

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS  
GENÉTICOS VEGETAIS**

Gustavo Henrique Ferrero Klabunde

**Análise filogeográfica entre populações de *Araucaria angustifolia*  
(Bert.) O. Kuntze em sua área de distribuição natural**

Dissertação submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Recursos Genéticos Vegetais da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau  
de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rubens  
Onofre Nodari.

Co-Orientador: Prof. Dr. Valdir  
Marcos Stefenon

Florianópolis

2012

Catologação na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

K63a Klabunde, Gustavo Henrique Ferrero  
Análise filogeográfica entre populações de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze em sua área de distribuição natural [dissertação] / Gustavo Henrique Ferrero Klabunde ; orientador, Rubens Onofre Nodari. - Florianópolis, SC, 2012.  
85 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Agricultura. 2. Recursos genéticos vegetais. 3. Filogenia. I. Nodari, Rubens Onofre. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

CDU 631



**Aos meus pais,  
Marlene e Ronaldo.  
Não estou nem na metade do caminho.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, pelos meus sete anos de formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, docentes, discentes e colaboradores.

Ao meu Professor Orientador, Dr. Rubens Onofre Nodari, pelos cinco anos e meio de orientação.

Ao Dr. Valdir Marcos Stefenon, por coletar e ceder a maioria das populações deste trabalho.

Aos meus pais, Marlene e Ronaldo, à minha irmã Elisa e a todo o restante dos Ferrero e dos Klabunde que apostaram em mim durante esta fase.

À minha namorada Carolinne e aos Odebrecht Dias por todo o amor e carinho.

Ao Thiago Sanchez Ornellas, por seu meu condutor na viagem de coleta até Barbacena e Campos do Jordão.

À Sarah Maria Vargas, por ter me apresentado o milagroso protocolo de purificação de reações de PCR.

Aos amigos do LFDGV, Cristina Sant'Anna, Clarissa Caprestano, Denise Olkoski, Sarah Agapito-Tenfen, Hugo Fraga, Leila Vieira, Maria Luiza, Ramon Scherer, Angelo Heringer, Yohan Fritsche, Rafael Benevenuto, Amanda Hoffmann, Vinícius Vilperte, Maria Carolina Nascimento, Gabriela Inocente, Joel Donazzolo, Tiago Montagna, Marcelo Rogalski, Larissa Passos de Moraes, Juan Otálora *et al.*.

Aos demais amigos sempre presentes, Diego Jacob Kurtz, Alan Fabrício Malinski, Júlio Graeff Erpen, Rolnei Ruã Darós, Ricardo Cipriani, João Henrique Cardoso Costa e Lucas Balcão.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPESC e UFSC pelo apoio financeiro da pesquisa.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	VIII
SUMMARY .....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE TABELAS .....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	XIV
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	02
2.1. A espécie <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Kuntze .....	02
2.2. Análise Filogeográfica .....	08
2.3. Filogeografia de plantas terrestres .....	10
2.4. Genoma cloroplastidial .....	12
2.5. Marcadores universais para <i>cpDNA</i> .....	14
3. HIPÓTESES .....	15
4. OBJETIVOS .....	17
4.1. Objetivo geral .....	17
4.2. Objetivos específicos .....	17
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
5.1. Populações em estudo e estratégia de coleta do material vegetal para a caracterização genética.....	18
5.2. Extração de DNA total .....	20
5.3. Caracterização genética de espaçadores intergênicos de <i>cpDNA</i> .	22
5.3.1. Iniciadores universais para <i>cpDNA</i> .....	22
5.3.2. Padronização da amplificação via reação em cadeia da polimerase – PCR .....	25
5.3.3. Purificação pós-amplificação .....	26
5.3.4. Sequenciamento de DNA em todas as populações .....	27
5.3.4.1. Reações de sequenciamento .....	27
5.3.4.2. Purificação pós reação de sequenciamento .....	28
5.3.4.3. Eletroforese capilar .....	28
5.3.4.4. Alinhamento e montagem de sequências .....	29
5.4. Análises genéticas .....	30
5.4.1. Diversidade de haplótipos ( <i>h</i> ) e nucleotídeos ( $\pi$ ) .....	30
5.4.2. Índices de Fixação .....	30

5.4.3. Análise da Variância Molecular – AMOVA .....	30
5.4.4. Rede de Haplótipos. ....	31
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
6.1. Nível de polimorfismo dos espaçadores intergênicos .....	31
6.2. Distribuição e diversidade de haplótipos ( <i>h</i> ) e nucleotídeos ( $\pi$ ) .....	32
6.3. Análise da variância molecular – AMOVA .....	40
6.4. “D” de Tajima .....	41
6.5. Estrutura filogeográfica .....	42
<b>7. IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DE <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Kuntze .....</b>	<b>47</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>48</b>
<b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>
<b>APÊNDICE 1. Sequência parcial do espaçador intergênico <i>trnD-trnT</i> (514 pb), <i>Araucaria angustifolia</i>, haplótipo 1. ....</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICE 2. Sequência parcial do espaçador intergênico <i>psbC-trnS</i> (1.120 pb), <i>Araucaria angustifolia</i>, haplótipo 1. ....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE 3. Sequência parcial do espaçador intergênico <i>trnS-trnfM</i> (874 pb), <i>Araucaria angustifolia</i>, haplótipo 1. ....</b>	<b>64</b>
<b>APÊNDICE 4. Populações e valores de <i>Fst</i> (par a par) para todos os possíveis pares de populações. ....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>69</b>

## **Análise filogeográfica entre populações de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze em sua área de distribuição natural**

Autor: Gustavo Henrique Ferrero Klabunde  
Orientador: Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari

### **RESUMO**

O Pinheiro Brasileiro (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze), é uma das quatro coníferas nativas do Brasil, e a mais ameaçada após décadas de exploração massiva. Estudos filogeográficos ajudam a esclarecer aspectos espaciais e temporais da dispersão pós-glacial de diversas espécies vegetais. Neste trabalho foram caracterizadas as relações filogeográficas utilizando a variação nas sequências de DNA cloroplastidial (*cpDNA*) de três espaçadores intergênicos (*trnD-trnT*, *psbC-trnS* e *trnS-trnfM*) em 510 indivíduos de 34 populações de *Araucaria angustifolia* com ocorrência nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e no município de San Pedro, Argentina. Dezesesseis haplótipos foram detectados na análise de 2.508 pb das sequências não codificantes. Os índices de diversidade genética foram  $h=0,823$  e  $\pi=0,00068$ . Foi encontrada média diferenciação genética dentro da maioria das populações ( $F_{st}$  0,269) e alta diferenciação genética entre as populações mais distanciadas geograficamente ( $F_{st}$  0,431). A rede de haplótipos e a distribuição geográfica dos haplótipos mostraram a formação de três grupos filogeográficos (GS- Grupo Sul, GC- Grupo Centro e GN- Grupo norte), sugerindo preliminarmente a existência passada de três refúgios glaciais. Entre os grupos GS e GC foi observada a existência de uma zona secundária de mistura. O padrão encontrado de divergência genética se encaixa na categoria filogeográfica I de Avise, na qual a separação espacial provocou uma descontinuidade na distribuição dos haplótipos. Estes resultados preliminares sugerem que a partir do Holoceno mediano (4.320 A.P.), as populações de *Araucaria angustifolia* se expandiram dos possíveis refúgios até os limites geográficos atualmente conhecidos. Portanto, estas informações fornecerão subsídios para o planejamento mais adequado das ações para a conservação desta espécie.

**Palavras-chave:** DNA Cloroplastidial, espaçadores não codificantes, filogenia intra-específica, filogenia multi-loco, refúgios glaciais.

# Phylogeographical analysis within populations of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze in its natural distribution range

Author: Gustavo Henrique Ferrero Klabunde

Advisor: Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari

## SUMMARY

Brazilian pine tree (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze) is one of the four native conifers from Brazil but the most threatened due to decades of massive exploitation. Phylogeographical studies have helped to clarify spatial and temporal aspects of post-glacial dispersal of several plant species. In this study, phylogeographic relationships were characterized by analyzing nucleotide sequence variation in the chloroplast DNA (*cpDNA*) of three intergenic spacers (*trnD-trnT*, *psbC-trnS* and *trnS-trnFM*) of 510 individuals from 34 populations of *Araucaria angustifolia* occurring in São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul states and San Pedro city – Argentina. The analysis detected sixteen haplotypes in a 2508 bp non-coding sequence. Genetic diversity indexes were  $h=0.823$  and  $\pi=0.00068$ . An average genetic differentiation level was found within the majority of the populations ( $F_{st}$  0.269). However, a high level of genetic differentiation was found among all geographically distant populations ( $F_{st}$  0.431). The haplotype network and the geographic distribution of haplotypes showed the formation of three phylogeographical groups (SG- South group, CG- Central Group and NG- North group), suggesting the existence of three glacial refugia in the past. A secondary admixture zone was identified between SG and CG groups. The genetic divergence pattern fits into phylogeography category I of Avise, in which the spatial separation caused a discontinuity on haplotypes distribution. These preliminary results suggest that, *Araucaria angustifolia* expanded from the possible refuges in the middle Holocene (4320 B.P.) to the currently know geographical limits. Therefore, this information will provide subsidies for planning the most appropriate conservation actions for this species.

