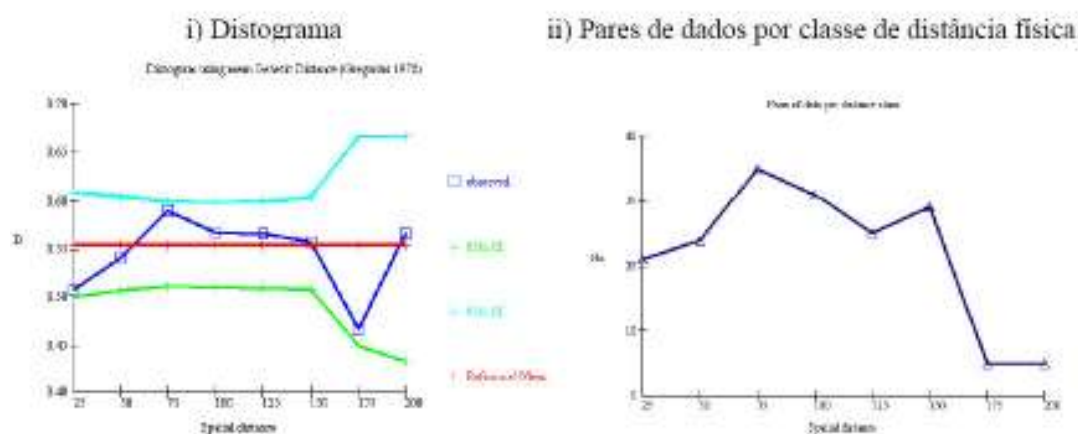


Figura 21. Distogramas gerados pelo programa SGS retirados de Salgueiro (2005). (A) 20 indivíduos de *A. angustifolia* analisados por 7 locos de microssatélites nucleares na população de São Francisco de Paula - RS; (B) 20 indivíduos de *A. angustifolia* analisados por 6 locos de microssatélites nucleares na população de Mangueirinha - PR; (C) 20 indivíduos de *A. angustifolia* analisados por 6 locos de microssatélites nucleares na população de Itatiaia - RJ. (-) distância genética média observada entre todos os pares de indivíduos da população; (-) distância genética média observada entre todos os indivíduos compreendidos em uma determinada classe de distância espacial e (- e -) limites do teste de permutação (Intervalo de Confiança de 95%).

De forma geral, é um tanto quanto intrigante que em um outro estudo analisando uma parcela dos indivíduos analisados no presente trabalho não tenha identificado nenhum tipo de estruturação. No entanto, não é a primeira vez que marcadores moleculares de natureza diferente detectam resultados diferentes. Hardesty e colaboradores 2005 estudaram 200 indivíduos da espécie *Simarouba amara* Aubl quanto a sua estrutura genética intrapopulacional empregando os marcadores AFLP e microssatélites nucleares. O que os autores encontraram foi justamente o oposto, como o observado para *A. angustifolia*. Os marcadores AFLP não detectaram nenhum tipo de estruturação populacional enquanto que os microssatélites nucleares foram capazes de identificar estruturação genética.

Cabe ressaltar que no estudo de Hardesty e colaboradores 2005, os autores acabaram por descartar as análises de AFLP após os 155 locos informativos gerados terem falhado em detectar estruturação intrapopulacional. Os autores acreditam que a dificuldade de se detectar estruturação se deve ao fato de que o número de locos utilizado pode não ter sido suficientemente alto. As perguntas geradas são: Qual a robustez do AFLP? Quantos locos informativos devem ser detectados para que os resultados sejam de confiança? Acredita-se que o número ideal de locos AFLP que devem ser usados neste tipo de estudo seja superior a 200 (Campbell *et al.*, 2003). Talvez por isso Hardesty e colaboradores 2005 não conseguiram detectar a estruturação genética intrapopulacional para *S. amara*, No caso do presente estudo, com *A. angustifolia*, foram feitos testes com escolha ao acaso de 100, 150, 200, 300, 400 e 600 locos para determinar a influência dos locos na análise da relação entre as distâncias genética e espacial. Em diferentes populações observou-se a necessidade de se utilizar mais ou menos locos de AFLP. Em Itatiaia verifica-se esta relação entre as distâncias genética e espacial a partir de 150 locos escolhidos ao acaso (figura 18). Já em São Francisco de Paula, a partir de 100 locos (figura 19) e em Mangueirinha, conforme se aumentaram o número de locos escolhidos ao acaso a relação primordialmente detectada com a utilização de 100 locos desapareceu (figura 20). Observando que a partir da utilização de 300 locos os gráficos da relação entre a distância genética e a distância espacial começam a se estabilizar é possível especular que o número ideal de locos para esta análise deve ser superior a 300. Entretanto, é provável que este não seja o único determinante para a análise da relação da distância genética versus distâncias espacial, talvez as