**Key-words:** Chloroplast DNA, glacial refugia, intraspecific phylogeny, multiloco phylogeny, noncoding spacers.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Áreas de ocorrência natural de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (em verde escuro), dentro do domínio da Mata Atlântica (área verde clara), (Guerra *et al.*, 2002). ..... 04
- Figura 2.** Reconstrução das casas subterrâneas. **A**, Teto com três pilares retos apoiados sobre banco. **B**, Teto com pilares arqueados. Retirado de Bitencourt e Krauspenhar (2006). ..... 05
- Figura 3.** Áreas de ocorrência atual de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (em verde escuro), dentro do domínio da Mata Atlântica (área verde clara), (Guerra *et al.*, 2002). ..... 07
- Figura 4.** Mapa destacando em verde as cidades possuidoras de populações amostradas neste trabalho, obtido por meio do programa Arc GIS 9.2. .... 19
- Figura 5.** Organização do genoma cloroplastidial da conífera *Cryptomeria japonica* D. Dom (Hirao *et al.*, 2008). As setas, neste genoma referência, indicam as posições dos iniciadores e as regiões intergênicas analisadas em *Araucaria angustifolia*. Setas 1 e 2, espaçador DT; Setas 3 e 4, espaçador CS; Setas 5 e 6, espaçador SfM.23
- Figura 6.** Gel de agarose 1,0 % representando a padronização do loco SfM. **M**: Marcador 1 kb DNA *ladder* (New England BioLabs); **1 a 6**: Produtos de amplificação do loco SfM (aprox. 1.200 pb). ..... 27
- Figura 7.** Gel de agarose 1,0 % representando a padronização do loco CS. **M**: Marcador 1 kb DNA *ladder* (New England BioLabs); **1 a 4**: Produtos de amplificação do loco CS (aprox. 1.500 pb). ..... 27
- Figura 8.** Gel de agarose 1,0 % representando a padronização do loco DT. **M**: Marcador 1 kb DNA *ladder* (New England BioLabs); **1 a 11**: Produtos de amplificação do loco DT (aprox. 1.400 pb). ..... 27

**Figura 9.** Alinhamento e montagem das seis sequências para o loco SfM em um indivíduo de *Araucaria angustifolia*, com a utilização do programa *Codon Code Aligner* versão 3.7.1. Neste caso não foram observadas discrepâncias de bases nem a presença de *gaps*. ..... 29

**Figura 10.** Rede de haplótipos baseada na sequência parcial dos locos *trnD-trnT*, *psbC-trnS* e *trnS-trnfM*. Cada linha entre os haplótipos representa um passo mutacional. O tamanho de cada círculo é proporcional a frequência geral de cada haplótipo. As cores dos círculos indicam a ocorrência destes haplótipos nos 3 grupos populacionais (Branco: Grupo Centro 1; Preto: Grupo Sul 2; Cinza: Grupo Norte). .. 37

**Figura 11.** Mapa representando a distribuição geográfica dos haplótipos de *cpDNA* nas populações de *Araucaria angustifolia*. A linha contínua indica a barreira genética identificada. Ver Tabela 2 para as abreviações das populações e a Tabela 9 para os índices de diversidade molecular.39

**Figura 12.** Mapa da vegetação Sul-Americana durante o auge do último período glacial (25.000-15.000 A.P.). Legenda: 1- Floresta tropical; 5- Semi-deserto tropical; 6- Pradaria tropical; 7- Deserto tropical extremo; 8- Savana; 9- Floresta temperada latifoliada; 10- Floresta tropical montanhosa; 16- Deserto temperado; 17- Semi deserto temperado; 18- Estepe florestal; 19- Mosaico montanhoso; 22- Estepe seca; 23- Estepe/pradaria temperada; 26- Gelo permanente. Retirado de Ray e Adams (2001). ..... 44

**Figura 13.** Distribuição geográfica das “casas subterrâneas” em territórios elevados do sul do Brasil. Retirado de Bitencourt e Krauspenhar (2006). ..... 45

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Padrões filogeográficos gerais (relações entre filogenia e geografia) observados em estudos conduzidos a partir de *mtDNA* e *cpDNA*. As letras indicam diferentes populações (Adaptado de Avise *et al.*, 1987). ..... 09
- Tabela 2.** Códigos das plantas, localidades, coordenadas geográficas e altitudes das populações deste estudo. Numeração em função da ordem de coleta. .... 20
- Tabela 3.** Caracterização dos três pares de iniciadores de regiões não codificantes do genoma cloroplastidial (Demasure *et al.*, 1995). ..... 24
- Tabela 4.** Componentes e concentrações utilizadas nas reações de amplificação via PCR dos três locos de *cpDNA* do presente estudo. .. 25
- Tabela 5.** Condições de ciclagem (temperatura T °C e tempo) para a amplificação via PCR dos três locos de *cpDNA* do presente estudo. .. 26
- Tabela 6.** Representação esquemática de uma placa contendo 96 reações (8 linhas x 12 colunas) para o sequenciamento de um espaçador intergênico em uma população. Os números de 1 a 15 representam as plantas de uma população. **F**: iniciador direto, em triplicata. **R**: iniciador reverso, em triplicata. M13mp18: reações controle contendo *ssDNA* viral. .... 29
- Tabela 7.** Tamanho dos locos em pares de base, número de sítios de segregação, diversidade total de haplótipos, diversidade total de nucleotídeos e número de haplótipos encontrados. .... 31
- Tabela 8.** Posições dos sítios variáveis das sequências alinhadas dos três locos de *cpDNA* (*trnD-tT*, *psbC-trnS* e *trnS-trnfM*), no qual foram identificados 16 haplótipos em *Araucaria angustifolia*. .... 34
- Tabela 9.** Populações, número e tipos de haplótipos encontrados por população, diversidade de haplótipos (*h*) e nucleotídeos ( $\pi$ ) na combinação dos três locos. .... 36

<b>Tabela 10.</b> Análise da variância molecular entre populações e dentro de populações de <i>Araucaria angustifolia</i> , baseada nas sequências dos locos de <i>cpDNA</i> analisados. ....	40
<b>Tabela 11.</b> Análise da variância molecular entre grupos, entre populações dentro de grupos e dentro de populações de <i>Araucaria angustifolia</i> , baseada nas sequências dos locos de <i>cpDNA</i> analisados. ....	41
<b>Tabela 12.</b> Valores do “ <i>D</i> ” de Tajima para os grupos e populações de <i>Araucaria angustifolia</i> . ....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\lambda$  DNA – Lambda DNA, marcador de peso e tamanho molecular  
 **$\mu$ L** – Microlitro  
 **$\mu$ M** – Micromolar  
**A** – Adenina (nucleobase)  
**AFLP** – Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados  
**AMOVA** – Análise da Variância Molecular  
**A.P.** – Antes do presente  
**C** – Citosina (nucleobase)  
**CIA** – Clorofórmio:Álcool Isoamílico  
***cpDNA*** – Ácido desoxiribonucleico cloroplastidial  
***cpSSR*** – Marcador microssatélite cloroplastidial  
**CS** – Região não codificantes de *cpDNA* flanqueada pelos genes psII 44 kd protein e tRNA-Ser  
**CTAB** – Brometo de cetiltrimetilamônio  
**ddNTPs** – Di-deoxinucleotídeos trifosfatados  
**DNA** – Ácido desoxiribonucléico  
**dNTPs** – Deoxinucleotídeos trifosfatados  
**DT** – Região não codificantes de *cpDNA* flanqueada pelos genes tRNA-Asp e tRNA-Thr  
**EDTA** – Ácido Etilenodiaminotetracético  
**F** – Iniciador direto, “*foward*”  
**G** – Guanina (nucleobase)  
***g*** – Força centrífuga relativa  
**GC** – Grupo Centro  
**GS** – Grupo Sul  
**GN** – Grupo Norte  
**kb – kpb** – Kilo Bases  
**kd** - Kilo Daltons  
**kV** – Kilovolts  
**LPA** – Poliacrilamida linear  
**M13mp18** – DNA viral  
***matK*** – Maturase RNA ribossomal  
**mg** – Miligrama  
**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de Magnésio  
**mM** – Milimolar  
***mtDNA*** – DNA mitocondrial  
**NaCl** – Cloreto de Sódio  
**ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>** – Nanograma por microlitro

XIV

**ng** – Nanograma  
**nuSSR** – Marcadores microssatélites nucleares  
**pb** – Pares de base  
**PCR** – Reação em cadeia da polimerase  
**PCR-RFLP** – Polimorfismo de comprimento de fragmentos restringidos a partir de produtos da reação em cadeia da polimerase  
**PEG** – Polietileno glicol  
**pH** – Potencial hidrogeniônico  
**PVP** – Polivinilpirrolidona  
**R** – Iniciador reverso, “*reverse*”  
**RAPD** – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso  
**RNA** – Ácido Ribonucleico  
**RNAse** – Nuclease que catalisa a degradação do ácido ribonucleico  
**rpm** – Rotações por min  
**SfM** – Região não codificantes de *cpDNA* flanqueada pelos genes tRNA-Ser e tRNA-fMet  
**SNP** – Single nucleotide polymorphism / Polimorfismo de base única  
**ssDNA** – DNA fita simples, “*single stranded DNA*”  
**SSR** – Marcadores microssatélites - Sequências simples repetidas  
**T** – Timina (nucleobase)  
**TBE** – Tampão Tris-HCl-Ácido Bórico-EDTA  
**TE** – Tampão Tris-HCl-EDTA  
**tRNA** – RNA transportador  
**U** – Uracil (nucleobase)  
**U** – Unidade enzimática  
**UMG** – Último máximo glacial, período entre 27.500 e 14.500 anos antes do presente  
**U  $\mu\text{L}^{-1}$**  – Unidades enzimáticas por microlitro  
**W** – Watts  
**10X** – Concentração de soluções estoque de tampões  
**1X** – Concentração de soluções trabalho de tampões



# 1. INTRODUÇÃO

Quando os europeus chegaram ao Brasil, o pinheiro brasileiro (*Araucaria angustifolia*) dominava uma vasta floresta de aproximadamente 200 mil km<sup>2</sup> no planalto sul-brasileiro, consorciada especialmente com espécies das famílias Lauraceae, Mirtaceae e Aquifoliaceae. Devido à alta qualidade de sua madeira, a *A. angustifolia* começou a ser explorada pelos portugueses no final do século XVIII, em áreas próximas ao litoral. Sua exploração em áreas mais distantes da costa iniciou com a criação de vias férreas no final do século XIX e intensificou-se a partir da década de 1930 com o uso de caminhões para o transporte da madeira. Este período, conhecido como ciclo da madeira, foi um dos mais importantes marcos no desenvolvimento econômico da região Sul do Brasil. Atualmente a *Araucaria angustifolia* se encontra criticamente ameaçada de extinção, em função de décadas de exploração da sua madeira e introdução de gado e lavouras.

Estudos filogeográficos ajudam a esclarecer aspectos espaciais e temporais da filogenia intra-específica de diversas espécies animais e vegetais. Um dos principais focos destes estudos é a busca pelos epicentros de dispersão da espécie, também conhecidos como refúgios glaciais, após o término do último período glacial, que teve seu término há cerca de 14.500 anos A.P..

Para cumprimento de tais objetivos, são utilizados, em plantas, polimorfismos presentes em sequências de DNA cloroplastidial (*cpDNA*). O genoma de cloroplastos em relação a outros genomas eucariontes apresenta um modelo evolutivo único e conservativo, principalmente em função da herança uniparental (primariamente paterna em coníferas) e da não ocorrência de recombinação (permuta) ou rearranjos genéticos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A espécie *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, também conhecida como pinheiro-do-Paraná, araucária ou pinheiro-Brasileiro, é uma conífera dióica e perenifólia (Mattos, 2012), que ocorre exclusivamente na América do Sul, na região da Floresta Ombrófila Mista (FOM), formação florestal que recebe também o nome de Floresta com Araucária, devido à abundância e ao grande porte da espécie, que imprime a fisionomia característica da floresta (IBGE, 1993).

Esta espécie é endêmica das regiões sul e sudeste do Brasil (nesta última região, pequenas manchas nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro), com extensões em pequenas manchas no noroeste da Argentina (Províncias de San Pedro e Corrientes) e Paraguai (Alto Paraná), em áreas próximas às fronteiras brasileiras. Mais especificamente, a espécie ocorre entre as latitudes 19°15'S e 31°30'S, e entre as longitudes 41°30'W e 54°30'W, com uma ampla área de não ocorrência da espécie no estado de São Paulo (Figura 1). A espécie encontra condições ideais para o desenvolvimento em altitudes entre 500 m e 1800 m (Klein, 1960; Reitz e Klein, 1966; Veloso e Goes Filho, 1982; Veloso *et al.*, 1991; Carvalho, 1994; Judd *et al.* 2009).

O gênero *Araucaria*, é o mais diversificado da família Araucariaceae, com distribuição restrita a países do hemisfério sul (Chile, Argentina, sul e sudeste do Brasil, Nova Caledônia, Ilha Norfolk, Austrália e Nova Guiné; Setoguchi *et al.*, 1998), podendo inclusive sua presença e distribuição atual ser considerada como relíquia da evolução (Setoguchi *et al.*, 1998; Farjon, 2006).

A família Araucariaceae possui 30 espécies distribuídas em três gêneros (*Araucaria*, *Agathis* e *Wollemia*), sendo que o último gênero possui apenas a espécie *Wollemia nobilis*, descrita em 1995, considerada um fóssil vivo, e que possui uma única população com menos de 100 indivíduos (Setoguchi *et al.*, 1998).

Apesar da ampla área de ocorrência da família na região do sudeste asiático/ilhas do pacífico, a distribuição das espécies não é homogênea, sendo que as ilhas da Nova Caledônia concentram 17 espécies endêmicas das 30 espécies que a família possui (Florin *et al.*, 1963).

Cabe ressaltar, que seus fósseis estão entre os mais antigos existentes dos gêneros de coníferas, sendo encontrados desde os períodos Cretáceo, Jurássico e Triássico (Miller, 1977; Miller, 1988;

Stockey, 1982; Farjon, 2006), as quais estão presentes na terra a aproximadamente 300 milhões de anos. Apesar de sua atual importância em áreas naturais e do seu aspecto evolutivo, poucos estudos têm sido feitos focando aspectos filogenéticos e evolutivos (Setoguchi *et al.*, 1998; Stefanovic *et al.*, 1998). Os poucos estudos realizados foram conduzidos com análises baseadas em genes nucleares e plastidiais (Setoguchi *et al.*, 1998; Stefanovic *et al.*, 1998).

Além da *Araucaria angustifolia*, outras três coníferas são nativas do Brasil, sendo estas pertencentes à família Podocarpaceae: *Podocarpus lambertii*, *Podocarpus selowii* e *Retrophyllum piresii* (Carvalho, 1994).

*Podocarpus lambertii* acompanha a araucária, na Floresta Ombrófila Mista, mas sua distribuição geográfica se estende também para o Bioma Pampa até o Uruguai. Já a espécie *P. selowii*, distribui-se ao longo da Floresta Atlântica desde o Rio Grande do Sul até as pequenas serras e brejos de altitude no Nordeste, especialmente junto às Florestas Ombrófilas Densa e Estacional Semidecidual, além das florestas de galerias serranas no domínio do cerrado (Carvalho, 1994). A espécie *Retrophyllum piresii*, endêmica do Brasil, é encontrada no Estado de Rondônia, mais especificamente no Parque Pacaás Novas em altitudes entre 800 e 1126 metros. Não há dados sobre sua exata distribuição, conservação e diversidade genética (IUCN, 2010).

Outra Araucariaceae nativa da América do Sul é a *Araucaria araucana*. Esta espécie é nativa da região norte das florestas temperadas da Argentina e Chile, com distribuição restrita a faixa de latitude entre 37°20'S e 40°20'S (Marchelli *et al.*, 2010).

*Araucaria angustifolia* é uma espécie dióica, polinizada principalmente pelo vento. No sul do Brasil o amadurecimento do pólen ocorre de agosto a outubro. O estróbilo masculino (mingote) é visível de agosto a janeiro e o estróbilo feminino (pinha ou ginostrobilo) é visível durante o ano todo. As pinhas amadurecem de fevereiro a dezembro, de acordo com a variedade botânica (Carvalho *et al.*, 1994).

Em sua região de ocorrência natural, a *Araucaria angustifolia* tem grande relevância ecológica, econômica e social. Segundo Carvalho (1994), trata-se de uma espécie secundária longeva dominante de crescimento inicial lento, mas de temperamento pioneiro.

Este temperamento pioneiro é de grande importância visto que a *Araucaria Angustifolia* tem um papel ecológico como espécie berçário no avanço de espécies florestais sobre os campos adjacentes, pois cria um ambiente ideal para outras espécies tolerantes à sombra, que

encontram um ambiente adequado para se desenvolver e crescer (Duarte e Dillenburg, 2000; Duarte *et al.*, 2006; Franco e Dillenburg, 2007).



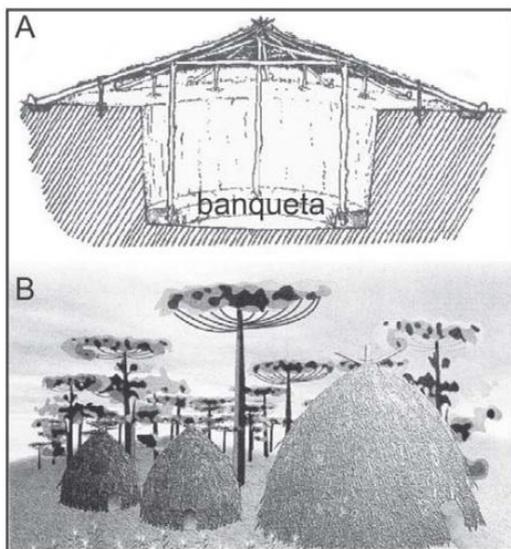
**Figura 1.** Áreas de ocorrência natural de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (em verde escuro), dentro do domínio da Mata Atlântica (área verde clara), (Guerra *et al.*, 2002).

Ainda em relação ao aspecto ecológico, suas sementes servem de alimento para a fauna selvagem, principalmente para aves, catetos, queixadas, roedores de pequeno e médio porte, marsupiais e veados, os quais são os principais dispersores das suas sementes. A *Araucaria angustifolia* é considerada espécie chave na Floresta Ombrófila Mista, pois fornece alimento rico em energia durante os meses mais frios,

enquanto as outras espécies da floresta não estão produzindo frutos (Guerra *et al.*, 2008; Pinheiro e Ganade, 2009).

Paralelamente à dispersão natural, movimentos migratórios realizados por grupos de caçadores e coletores durante o Holoceno tardio (entre 2.000 e 200 anos atrás) podem ter influenciado na expansão da *Araucaria angustifolia*. Os grupos, pertencentes ao tronco cultural *Jê*, ocuparam a região do planalto sul brasileiro em assentamentos distribuídos altimétrica e geograficamente seguindo o domínio da Floresta Ombrófila Mista (FOM). Sua relação direta com a expansão da *Araucaria angustifolia* é muito provável, pois a caça, o manejo agroflorestral e a coleta de pinhões constituíam seus principais recursos alimentícios (Bitencourt e Krauspenhar, 2006).

Além do mais, estes povos instalavam suas residências típicas (casas subterrâneas, buracos de índio, Figura 2) na proximidade de pinhais, onde registros arqueológicos podem ser encontrados desde o norte do estado do Paraná até a região central do estado do Rio Grande do Sul (Bitencourt e Krauspenhar, 2006).



**Figura 2.** Reconstrução das casas subterrâneas. **A**, Teto com três pilares retos apoiados sobre banco. **B**, Teto com pilares arqueados. Retirado de Bitencourt e Krauspenhar (2006).

Do ponto de vista econômico e social, suas sementes servem de alimento humano com grande valor nutricional, sendo que a coleta e a

venda destas sementes se constituem em relevante atividade econômica para um considerável número de famílias que vivem nas regiões de ocorrência. Esta espécie também possui madeira de alta qualidade o que determinou sua importância econômica histórica, sendo empregada especialmente para construção civil, de móveis, como também, para a produção de celulose (Reitz *et al.*, 1978; Carvalho, 1994).

Em razão da alta qualidade, no início do século XX, a madeira de araucária foi altamente explorada (Guerra *et al.*, 2008; Farjon, 2008).

Devido à drástica redução em sua área de ocorrência, o pinheiro-brasileiro atualmente consta na lista do Ministério do Meio Ambiente e na lista internacional da IUCN de espécies ameaçadas como criticamente ameaçada de extinção (MMA, 2008; IUCN, 2010).

Assim como a *A. angustifolia*, o domínio da Mata Atlântica (MA) também foi drasticamente reduzido, restando atualmente menos de 12% da sua cobertura original (Ribeiro *et al.*, 2009).

A mata Atlântica está entre os cinco mais relevantes *hotspots* mundiais de biodiversidade prioritários para a conservação (Myers *et al.*, 2000). Além do *hotspot* da Mata Atlântica, as ilhas da Nova Caledônia também se encontram na lista de Myers e colaboradores. Estas ilhas representam a maior diversidade da família Araucariaceae no planeta (17 espécies endêmicas). Fato relevante é a presença de tantas espécies polinizadas pelo vento em um conjunto de ilhas de aproximadamente 18.500 km<sup>2</sup>.