classes de pares de indivíduos também exerçam algum tipo de influência nesta abordagem. No presente estudo foram utilizados para a análise de correlação espacial e genética 683 locos informativos, portanto os resultados obtidos com certeza são confiáveis. Provavelmente, a diferença de resultados obtidos entre ambos os marcadores (AFLP e microssatélites nucleares) deve ocorrer devido à natureza dos marcadores moleculares. Acrescenta-se a isso o fato de que no trabalho de Salgueiro (2005), embora as análises tenham sido feitas nas mesmas populações, foram testados apenas 20 indivíduos de cada população. Enquanto que no presente estudo mais indivíduos foram analisados nas populações de Itatiaia, São Francisco de Paula e Mangueirinha (43, 84 e 27 indivíduos, respectivamente). Uma outra possibilidade é que os locos microssatélite utilizados no trabalho de Hardest e colaboradores 2005 com *Simarouba amara* são muito mais polimórficos do que os empregados por Salgueiro (2005) em *A. angustifolia*.

6. Conclusões e Perspectivas

No presente trabalho, os níveis, a organização espacial e dinâmica da diversidade genética de cinco populações de *A. angustifolia*, abrangendo grande parte da área de distribuição da espécie, foram avaliados através do marcador AFLP.

Observou-se, pela análise de distribuição da diversidade genética que a araucária apresenta a maior parte da variação genética intrapopulacional. Corroborando com outros trabalhos, verificou-se estruturação entre as populações do Sul e Sudeste brasileiro a despeito de Itatiaia que apresentou uma estruturação mais leve em relação às populações do Sul do Brasil. E também se observou estruturação elevada entre as populações do sudeste.

A espécie *A. angustifolia*, mesmo estando ameaçada de extinção ainda mantém um nível de diversidade genética intermediário, provavelmente devido ao fato de ser uma espécie longeva e por isso não sofreu ainda com o impacto causado pelo homem no século passado.

Em relação à estruturação genética intrapopulacional, das três populações analisadas (Itatiaia, São Francisco de Paulo e Mangueirinha), duas (Itatiaia e São Francisco de Paula) apresentaram cruzamentos preferenciais a curtas distâncias. Isso provavelmente ocorre devido à própria biologia reprodutiva da espécie e as características ecológicas (fisionomia) diferentes das populações.

De forma que se compreenda melhor a dinâmica e os processos envolvidos na manutenção da diversidade genética da espécie, algumas estratégias poderiam ser empregadas:

- Analisar um maior número de populações na área de ocorrência natural da espécie *A. angustifolia*, para que se possa ter um melhor entendimento da história filogeográfica da espécie;
- Investir em análises diretas de fluxo de pólen e fluxo de semente, através de testes de paternidade.

7. Referências bibliográficas

Angeli, A. & Stape, J.L. (2003) A espécie *Araucaria angustifolia*. Em: IPEF
URL: <http://www.ipef.br>

Anthony, F., Bertrand, B., Quiros, O., Wilches, A., Lashermes, P., Bertaud, J. & Charrier, A. (2001). Genetic Diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica*, **118**: 53-65.

Auler, N.M.F., Reis, M.S., Guerra, M.P. & Nodari, R.O. (2002). The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: I. Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptative variation in the state of Santa Catarina, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, **25**(3), 329-338.

Awise, J.C (1994). Molecular markers. *Natural history and evolution*. New York: Chapman & Hall. 511p.

Behling, H. (1995). Investigations into the late Pleistocene and Holocene history of vegetation and climate in Santa Catarina (S. Brazil). *Vegetation History and Archeobotany*, **4**, 127-152.

Behling, H. (1997). Late Quaternary vegetation, climate and fire history of the *Araucaria* forest and campos region from Serra Campos Gerais, Paraná State (South Brazil). *Review of Palaeobotany and Palynology*, **97**, 109-121.