Devido à exploração exaustiva da madeira e o desmatamento visando à agricultura, restam atualmente apenas alguns remanescentes isolados de *Araucaria angustifolia*, os quais representam aproximadamente 3% da área total de sua ocorrência natural que abrangia uma área correspondente a 40, 31, 25, 3 e 1 % do território dos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, respectivamente (Figura 3), (Reitz *et al.*, 1978; Veloso *et al.*, 1991; Carvalho, 1994; Guerra *et al.*, 2000; 2002; 2008).

Dos 3% que restam da floresta de araucária, somente 1% é de floresta primitiva e apenas 0,2% está protegido em unidades de conservação (Patreze, 2008).



**Figura 3.** Áreas de ocorrência atual de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (em verde escuro), dentro do domínio da Mata Atlântica (área verde clara), (Guerra *et al.*, 2002).

Este tipo de exploração, sem critérios de seleção ou manejo, vem causando erosão genética nesta espécie em função da fragmentação florestal, perda de alelos, aumento da endogamia, redução do tamanho efetivo populacional e limitando a dispersão e colonização das espécies (Meagher, 2010).

Diversos trabalhos têm sido feitos visando caracterizar a fenologia, ciclo reprodutivo, variabilidade genética, estrutura e distância genética em populações de *Araucaria angustifolia* utilizando ferramentas moleculares em nível de DNA e de proteínas (Auler *et al.*,

2002; Mantovani *et al.*, 2004; 2006; Bittencourt e Sebbenn, 2007; Patreze, 2008; Patreze e Tsai, 2008; Stefenon *et al.*, 2007; 2008a; 2009; Sant'Anna, 2011; Agapito-Tenfen *et al.*, 2012).

No entanto, escassos são os trabalhos em nível de DNA, RNA e proteína que procurem desvendar fatores evolutivos em *Araucaria angustifolia*.

## 2.2 Análise Filogeográfica

A introdução dos dados do *mtDNA* na genética de populações, no final da década de 1970, provocou uma mudança revolucionária nas perspectivas históricas e filogenéticas das estruturas populacionais intra-específicas (Avice, 1994; 1998).

As características desejáveis dos marcadores organelares são a ausência de recombinação gênica, rearranjos genéticos, herança materna ou paterna e a facilidade de acesso a informação contida em seus genomas circulares (Bock, 2007).

A herança uniparental, seja ela materna ou paterna, possibilita o rastreamento de diversas linhagens de uma determinada espécie, sendo que suas dinâmicas históricas podem ser interpretadas de acordo com os modelos teóricos utilizados (Avice, 1994).

Em 1987, John C. Avice, ecólogo e biólogo evolucionista, e colaboradores publicaram um artigo descrevendo os princípios e processos relacionados à análise filogenética intra-específica e que levava em consideração principalmente a estrutura geográfica populacional: “INTRASPECIFIC PHYLOGEOGRAPHY: The Mitochondrial DNA Bridge Population Genetics and Systematics” (Avice *et al.*, 1987).

Neste trabalho, Avice e colaboradores, que já vinham estudando e caracterizando os polimorfismos mitocondriais de animais há seis anos, estabelece relações entre a filogenia intra-específica e a distribuição geográfica dos agrupamentos filogenéticos de determinadas espécies.

Para Avice, a análise filogeográfica é capaz de gerar informações que contribuam para o entendimento da história e formação das espécies, por meio da integração de informações de diversas áreas de pesquisa, como a genética, a palinologia e a paleontologia, por exemplo (Avice, 2000).

Nesta nova abordagem, Avice se utilizou de marcadores oriundos do DNA mitocondrial (*mtDNA*), por serem muito mais conservados e informativos do ponto de vista evolutivo do que os

marcadores de DNA nuclear, e não baseados em PCR, usualmente utilizados até então. Na análise de locos haplóides, os variantes são chamados de haplótipos. A grande maioria das variações intra-específicas, em *cpDNA*, são compostas por simples substituições de sítios (transições e transverções) seguidos de pequenas inserções-deleções (*indels*), (Bock, 2007).

A Tabela 1 apresenta as categorias de divergência genética propostas por Avise *et al.* (1987). Dois principais padrões de divergência genética podem ser observados na análise desta Tabela, os descontínuos e os contínuos. Os padrões contínuos tratam de espécies não subdivididas a longo prazo por barreiras ditas “zoogeográficas”, e divergem entre si em função do nível de fluxo gênico que a espécie apresenta (Avise, 2000).

Os padrões descontínuos são caracterizados por apresentarem barreiras de longo prazo ao fluxo gênico, com a presença de separação espacial ou não.

**Tabela 1.** Padrões filogeográficos gerais (relações entre filogenia e geografia) observados em estudos conduzidos a partir de *mtDNA* e *cpDNA*. As letras indicam diferentes populações (Adaptado de Avise *et al.*, 1987).

Categoria	Padrão de Divergência Genética	Distribuição geográfica			Provável circunstância evolutiva
		Região 1	Região 2	Região 3	
I	Descontínua				<p>A) Barreiras extrínsecas ao fluxo gênico a longo prazo (Ex. Zoogeográfica); e/ou</p> <p>B) Extinção de genótipos intermediários em espécies com fluxo gênico limitado.</p>
					<p>A) Zonas secundárias de mistura; ou</p> <p>B) Barreiras intrínsecas entre espécies simpátricas (Ex. isolamento reprodutivo).</p>
III	Contínua				Fluxo gênico limitado em espécies não subdivididas por barreiras zoogeográficas de longo prazo.

**Tabela 1. Continuação** Padrões filogeográficos gerais (relações entre filogenia e geografia) observados em estudos conduzidos a partir de *mtDNA* e *cpDNA*. As letras indicam diferentes populações (Adaptado de Avise *et al.*, 1987).

IV	Continua		<p>Ampla fluxo gênico em espécies não subdivididas por barreiras zoogeográficas de longo prazo.</p>
V	Continua		<p>Fluxo gênico intermediário em espécies não subdivididas por barreiras zoogeográficas de longo prazo.</p>

Apesar da categoria III não possuir barreiras de longo prazo ao fluxo gênico, ela apresenta certa separação espacial em função do fluxo gênico limitado entre populações. Portanto, as mutações recentes são confinadas em pequenos grupos denominados de ilhas.

A categoria IV apresenta o padrão inverso ao da categoria III, sendo o modelo proposto para espécies com elevado fluxo gênico, como a *Araucaria angustifolia*. As principais características desta categoria são a grande área ocupada pela espécie em questão e a presença de muito fluxo gênico (interconexões) entre as subpopulações. Nesta categoria, as subpopulações compartilham muitos alelos e haplótipos entre si, em função do grande fluxo gênico existente.

A última categoria apresenta um comportamento intermediário entre as categorias III e IV, em função do fluxo gênico mediano da espécie em questão. O padrão principal é o de separação espacial parcial, pois dependendo de fatores externos, ora a espécie se apresenta miscigenada ora apresenta a formação de ilhas (Avise, 2006).

### 2.3. Filogeografia de plantas terrestres

Em plantas, o *mtDNA* é muito mais compacto, denso e conservado em relação ao *cpDNA*, pois o *mtDNA* foi originado de uma  $\alpha$ -protobactéria que apresenta uma organização genômica contendo somente sequências para 37 genes, sem a presença de *introns* ou espaçadores (Dyall *et al.*, 1994).

O DNA cloroplastidial é amplamente utilizado na filogeografia de plantas terrestres, pois apresenta elementos genéticos não

codificantes e polimórficos para sua utilização como marcadores em análises filogenéticas, tais como, *introns*, pseudogenes, grandes espaçadores intergênicos e regiões repetitivas, como os *cpSSR* (Awise, 1994).

Além disso, o genoma cloroplastidial apresenta herança materna na maioria das plantas, sendo que algumas coníferas são exceções, apresentando herança paterna (Neale e Sederoff, 1989; Szmidi *et al.*, 1987, 1988; Neale *et al.*, 1989; Kondo *et al.*, 1998; Seido *et al.*, 2000).

Beheregaray (2008) classifica os marcadores moleculares utilizados em filogeografia em quatro classes, em função da capacidade informativa de cada iniciador e da frequência de aparição destes em trabalhos científicos. Os marcadores de primeira classe em filogeografia de plantas terrestres são os marcadores oriundos do DNA mitocondrial e cloroplastidial, *mtDNA* e *cpDNA*, respectivamente. Os marcadores organelares representam 81% dos marcadores utilizados em filogeografia. Os marcadores de segunda classe são os marcadores SNPs, AFLP e RAPD. Os de terceira classe são os marcadores microssatélites nucleares (SSR). E os de quarta classe, e raramente utilizados em filogeografia de plantas terrestres, são as alozimas.

Em função da dinâmica e da base genética de cada marcador utilizado em filogeografia, a amostragem de indivíduos dentro de populações, as análises realizadas e o número de populações pode variar (Pons e Petit, 1995; Pons e Chaoule, 1995).

Aproximadamente 16% dos estudos filogeográficos feitos até 2008 envolvem plantas terrestres, sendo que do universo das plantas terrestres, somente 8% dos artigos filogeográficos envolvem espécies sul-Americanas (Beheregaray, 2008). Este fato é intrigante, pois além da América do Sul ser o continente que possui a maior biodiversidade do planeta, ela possui cinco *hotspots* prioritários para a conservação: Mata Atlântica, Cerrado, Chile Central, Andes e o oeste Equatoriano (Myers *et al.*, 2000).

Em animais, a grande maioria dos estudos filogeográficos são baseados nos polimorfismos presentes na sub-unidade I da enzima citocromo oxidase (COI I), e são focados principalmente na caracterização dos locais de alimentação e reprodução, devido as diferentes dinâmicas e migrações dos animais (Beheregaray, 2008).

Marcadores oriundos do *mtDNA* podem ser utilizados em análise filogeográfica, no entanto o genoma mitocondrial não apresenta elementos genéticos polimórficos como os espaçadores intergênicos, *introns* e pseudogenes. Além disso, o polimorfismo das regiões codificantes é baixo (Awise, 2006).

## 2.4. Genoma cloroplastidial

A existência dos plastídios representa uma das principais características que distinguem células eucarióticas vegetais de outras. Durante a evolução da célula eucariótica, os plastídios, bem como as mitocôndrias foram adquiridos por meio de um processo de endossimbiose (mitocôndria de uma  $\alpha$ -protobactéria e os plastídios de uma cianobactéria), o qual foi um dos processos mais importantes na evolução dos seres vivos. Após essa associação a célula vegetal passou a ter três compartimentos com informação genética: o núcleo, as mitocôndrias e os plastídios.

A combinação entre hospedeiro e simbiote foi seguida por uma reorganização dos genomas com perda de genes dispensáveis (presentes nos dois organismos) das organelas, importação do produto dos genes organelares transferidos das organelas para o núcleo e uma complexa interação entre os produtos dos genes nucleares e organelares com aquisição de novas funções, como consequência, o tamanho do genoma das organelas foi drasticamente reduzido (Bock, 2006).

Vários experimentos a nível molecular têm mostrado que o processo de transferência de genes dos plastídios para o núcleo é um processo contínuo e ocorre com uma frequência relativamente alta (Huang *et al.*, 2003; Stegemann *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Bock, 2006; Stegemann e Bock, 2006).

Desde as primeiras sequências nucleotídicas do genoma plastidial reveladas (Shinozaki *et al.*, 1986; Ohyama *et al.*, 1986) mais de 200 sequências de genomas plastidiais de diferentes espécies foram determinadas e estão disponíveis no banco de dados do NCBI.

Essas sequências completas de genomas plastidiais vêm permitindo a realização de várias análises comparativas, associadas à estudos filogenéticos e evolutivos (Wakasugi *et al.*, 1996; Jansen *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007; Hirao *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2010), e ainda servem como excelentes fontes de informação para estudar eventos de transferência horizontal de genes e rearranjos ocorridos nestes compartimentos genéticos durante o processo de evolução da célula vegetal (Chumley *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007; Goremykin *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010). No entanto, a sequência do genoma plastidial foi determinada apenas para poucas espécies do grupo das gimnospermas, tal como *Cycas taitungensis* (família Cycadaceae; Wu *et al.*, 2007) e para as coníferas *Cryptomeria japonica* (família Cupressaceae; Hirao *et al.*,

2008). No entanto, o genoma cloroplastidial das araucareáceas é desconhecido.

O genoma plastidial de gimnospermas, especialmente em espécies coníferas, contem características distintas quando comparado ao genoma de plantas do grupo angiospermas, que incluem: i) herança paterna (Neale e Sederoff, 1989; Szmidi *et al.*, 1987, 1988; Neale *et al.*, 1989; Kondo *et al.*, 1998; Seido *et al.*, 2000); ii) relativo alto nível de variação intra-específica (Wagner *et al.*, 1987; Hong *et al.*, 1993; Dong e Wagner, 1994; Tsumura *et al.*, 1994); iii) redução e perda de regiões repetidas (Wakasugi *et al.*, 1994; Hirao *et al.*, 2008) e iv) diferentes padrões de edição do RNA plastidial (Wakasugi *et al.*, 1996).

Normalmente, os genomas cloroplastidiais de angiospermas variam de tamanho (entre 130 a 160 kb) e contêm duas regiões repetidas invertidas (IRs) que dividem o genoma entre as regiões de cópia simples grande (LSC) e pequena (SSC). Os tamanhos dessas regiões permanecem constantes, contendo o mesmo número de genes e a ordem dos genes sendo também conservada (Sugiura, 1989; Yukawa *et al.*, 2005; Bock, 2007). Por outro lado, o tamanho das regiões IRs em gimnospermas varia significativamente entre diferentes taxons (Lidholm *et al.*, 1988; Strauss *et al.*, 1988; Tsumura *et al.*, 1993). Por exemplo, as regiões IRs em *Ginkgo biloba* têm 17 kpb (Palmer e Stein, 1986), e em *Cycas taitungensis* essas regiões apresentam um tamanho de 23 kpb (Wu *et al.*, 2007). Já, em *Pinus thunbergii* essas regiões são extremamente curtas apresentando apenas 495 pares de bases (Tsudzuki *et al.*, 1992; Wakasugi *et al.*, 1994).

Tem sido sugerido que, assim como em *Pinus thunbergii*, algumas coníferas não possuem regiões IRs grandes como em outras gimnospermas (Lidholm *et al.*, 1988; Strauss *et al.*, 1988; White, 1990; Lidholm e Gustafsson, 1991). Recentemente foi demonstrada a ausência de regiões IRs no genoma plastidial de *Cryptomeria japonica*, uma conífera da família Cupressaceae (Hirao *et al.*, 2008).

A falta de IRs é considerada procedente de extensivos rearranjos genômicos que ocorreram no genoma plastidial das coníferas durante o processo de evolução (Strauss *et al.*, 1988). A comparação entre o genoma plastidial de diferentes espécies de angiospermas e o genoma plastidial de *P. thunbergii* demonstrou que o genoma dessa conífera sofreu diferentes rearranjos daqueles encontrados no grupo das angiospermas durante a evolução das plantas (Hirao *et al.*, 2008). Entretanto, há uma limitada informação disponível sobre genomas plastidiais de coníferas, pois os genomas sequenciados pertencem

apenas a duas famílias (Pinaceae e Cupressaceae) da ordem Pinales (Cronn *et al.*, 2008; Wakasugi *et al.*, 1994; Hirao *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2010). Enquanto as espécies da família Pinaceae revelaram uma alta similaridade em termos de conteúdo gênico e estrutura e geraram poucas informações sobre a complexidade do genoma plastidial em coníferas, o genoma plastidial de *Cryptomeria japonica* (Cupressaceae) revelou um genoma plastidial distinto comparado com outras espécies de coníferas, apresentando diferentes eventos de perdas de genes, estrutura genômica distinta e perda de uma das regiões repetidas, fornecendo assim novas informações sobre a linha de evolução das coníferas (Hirao *et al.*, 2008).

O genoma de cloroplastos em relação a outros genomas eucariontes apresenta um modelo evolutivo único e conservativo, principalmente em função da herança uniparental (materna ou paterna) e da não ocorrência de recombinação (permuta) ou rearranjos genéticos (Gillam, 1994, Palmer, 1985).

A ocorrência de mutações no genoma cloroplastidial é dez vezes menos frequente do que as mutações no genoma nuclear. Mesmo assim, os espaçadores intergênicos possuem polimorfismos genéticos valiosos para estudos de caráter evolutivo (Palmer, 1985).

## **2.5. Marcadores universais para *cpDNA***

Dentro do genoma cloroplastidial, a alta taxa de conservação das regiões codificantes, em nível de sequência, dificulta estas regiões de possuírem polimorfismo utilizável em estudos filogenéticos intra-específicos. A busca por polimorfismos utilizáveis se volta para as regiões não codificantes, possuidoras de dinâmicas e bases genéticas distintas (Avice, 1998).

Entre as regiões não codificantes, os espaçadores intergênicos possuem distribuição relativamente alta nos genomas cloroplastidiais, com tamanho variando de poucas bases até kilobases e possuindo as maiores taxas de mutação do genoma cloroplastidial (Parmer, 1985).

Diversos trabalhos descrevem o delineamento de iniciadores para estas regiões, com base principalmente no genoma cloroplastidial do tabaco (Taberlet *et al.*, 1991; Demesure *et al.*, 1995; Petit *et al.*, 1996; Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997; Chiang *et al.*, 1998).

Estes marcadores são denominados universais, pois os iniciadores delineados são capazes de hibridização e amplificação via PCR na maioria das espécies de algas, briófitas, pteridófitas, angiospermas e gimnospermas (Innis *et al.*, 1990).

Embora utilizado, “Universal” é um termo impróprio, pois estes marcadores não hibridizam em algumas espécies vegetais, pois qualquer diferença presente no sítio de hibridização dos iniciadores pode inibir a hibridização e posterior amplificação destes fragmentos via PCR (Taberlet *et al.*, 1991).

A grande maioria dos iniciadores universais delineados para *cpDNA* amplificam regiões flanqueadas por genes que codificam para RNAs transportadores e sub-unidades enzimáticas (Demesure *et al.*, 1995).

### 3. HIPÓTESES

#### **Investigação sobre a estruturação genética das populações de *Araucaria angustifolia*.**

**3.1. Ho:** Não existe estrutura genética correlacionada com a distribuição geográfica de *Araucaria angustifolia*

**Ha:** Existe uma acentuada estrutura genética correlacionada com a distribuição geográfica de *Araucaria angustifolia*.

A hipótese alternativa será comprovada caso sejam encontrados grupos específicos de haplótipos, uma ou mais barreiras genéticas e/ou zonas secundárias de mistura.

**3.2. Ho:** A separação espacial das populações do norte em relação às do sul não afetará o padrão geográfico, sendo o padrão contínuo e homogêneo, em função do alto fluxo gênico da espécie.

**Ha:** Em função da separação espacial entre as populações situadas no sul do Brasil em relação às populações dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, o padrão filogeográfico de divergência genética será um dos padrões descontínuos.

A hipótese alternativa será comprovada caso não sejam encontrados compartilhamento de haplótipos entre as populações do sul do Brasil em relação aos do norte de São Paulo.

## **Investigação sobre a história da migração Pós-Glacial de *Araucaria angustifolia*.**

**3.3. Ho:** Não existem indícios do efeito antropogênico na dispersão de pós-glacial *Araucaria angustifolia*.

**Ha:** A distribuição atual de *Araucaria angustifolia* pode ser parcialmente explicada como efeito da dispersão antropogênica de sementes.

A hipótese alternativa será reforçada caso sejam encontradas correlações entre a distribuição dos haplótipos e a migração de povos durante o holoceno tardio.

**3.4. Ho:** Após o término do Último Máximo Glacial, a espécie *Araucaria angustifolia* se expandiu aos limites atuais a partir de apenas um refúgio glacial.

**Ha:** Após o término do Último Máximo Glacial, a espécie *Araucaria angustifolia* se expandiu aos limites atuais a partir de dois ou mais refúgios glaciais.

A hipótese alternativa será comprovada caso sejam encontrados grupos regionalizados de haplótipos específicos próximos a locais que contenham evidências palinológicas da presença da espécie antes do início do Último Máximo Glacial.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

Caracterizar aspectos das relações filogeográficas entre populações de *Araucaria angustifolia*, com distribuição no Brasil e Argentina.