Behling, H. (1998). Late Quaternary vegetational and climatic changes in Brazil. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **99**(2), 143-156.

Behling, H. (2002). South and southeast Brazilian during late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **177**(1-2), 19-27.

Behling, H., Lichte, M. (1997). Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical southeastern Brazil. *Quaternary Research*, **48**(3), 348-358.

Behling, H., Bauermann, S.G., Neves, P.C.P. (2001). Holocene environmental changes in São Francisco de Paula region, southern Brazil. *Journal of South American Earth Sciences*, **14**, 631-639.

Behling, H, Pillar, V.D., Orlóci, L. & Bauermann, S.G. (2004). Late Quaternary *Araucaria* forest, grassland (Campos), fire and climate dynamics studied by high-resolution pollen, charcoal and multivariate analysis of Cambará do Sul core in southern Brazil. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **203**, 277-297.

Bekessy, S.A., Allnutt, T.R., Premoli, A.C., Lara, A., Ennos, R.A., Burgman, M.A., Cortes, M. & Newton, A.C. (2002). Genetic variation in the vulnerable and endemic Mokey Puzzle tree, detected using RAPDs. *Heredity*, **88**, 243-249.

Berg, E.E., Hamrick, J.L. (1997). Quantification of diversity at allozyme loci. *Canadian Journal Forest Research*, **27**, 415-424.

Boçon, R. (1995). Análise das relações ecológicas entre o grimpeirinho, *Leptastenura sectaria* e pinheiro, *Araucaria angustifolia*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.

Brade, A.C. (1956). A flora do Parque Nacional do Itatiaia. Parque Nacional do Itatiaia, Ministério da Agricultura.

Braga, F.M.S. & Andrade, P.M. (2005). Distribuição de peixes na microbacia do Ribeirão Grande, Serra da Mantiqueira Oriental, São Paulo, Brasil. *Inheringia, Série Zoologia*, **95**(2), 121-126.

Bruna, E.M. (2002). Effects of Forest fragmentation on *Heliconia acuminata* seedling recruitment in central Amazonia. *Oecologia*, **132**, 235-245.

Campbell, D., Duchesne, P. & Bernatchez, L. (2003). AFLP utility for population assignment studies: analytical investigation and empirical comparison with microsatellites. *Molecular Ecology*, **12**, 1979-1991.

Carvalho, P.E.R. (2003) Espécies Arbóreas Brasileiras. EMBRAPA.

Cascante, A., Quesada, M., Lobo, J.J. & Fuchs, E.A. (2002). Effects of dry tropical Forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation biology*, **16**(1), 137-147.

Castella, P.R., Britez, R.M. (2004). A floresta com araucária no Paraná: conservação e diagnóstico dos remanescentes florestais. Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná.

Chagne, D., Lalanne, C., Madur, D., Kumar, S., Frigerio, J.M., Krier, C., Decroocq, S., Savoure, A., Bou-Dagher-Kharrat, M., Bertocchi, E., Brach, J. & Plomion, C. (2002). A high density genetic map of maritime pine based on AFLP's. *Annals of Forest Science*, **59**(5-6), 627-636.

Chung, M.G., Epperson, B.K. (2000). Spatial structure of allozyme polymorphism in a population of *Eurya japonica*. *Silvae Genetica*, **49**(1), 1-4.

Coles, J.F., Fowler, D.A. (1976). A inbreeding in neighbouring trees in two White Spruce population. *Silvae Genetica*, **25**(1), 29-34.

Degen, B., Caron, H., Bandou, E., Maggia, L., Chevallier, M.H., Leveau, A., Kremer, A. (2001a). Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPD's. *Heredity*, **87**, 497-507.

Drummond, J.A. (1997). Devastação e preservação ambiental – Os Parques Nacionais do Estado do Rio de Janeiro. Niterói: Eduff.

Eldridge, K.G., Griffin, A.R. (1983). Selfing effects in *Eucalyptus regnans*. *Silvae Genetica*, **31**, 216-221.

Epperson, B.K. (2004). Multilocus estimation of genetic structure within populations. *Theoretical Population Biology*, **65**(3), 227-237.

Excoffier, L.G. Laval, & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*.