### 4.2. Objetivos específicos

a) Correlacionar os padrões de diversidade e diferenciação genética com a história da migração pós-glacial da *Araucaria angustifolia*;

b) Caracterizar a estrutura geográfica da variação genética dos locos de *cpDNA* em *Araucaria angustifolia*;

c) Identificar o padrão filogeográfico principal e os sub-padrões de divergência genética, com base em Avise (1987; 2000);

d) Realizar a análise filogenética intra-específica de *Araucaria angustifolia*;

e) Identificar evidências da participação antrópica na dispersão da *Araucaria angustifolia*;

f) Sugerir critérios adicionais de conservação dos recursos genéticos de *Araucaria angustifolia* com base nas informações obtidas.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Populações em estudo e estratégia de coleta do material vegetal para a caracterização genética

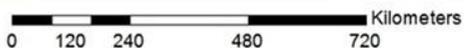
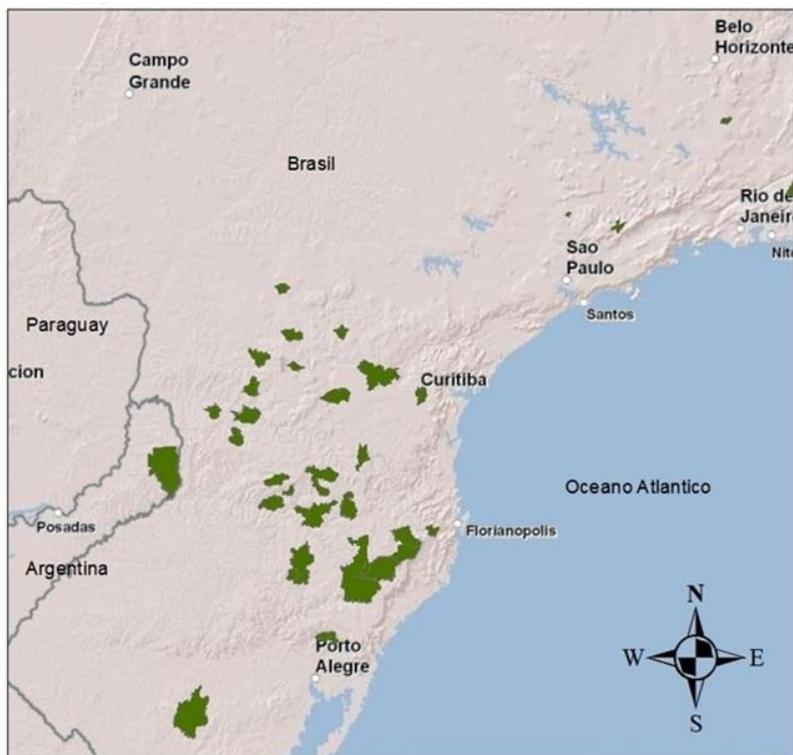
Foram amostradas 34 populações de *Araucaria angustifolia*, coletando-se 15 indivíduos em cada população, com base em Pons e Petit (1995). As populações amostradas foram selecionadas por estarem em unidades de conservação ou em fragmentos florestais dentro da área de ocorrência natural da espécie (Figura 4). As amostras da população de San Pedro foram gentilmente cedidas pelo Instituto de Recursos Biológicos, CIRN-INTA, Argentina.

As 34 populações estão distribuídas entre as latitudes 30 °S (Caçapava do Sul, RS) e 21 °S (Barbacena, MG), e entre as longitudes 54 °W (San Pedro, ARG) e 43 °W (Barbacena, MG), (Figura 4, Tabela 2).

Apenas na população de Caçapava do Sul não foi possível realizar a coleta dos 15 indivíduos, sendo coletadas 13 plantas.

Apenas um indivíduo foi amostrado nas cidades de Águas de Lindóia e Nova Friburgo, sendo que os haplótipos destes dois indivíduos somente entraram nos cálculos do nível total para os índices de diversidade de haplótipos ( $h$ ) e de nucleotídeos ( $\pi$ ).

Pons e Petit (1995) propuseram uma extensão da análise de Nei (1973) sobre a análise da diversidade genética em populações subdivididas, quando da utilização de loco haploides. O objetivo desta extensão é determinar o número ideal de indivíduos amostrados por população. Os resultados encontrados pelos autores enfatizam a necessidade da amostragem, principalmente, de muitas populações em vez de muitos indivíduos por população, para uma precisa medição da diversidade genética em um ou mais locos, pois estamos tratando de marcas haplóides não possuidoras de recombinação genética, (Palmer, 1985; Pons e Petit, 1995), o que gera permuta de nucleotídeos.



### Populações Naturais Amostradas

Locais de Coleta

Geographic Coordinate System: GCS\_South\_American\_1969  
Datum: D\_South\_American\_1969

**Figura 4.** Mapa destacando em verde as cidades possuidoras de populações naturais amostradas neste trabalho, obtido através do programa Arc GIS 9.2.

**Tabela 2.** Códigos das plantas, localidades, coordenadas geográficas e altitudes das populações deste estudo. Numeração em função da ordem de coleta.

Nº	Plantas	Localidade da população	Estado	Código	Coordenadas	Altitude
1	1-15	Bom Jesus	RS	BJS	28°32' S 50°39' W	967 m
2	16-30	Lages	SC	LGS	27°54' S 50°25' W	887 m
3	31-45	São Joaquim	SC	SJQ	28°12' S 49°59' W	1318 m
4	46-60	Bom Retiro	SC	BRT	27°47' S 49°26' W	897 m
5	61-75	Rancho Queimado	SC	RQM	27°39' S 49°09' W	300 m
6	76-90	Caçador	SC	CDR	26°50' S 51°00' W	830 m
7	91-105	Campos Novos	SC	CNS	27°22' S 51°05' W	922 m
8	106-120	Concórdia	SC	CCD	27°21' S 51°55' W	487 m
9	121-135	Major Vieira	SC	MVR	26°23' S 49°59' W	810 m
10	136-150	Curitibanos	SC	CBS	27°18' S 50°37' W	972 m
11	151-165	Videira	SC	VDR	27°01' S 51°07' W	770 m
12	166-180	Passo Fundo	RS	PFD	28°14' S 52°19' W	735 m
13	181-195	Catanduvas	SC	CTV	27°03' S 51°39' W	946 m
14	196-210	Nova Petrópolis	RS	NPT	29°23' S 51°07' W	575 m
15	211-225	Gramado	RS	GMD	29°21' S 50°59' W	539 m
16	226-240	Lagoa Vermelha	RS	LVM	28°12' S 51°33' W	708 m
17	241-255	Ponte Serrada	SC	PTS	26°54' S 57°50' W	1053 m
18	256-270	Curitiba	PR	CWB	25°25' S 49°19' W	972 m
19	271-285	Irati	PR	IRT	25°22' S 50°52' W	806 m
20	286-300	Pato Branco	PR	PBC	26°22' S 52°28' W	856 m
21	301-315	Ponta Grossa	PR	PGR	25°02' S 50°18' W	873 m
22	316-330	Turvo	PR	TRV	25°03' S 51°32' W	1067 m
23	331-345	Laranjeiras do Sul	RS	LJS	25°22' S 52°23' W	847 m
24	346-360	Chopinzinho	PR	CHP	25°55' S 52°53' W	893 m
25	361-375	Imbaú	PR	IMB	24°27' S 50°45' W	904 m
26	376-390	Dois Vizinhos	PR	DSV	25°44' S 52°50' W	532 m
27	391-405	Palmital	PR	PLM	24°53' S 51°40' W	812 m
28	406-420	Faxinal	PR	FXN	23°59' S 51°19' W	850 m
29	421-435	Manoel Ribas	PR	MRB	24°24' S 51°39' W	759 m
30	436-450	Campos do Jordão	SP	CJD	22°44' S 45°35' W	1628 m
31	451-465	San Pedro	ARG	MIS	26°51' S 54°00' W	820 m
32	466-478	Caçapava do Sul	RS	CPV	30°30' S 53°29' W	460 m
33	479-493	Urubici	SC	URU	28°00' S 49°35' W	1600 m
34	494-508	Barbacena	MG	BAR	21°13' S 43°46' W	1100 m
35	509	Águas de Lindóia	SP	AGL	22°28' S 46°37' W	940 m
36	510	Nova Friburgo	RJ	NFR	22°16' S 42°31' W	1300 m

As árvores foram escolhidas aleatoriamente a cada 400 metros em cada população. As acículas foram coletadas com a utilização de estilingue. Cerca de três a quatro gramas de acículas sadias, por planta, foram acondicionadas em sacos plásticos (Ziplock®) contendo sílica gel, visando à desidratação das mesmas até o momento do isolamento dos ácidos nucleicos.

## 5.2. Extração de DNA total

A extração de DNA total (nuclear e plastidial e mitocondrial) a partir de acículas sadias, foi efetuada com base no protocolo desenvolvido por Doyle e Doyle (1990) e adaptado por Stefenon *et al.* (2003).

Cerca de 100 a 150 mg de acículas foram maceradas com o auxílio de pistilos em cadinhos de porcelana com nitrogênio líquido até a formação de um pó fino. Sobre este macerado foram adicionados 3,0 ml de tampão de extração (2 % CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1% PVP e 2%  $\beta$ -mercaptoetanol) pré-aquecido a 60 °C. Desta solução, 1,0 ml foi transferido para um microtubo de 2,0 ml e colocado em banho-maria a 60 °C durante uma hora com inversão dos tubos a cada 5 min. Este processo foi realizado em duplicata.

Os microtubos foram retirados do banho-maria e permaneceram sobre a bancada até atingirem a temperatura ambiente. Após, em capela de exaustão, foi realizada a primeira extração de contaminantes orgânicos, com o acréscimo de 1,0 ml de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1). Os microtubos foram invertidos suavemente durante 5 min visando homogeneizar a solução. Depois deste procedimento, os tubos foram centrifugados por 10 min a 13.000 rpm (15.115 g). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 2,0 ml para a segunda extração, sendo acrescentado 1,0 ml de CIA. O processo de inversão por 5 min foi repetido, e após isso os microtubos foram novamente centrifugados por 10 min a 13.000 rpm (15.115 g).

O sobrenadante final das duplicatas foi transferido e reunido em um microtubo de 1,5 ml, sendo neste acrescentados 1.000  $\mu$ l de etanol absoluto a -20 °C. Os tubos permaneceram durante 12 h em freezer -20 °C para a precipitação dos ácidos nucleicos e então centrifugados por 10 min a 7.000 rpm (4.383 g) para a formação do precipitado ou *pellet*.

Após a formação do *pellet*, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado uma vez por dez min com 1,0 ml de etanol 76% e 10 mM de acetato de amônio. Após isso, o *pellet* permaneceu secando durante 12 h em temperatura ambiente. Posteriormente, o *pellet* foi ressuspensionado em 100  $\mu$ l de tampão TE contendo 10  $\mu$ g/ml de RNase. Os microtubos foram encubados em estufa a 37 °C durante uma hora para a digestão do RNA. Finalmente, os tubos foram acondicionados em freezer -20 °C para as posteriores análises moleculares.

A quantidade e qualidade do DNA total foram avaliadas pelo espectrofotômetro Nanodrop 1000® (*Thermo Scientific*) e por estimativa visual em gel de agarose 0,8% (Sambrook e Russel, 2001) corado com GelRed® (Biotium). O DNA total foi diluído na concentração de 3,5 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> em água ultra pura autoclavada.

### 5.3. Caracterização genética de espaçadores intergênicos de *cpDNA*

#### 5.3.1. Iniciadores universais para *cpDNA*

Foram utilizados três pares de iniciadores universais de *cpDNA* (Tabela 3) sintetizados com base no genoma cloroplastidial do tabaco (*Nicotiniana tabacum*), (Demesure *et al.*, 1995).

Os três pares de iniciadores foram escolhidos com base nos resultados encontrados em *Araucaria angustifolia* por Schlögl (1997), que encontrou polimorfismo destas regiões não codificantes, com a técnica de PCR-RFLP, em relação a outros 14 espaçadores intergênicos cloroplastidiais. Outro fato que auxiliou na escolha destes marcadores foi a capacidade de sequenciamento Sanger bi-direcional sem a utilização de iniciadores internos.

A Figura 5 representa as posições e direções dos cinco iniciadores universais de *cpDNA* em *Cryptomeria japonica* D. Dom (Hirao *et al.*, 2008). Os valores das posições dos locos em estudo no genoma cloroplastidial de *Quercus robur* se encontram na Tabela 3.

Estas espécies foram utilizadas como referência na Figura 5 e na Tabela 3, pois a sequência completa do genoma cloroplastidial de *Araucaria angustifolia* ainda não está disponível.



**Tabela 3.** Caracterização dos três pares de iniciadores de regiões não codificantes do genoma cloroplastidial (Demesure *et al.*, 1995).

Locos	Iniciadores	Sequência 5' - 3'	Tamanho	Posição <sup>b</sup> em	Tamanho encontrado	%CG	T° C
			observado em	<i>Quercus robur</i>	neste trabalho em		
			<i>Quercus robur</i> (pb)	(pb)	<i>A. angustifolia</i> (pb)		
<b>DT*</b>	1- <i>trnD</i> [tRNA-Asp (GUC)]	<b>CTACCACTGAGTTAAAAGGG</b>	1213	31980-33192	1400	45	54,0
	2- <i>trnI</i> [tRNA-Thr (GGU)]	<b>ACCAATTGAACTACAATCCC</b>				40	
<b>CS</b>	3- <i>psbC</i> [psII 44 kd protein] <sup>c</sup>	<b>GGTTCGAAATCCCTCTCTCTC</b>	1611	35543-37153	1500	55	58,0
	4- <i>trnS</i> [tRNA-Ser (UGA)]	<b>GGTCGTGACCAAGAAAACCAC</b>				55	
<b>SfM**</b>	5- <i>trnS</i> [tRNA-Ser (UGA)]	<b>CATAACCTTGAGGTCACGGG</b>	1254	37134-38387	1200	55	62,7
	6- <i>trnM</i> [tRNA-fMet (CAU)]	<b>GAGAGAGAGGGATTCTGAACC</b>				55	

<sup>b</sup>Localização do 5' - *end* de cada iniciador nesta sequência.

\* O espaçador intergênico *trnD-trnI* contém dentro dele a sequência de dois outros genes (*trnY* e *trnE*). Portanto, entre os genes *trnD* e *trnI* estão presentes três regiões não codificantes. Na composição final do espaçador DT, as duas regiões codificantes (*trnY* e *trnE*) foram retiradas.

\*\* O espaçador intergênico *trnS-trnM* contém dentro dele a sequência de dois outros genes (*psbZ* e *trnG*). Portanto, entre os genes *trnS* e *trnM* estão presentes três regiões não codificantes. Na composição final do espaçador SfM, as duas regiões codificantes (*psbZ* e *trnG*) foram retiradas.

### 5.3.2. Padronização da amplificação via reação em cadeia da polimerase – PCR

As reações iniciais de amplificação dos três locos de DNA cloroplastidial da Tabela 4, foram efetuadas com base na metodologia proposta por Demesure *et al.*, (1995). Em função da herança paterna (via pólen) do genoma cloroplastidial, as reações de PCR foram padronizadas até que o produto de amplificação fosse uma banda nítida e de tamanho (em pares de base – pb) aproximado aos resultados encontrados por Demesure e colaboradores (1995) para *Quercus robur*. Os ajustes na metodologia proposta por Demesure *et al.*, (1995), foram efetuados principalmente em função do tamanho dos produtos de amplificação e do conteúdo de CG (%) dos iniciadores (Innis *et al.*, 1990).

**Tabela 4.** Componentes e concentrações utilizadas nas reações de amplificação via PCR dos três locos de *cpDNA* do presente estudo.

Componentes	Concentração	Concentração final
	<b>Estoque</b>	
DNA	3,5 ng $\mu\text{L}^{-1}$	20 ng
Tampão 10X	10X	1 X
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 mM
dNTP <sup>1</sup>	2,5 mM (cada)	0,3 mM (cada)
Iniciador 1	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$
Iniciador 2	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$
H <sub>2</sub> O ultra pura (PCR grade water)	-	7,9 $\mu\text{L}$
DNA polimerase <sup>2</sup>	5 U $\mu\text{L}^{-1}$	1,0 U
Volume final ( $\mu\text{L}$ )		20,0

<sup>1</sup>dNTP set (GE Healthcare)

<sup>2</sup>ACCUZYME High fidelity™ DNA Polymerase, (BIOLINE™)

A Tabela 5 apresenta as condições padronizadas de ciclagem (temperatura T °C e tempo) para a amplificação dos três espaçadores intergênicos utilizados.

**Tabela 5.** Condições de ciclagem (temperatura T °C e tempo) para a amplificação via PCR<sup>1</sup> dos três locos de *cpDNA* do presente estudo.

Passo	Descrição	Loco DT		Loco CS		Loco SfM	
		T °C	Tempo	T °C	Tempo	T °C	Tempo
1	Desnaturação inicial	94	3'	94	4'	94	3'
2	Desnaturação	94	55''	92	45''	94	30''
3	Hibridização de iniciadores	54	55''	58	45''	62,7	50''
4	Extensão	72	2'55''	72	2'	72	55''
5	Número de ciclos	31		30		31	
6	Extensão final	72	10'	72	10'	72	10''

<sup>1</sup>Termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf)

### 5.3.3. Purificação pós-amplificação

Após cada reação de amplificação, os produtos foram purificados, objetivando a retirada de iniciadores direto, reverso e dNTPs não incorporados durante as amplificações. Esta purificação foi necessária, pois a reação subsequente (sequenciamento de DNA – terminação de cadeia) acontece na presença de apenas um iniciador.

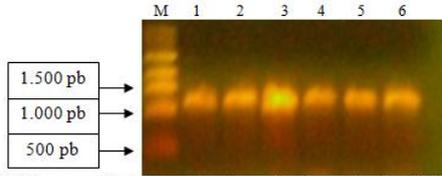
A cada reação, foram adicionados 20,0 µL de PEG 800 20% contendo cloreto de sódio 2,5 M. As reações foram levemente agitadas (em Vortex®) e incubadas por 30 min em estufa a 37 °C.

Após, as reações foram centrifugadas em temperatura ambiente durante 15 min a 13.000 rpm (15.115 g). O sobrenadante foi removido e foi adicionado 125,0 µL de etanol 80% (4,0 °C) para a lavagem do *pellet*. As reações foram centrifugadas em temperatura ambiente durante 8 min a 13.000 rpm (15.115 g). O sobrenadante foi novamente removido e em seguida foram adicionados 125,0 µL de etanol 80% (4,0 °C) para a lavagem do *pellet*. As reações foram novamente centrifugadas em temperatura ambiente durante 8 min a 13.000 rpm (15.115 g).

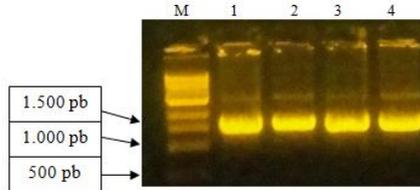
O sobrenadante foi removido e deixou-se o *pellet* secar em estufa a 37 °C. Após esta etapa, o *pellet* foi ressuscitado (durante 30 min a 37 °C) em 15,0 µL de água ultra pura autoclavada.

O produto de PCR purificado foi posteriormente quantificado por estimativa visual em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed (Biotium®), por comparação com o padrão de bandas do marcador 1 kb DNA *ladder* (New England Biolabs®).

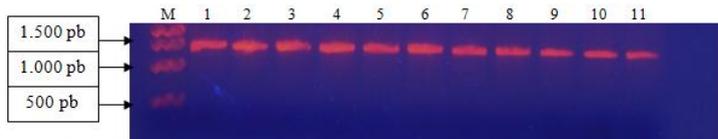
As Figuras 6, 7 e 8 representam a amplificação dos três espaçadores intergênicos utilizados neste estudo.



**Figura 6.** Gel de agarose 1,0 % representando a padronização dos loco SfM. M: Marcador 1 kb DNA *ladder* (New England BioLabs); 1 a 6: Produtos de amplificação do loco SfM (aprox. 1.200 pb).



**Figura 7.** Gel de agarose 1,0 % representando a padronização do loco CS. M: Marcador 1 kb DNA *ladder* (New England BioLabs); 1 a 4: Produtos de amplificação do loco CS (aprox. 1.500 pb).



**Figura 8.** Gel de agarose 1,0 % representando a padronização do loco DT. M: Marcador 1 kb DNA *ladder* (New England BioLabs); 1 a 11: Produtos de amplificação do loco DT (aprox. 1.400 pb).