Ferreira, M.E., Gratappaglia, D. (1995). Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. EMBRAPA. Brasília.

Frankham, R., Ballou, J. & Briscoe, D.A. (2003). Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press.

Florin, R. (1963). The distribution of conifer and taxad genera in time and space. *Acta Horti Bergiana*, **20**, 122-312.

FUPEF (Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná). (1978). Inventário florestal do pinheiro no sul do Brasil. Relatório Final. Curitiba, Brasil.

FUPEF (Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná). (2001). Projeto de conservação e utilização sustentável da diversidade biológica – PROBIO, subprojeto Conservação do Bioma Floresta com Araucária. Curitiba, Brasil.

Gerber, S., Mariette, S., Streiff, R. Bodenes, C. & Kremer, A. (2000). Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Molecular Ecology*, **9**(8), 1037-1048.

Golfari, L. (1971). Coníferas aptas para reflorestamento dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (71 pp.). Rio de Janeiro, IBDF.

Guerra, M.P., Silveira, V., dos Reis, M.S. & Schneider, L. (2002). Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia* [Bert]). Em: Simões, L.L. & Lino, C.F. *Sustentável Mata Atlântica: A exploração de Seus Recursos Florestais* (pp. 85-101) São Paulo, Brasil: Editora Senac.

Gurgel, J.T.A. & Gurgel Filho, O.A. (1965). Evidências de raças geográficas no pinheiro-brasileiro, *Araucaria angustifolia* [Bert] O. Ktze. *Ciência e Cultura*, **7**. 33-39.

Hampp, R., Mertz, A., Schaible, R., Schwaigerer, M. & Nehls, U. (2000). Distinction of *Araucaria angustifolia* seeds from different locations in Brazil by a specific DNA sequence. *Trees*, **14**, 429-434.

Hamrick, J.L. (1983). The distribution of genetic variation within and among natural plant population. Em: Schone-Wald-Cox, C.M., Chambers, S.H., MacByde, B., Thomas, L. (Eds.), *Genetics and conservation* (pp. 335-349). Menlo Park: Benjamin Cummings.

Hamrick, J.L., Mitton, J.B. & Linhart, Y.B. (1981). Levels of genetic variation in trees: influence of the life history characteristics. Em: Conkle (Ed.): *North American Forest Trees and Insects* (pp. 35-41). USDA.

Hardesty, B.D., Dick, C.W., Kremer, A., Hubbell, S. & Bermingham, E. (2005). Spatial genetic structure of *Simarouba amara* Aubl. (Simaroubaceae), a dioecious, animal-dispersed, Neotropical tree, on Barro Colorado Island, Panama. *Heredity*, 1-8.

Hueck, K. (1966). Die Wälder Südamerikas. Fischer-Verlag. Stuttgart, Alemanha.

IUCN. (2004) IUCN Red List of Threatened Species. Ed. Varty, N. & Guadagnin, D.L. Em:

Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (2005).URL: <http://www.jbrj.gov.br>

Joinhas, L.A. (2002). Proposta evolutiva da paisagem no extremo Sudoeste do Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista.

Keiper, F.J. & McConchie, R. (2000). An analysis of genetic variation in natural populations of *Sticherus flabellatus* [R. Br. (St. John)] using amplified length fragment polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology*, **9**(5), 571-581.

Kershaw, A.P. & McGlone, M.S. (1995). The quaternary history of the southern conifers. Em: Enright, N.J & Hill, R.S. (Eds.) *Ecology of the Southern Conifers* (pp. 342). Melbourne University Press.

Kershaw, P. & Wagstaff, B. (2001). The southern conifer family Araucariaceae: history, status, and value for paleoenvironmental reconstruction. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **32**, 397-414.

Kevin, K.S., Lee, S.R. & Koh, C.L. (2004). Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. *Molecular Ecology*, **13**, 657-669.

Kim, Z.S. & Lee, S.W. (1998). Genetic diversity in East-Asian Pinus species. Em: Puri, S. (Ed.) *Tree Improvement. Applied Research and Technology Transfer* (pp. 205-219). . New Hampshire, EUA: Science Publishers Inc

Kremer, A., Mariette, S. (2003). Molecular markers in population genetics. Em: *Molecular markers in plant genetics and biotechnology* (pp. 125-151). Plymouth, UK: Science Publishers Inc.

Labouriau, L.F.G & Matos Filho, A. (1948). Notas Preliminares sobre a região de Araucária. Em: *Anuário Brasileiro de Economia Florestal*, 1. Rio de Janeiro, Brasil.

Ledru, M.P., Braga, P.I.S, Soubiès, F., Fournier, M., Martin, L., Suguio, K., Turcq, B. (1996). The last 50,000 years in the Neotropics (Southern Brazil): evolution of vegetation and climate. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **123**, 239-257.

Ledru, M.P., Salgado-Laboriau, M.L. & Lorscheitter, M.L. (1998). Vegetation dynamics in southern and central Brazil during the last 10,000 yrs BP. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **99**(2), 131-142.

Levin, D.A. (1984). Inbreeding Depression and Proximity-Dependent Crossing succes in *Phlox drummondii*. *Evolution*, **38**, 116-127.

Levin, D.A. & Kerster, H.W. (1974). Gene flow in seed plants. *Evolutional Biology*, **30**, 139-220.

Lorenzi, H. (1992). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum.

Loveless, M.D., Hamrick, J.L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **15**, 65-95.

Loveless, M.D., Hamrick, J.L. (1987). Distribucion de la variacion en espécies de arboles tropicales. *Revista Biologia Tropicales*, **35**(1), 165-175.

Lowe, A.J., Jourde, B., Breyne, P., Colpaert, N., Navarro, C., Wilson, J. & Cavers, S. (2003). Fine-scale genetic structure and gene flow within Costa Rican population of mahogany (*Swietenia macrophylla*). *Heredity*, **90**(3), 268-275.

Manubens, A., Lobos, S., Jadue, Y., Toro, M., Messina, R., Lladser, M. & Seelenfreund, D. (1999). DNA isolation and AFLP fingerprinting of nectarine and peach varieties (*Prunus persica*). *Plant Molecular Biology Reporter*, **17**(3), 255-267.

Marquesini, N.R. (1995). Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil: guarani, kaingang, xokleng, ava-guarani, kraô e cayuá. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

Mattos, J.R. (1994). O pinheiro-brasileiro. Artes Gráficas Princesa LTDA. Lages, SC.

Mazza, M.C.M, Bittencourt, J.V.M. (2000). Caracterização genética de quatro populações naturais de *Araucaria angustifolia* no estado do Paraná por meio de marcadores RAPD. EMBRAPA Florestas - Laboratório de Genética Molecular, Paraná.

Medri, C., Ruas, P.M., Higa, A.R., Murakami, M. & Ruas, C.D. (2003) Effects of forest management on the genetic diversity in a population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. *Silvae Genetica*, 52(5-6), 202-205.

Miller, M.P. (1997). Tools for population genetic analysis (TFPGA).

Muellner, A.N, Tremetsberger, K., Stuessy, T. & Baeza, C.M. (2005). Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hipochaeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). *Molecular Ecology*, 14(1), 203-212.

Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.

Neigel, J.E. (1997). A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28, 105-128.

Ntima, O.O. (1968). The Araucarias (139 pp.). Oxford: Commonwealth Forestry Institute.

Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13, 1143-1155.

Oliveira, P.T.T.M. de (1999). Relações entre o crescimento urbano e as características da drenagem fluvial no município de Teresópolis – RJ. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Park, Y.S., Fowler, D.P. (1982). Effects of inbreeding and genetic variances in a natural population of tamarack (*Larix laricina* (Du Roi) K. Koch) in eastern Canada. *Silvae Genetica*, 31, 21-26.

Peakall, R., Ebert, D., Scott, L.J., Meagher, P.F., Offord, C.A. (2003). Comparative genetic study confirms exceptionally low genetic variation in the ancient and endangered relictual conifer, *Wollemia nobilis* (Araucariaceae). *Molecular Ecology*, 12, 2331-2343.

Petit, R.J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D. & Vendramin, G.G. (2005). Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, **14**(3), 689-701.

Petit, R.J., Csaikl, U.M., Bordács, S., Burg, K., Coart, E., Cottrell, J., Van Dam, B., Deans, J.D., Dumolin-Lapègue, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Gillies, A., Glaz, I., Goicoechea, P.G., Jensen, J.S., König, A.O., Lowe, A.J., Madsen, S.F., Mátyás, G., Munro, R.C., Olalde, M., Pemonge, M.H., Popescu, F., Slade, D., Tabbener, H., Turchini, D., de Vries, S.G.M., Ziegenhagen, B. & Kremer, A. (2002). Chloroplast DNA variation in European white oaks. Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management*, **156**, 5-26.

Ponçano, W.L., Carneiro, C.D.R., Bistrichi, C.A., Almeida, F.F.M. & Prandini, F.L. (1981). Mapa geomorfológico do Estado de São Paulo, São Paulo, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, **1**. 38-41.

Prefeitura de Liberdade – MG (2005). <http://www.liberdade.mg.gov.br>

PUC-RS (2004). Projeto Pró-Mata. <http://www.pucrs.br/ima/promata/index.htm>

Pye, M.G., Gadek, P.A. (2004). Genetic diversity, differentiation and conservation in *Araucaria bidwillii* (Araucariaceae), Australia's Bunya pine. *Conservation Genetics*, **5**(5), 619-629.

Rambo, B. (1951). O elemento Andino no Pinhal Rio-Grandense. Em: *Anais Botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues*, **3**, 3-36.

Reitz, P.R., Klein, R.M., Reis, A. (1988). Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. Companhia Rio-Grandense de Artes Gráficas.

Ritland, K., & Jain, S.K. (1981). A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity*, **47**, 35-52.

Salgado-Laboriau, M.L. (1994). História Ecológica da Terra. Editora Edgar Blücher LTDA.

Salgueiro, F. (2005). Análise da organização e dinâmica da diversidade genética de duas espécies da Mata Atlântica Brasileira: *Araucaria angustifolia* [Bert.] O. Kuntze e *Eugenia uniflora* L. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Schönherr, J. & Pedrosa-Macedo, J.H. (1979). Tierische Schädlingen in forstlichen monokulturen im Süden Brasiliens. *Allgemeine Forstzeitung*, **34**, 788-790.

Setoguchi, H., Osawa, T. A., Pintaud, J.-C., Jaffré, T. & Veillon, J.-M. (1998). Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on *rbcL* gene sequences. *American Journal of Botany*, **85**, 1507-1516.

Shimizu, J.Y., Jaeger, P. & Sopchaki, S.A. (2000). Variabilidade genética em uma população remanescente de araucária no Parque Nacional do Iguaçu, Brasil. *Bol. Pesq. Fl.*, **41**, 18-36.

Shimoya, C. (1962). Contribuição ao estudo do ciclo biológico de *Araucaria angustifolia* (Bertolini) O. Kuntze. *Experientiae*, (2), 520-540.

Slatkin, M. (1981). Estimating level of gene flow in natural populations. *Genetics*, **99**, 323-335.

Sousa, V.A. (2000). Population genetic studies in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Tese de Doutorado. Georg-August University of Göttingen, Göttingen, Alemanha.

Sousa, V.A., Robinson, I.P. & Hattemer, H.H. (2004). Variation and population structure at enzyme gene loci in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Silvae Genetica*, **53**(1), 12-19.

Stefenon, V.M., Nodari, R.O. & Reis, M.S. (2003). Padronização do protocolo AFLP e sua capacidade informativa para análise de diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. *Scientia forestalis*, **64**, 163-171.

Stockey, R. A., Nishida, M. & Hishida, H. (1994). Upper Cretaceous araucarian cones from Hokkaido and Saghalien: *Araucaria nipponensies* sp. nov. *International Journal of Plant Science*, **155**, 800-809.

Streiff, R., Ducouso, A., Lexer, C., Steinkellner, H., Gloessl, J. & Kremer, A. (1999). Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. *Molecular Ecology*, **8**(5), 831-841.

Trapnell, D.W., Hamrick, J.L. (2005). Mating patterns and gene flow in the neotropical epythic orchid, *Laelia rubescens*. *Molecular Ecology*, **14**(1), 75-84.

Viana, V.M., Tabanez, A.J. & Martinez, J.L.A. (1992). Restauração e manejo de fragmentos florestais. Em: *II Congresso Nacional sobre Essências Nativas* (pp. 400-407). Instituto Florestal de São Paulo, São Paulo

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van Delee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP – a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**(21), 4407-4414.

Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**(6), 1358-1370.

Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistic with special regard to systems of mating. *Evolution*, **19**, 395-420.