### 5.3.4. Sequenciamento de DNA em todas as populações

#### 5.3.4.1. Reações de sequenciamento

Depois de otimizados, amplificados e purificados, os produtos de amplificação dos três pares iniciadores cloroplastidiais foram sequenciados, pelo método de terminação de cadeia (Sanger *et al.*, 1977), de todos os indivíduos amostrados das populações em estudo com o kit *DYEnamic<sup>TM</sup> ET dye terminator*® (GE Healthcare) em um sequenciador de DNA MegaBACE 1000 DNA Analisis System (GE Healthcare).

As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas em um volume total de 10,0  $\mu\text{L}$ , contendo: 1,0  $\mu\text{L}$  de produto de amplificação purificado ( $100 - 200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) da primeira reação de amplificação (item 5.4.2., Tabela 4); 0,35  $\mu\text{L}$  de iniciador (estocado a 10,0  $\mu\text{M}$ ); 4,0  $\mu\text{L}$  do *mix DYEnamic<sup>TM</sup> ET dye terminator*® (GE Healthcare), e 5,35  $\mu\text{L}$  de água ultra pura autoclavada.

Os 30 ciclos de amplificação foram compostos de: desnaturação a 95 °C por 20 s, seguido da hibridização do iniciador a 50 °C por 15 s e extensão enzimática (enzima *Thermo Sequenase<sup>TM</sup> II DNA polimerase®*, GE Healthcare) a 60 °C durante 1 min e 30 s.

#### 5.3.4.2. Purificação pós-reação de sequenciamento

Após cada reação de sequenciamento, os produtos de amplificação foram purificados (*clean up*), objetivando a retirada de iniciadores, dNTPs e ddNTPs não incorporados em *amplicons*.

A cada reação de sequenciamento, foi adicionado 1,0 µL de acetato de amônio 7,5 M e 27,5 µL de etanol absoluto (4,0 °C), sendo que a concentração final de etanol foi de 70%. Cada placa foi agitada levemente para homogeneizar a solução.

As placas foram mantidas por 20 min em freezer -20 °C para permitir a precipitação dos ácidos nucleicos. Após isso, foram centrifugadas a 4,0 °C durante 30 min a 4.000 RPM (2.500 g). O sobrenadante foi removido por inversão e foi adicionado 150 µL de etanol 70% (4,0 °C) para a lavagem do *pellet*. As reações foram novamente centrifugadas a 4,0 °C durante 20 min a 4.000 RPM (2.500 g).

O sobrenadante foi novamente removido por inversão e deixou-se o *pellet* secar em ambiente escuro. Após esta etapa, o *pellet* foi ressuspenso (durante 12 h em ambiente escuro a 4,0 °C) em 10,0 µL de *Loading solution* (GE Healthcare).

#### 5.3.4.3. Eletroforese capilar

Anteriormente a cada eletroforese capilar, as placas com DNA ressuspenso foram vigorosamente agitadas (em Vortex<sup>®</sup>) e brevemente centrifugadas em seguida. As amostras de cada reação de sequenciamento foram eletro-injetadas (0,2 µL) em matriz LPA (poliacrilamida linear) a 3 kV durante 1 min e 20 s. Após isso, as amostras foram eletro-eluídas a 9 kV durante 1 hora e 40 min a 45 °C.

Após a corrida de sequenciamento, os eletroferogramas foram processados (*base calling*) com a utilização da ferramenta Cimarrom 3.12, contida no *software* Sequence Analyzer v. 4.0 (GE Healthcare).

A Tabela 6 mostra a representação esquemática de uma placa de sequenciamento por eletroforese capilar de 96 reações. Foram efetuadas reações em triplicata para os iniciadores direto e reverso, visando a

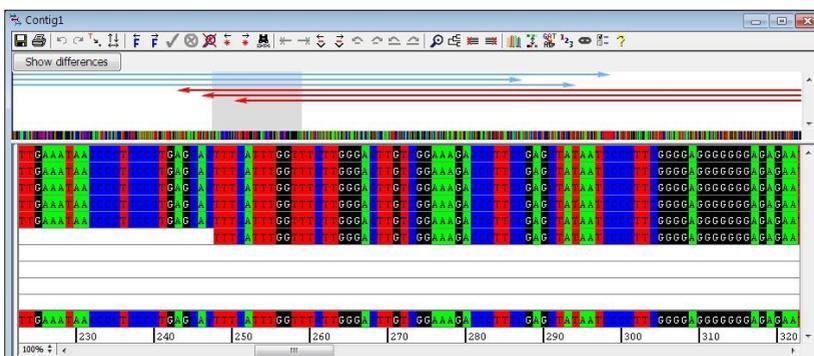
garantia da fidelidade das sequências obtidas e a geração de sobreposição de bases (*overlapping*) para a montagem dos *contigs*. Para cada corrida eletroforética, foram efetuadas seis reações controle, visando a garantia do correto funcionamento do kit de sequenciamento.

**Tabela 6.** Representação esquemática de uma placa contendo 96 reações (8 linhas x 12 colunas) para o sequenciamento de um espaçador intergênico em uma população. Os números de 1 a 15 representam as plantas de uma população. **F:** iniciador direto, em triplicata. **R:** iniciador reverso, em triplicata. M13mp18: reações controle contendo ssDNA viral.

1 F	1 F	1 F	1 R	1 R	1 R	2 F	2 F	2 F	2 R	2 R	2 R
3 F	3 F	3 F	3 R	3 R	3 R	4 F	4 F	4 F	4 R	4 R	4 R
5 F	5 F	5 F	5 R	5 R	5 R	6 F	6 F	6 F	6 R	6 R	6 R
7 F	7 F	7 F	7 R	7 R	7 R	8 F	8 F	8 F	8 R	8 R	8 R
9 F	9 F	9 F	9 R	9 R	9 R	10 F	10 F	10 F	10 R	10 R	10 R
11 F	11 F	11 F	11 R	11 R	11 R	12 F	12 F	12 F	12 R	12 R	12 R
13 F	13 F	13 F	13 R	13 R	13 R	14 F	14 F	14 F	14 R	14 R	14 R
15 F	15 F	15 F	15 R	15 R	15 R	M13 mp18	M13 mp18	M13 mp18	M13 mp18	M13 mp18	M13 mp18

#### 5.3.4.4. Alinhamento e montagem de sequências

As seis sequências obtidas para cada indivíduo (três para o iniciador direto e três para o iniciador reverso) foram extraídas do programa Sequence Analyzer v. 4.0 (GE Healthcare) em formato SCF (.scf) após a análise da qualidade das mesmas. Foram extraídas somente as sequências possuidoras de mais de 95% de qualidade. Posteriormente, as sequências foram alinhadas e montadas para cada loco com a utilização do programa *Codon Code Aligner* versão 3.7.1. (Figura 9).



**Figura 9.** Alinhamento e montagem das seis sequências para o loco SfM em um indivíduo de *Araucaria angustifolia*, com a utilização do programa *Codon Code Aligner* versão 3.7.1. Neste caso não foram observadas discrepâncias de bases nem a presença de *gaps*.

## 5.4. Análises genéticas

### 5.4.1. Diversidade de haplótipos ( $h$ ) e nucleotídeos ( $\pi$ )

Os haplótipos foram identificados por meio da análise das sequências no programa DnaSP v5 (Librado e Rozas, 2009), sendo identificados individualmente para cada loco e depois de forma combinada para os locos analisados.

Os índices de diversidade de haplótipos ( $h$ ), (Watterson, 1975), e nucleotídeos ( $\pi$ ), (Tajima, 1983), foram calculados nos níveis populacionais e total com a utilização do programa Arlequin ver 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2005).

O índice de diversidade de haplótipos ( $h$ ), é a medida que define a probabilidade de dois indivíduos aleatórios possuírem haplótipos diferentes uma população (Watterson, 1975).

O índice de diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) é uma medida que define o número médio de diferenças nucleotídicas por sítio, entre duas ou mais sequências de DNA, ou a probabilidade de dois nucleotídeos homólogos escolhidos ao acaso serem diferentes em uma população (Tajima, 1983).

O teste  $D^*$  de Tajima (Tajima, 1989) foi aplicado para testar casos de desvios da neutralidade, expansão e declínio populacional.

O objetivo do teste de Tajima é identificar sequências que não se encaixam no modelo da teoria neutra em equilíbrio entre mutação e deriva genética (Tajima, 1989).

### 5.4.2. Índices de Fixação

Foi calculado o índice de fixação  $F_{st}$  para todas as combinações de populações par a par, por meio do programa Arlequin ver 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2005).

### 5.4.3. Análise da Variância Molecular – AMOVA

A análise da estrutura populacional foi realizada por meio da Análise da Variância Molecular – AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992). Foram efetuadas duas análises, uma contendo duas fontes de variação (entre populações e dentro de populações), e outra contendo três fontes de variação (entre grupos, entre populações dentro de grupos e dentro de

populações). Todas as análises foram realizadas com a utilização do programa Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2005).

#### 5.4.4. Rede de Haplótipos

A rede de haplótipos (Figura 10) foi construída baseada em *Median-Joining* MJ (Bandelt *et al.*, 1999), com a utilização do programa Network 4.610 (Fluxus Technology Ltd. em [www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Nível de polimorfismo dos espaçadores integênicos

Os haplótipos finais foram definidos pelo programa DnaSP v5 a partir dos sítios polimórficos encontrados da junção das sequências não codificantes dos três espaçadores. No total foram encontrados 16 haplótipos distintos, variando de 4 a 8 para as três regiões do cpDNA analisadas (Tabela 7).

Na Tabela 7 são apresentados os resultados da análise individual de cada um dos três espaçadores em todos os indivíduos amostrados, em termos de tamanho de sequência analisada, número de sítios polimórficos, bem como diversidade de haplótipos de cada uma das três regiões de cpDNA.

**Tabela 7.** Tamanho dos locos em pares de base, número de sítios polimórficos, diversidade total de haplótipos, diversidade total de nucleotídeos e número de haplótipos encontrados.

Loco	DT	CS	SfM	Multiloco
Tamanho* (pb)	1.400	1.500	1.200	<b>4.100</b>
Tamanho das sequências utilizadas nas análises (pb)	514	1.120	874	<b>2.508</b>
Número de sítios polimórficos	5	4	3	<b>12</b>
Diversidade total de haplótipos	0,556 $\pm$ 0,022	0,325 $\pm$ 0,027	0,561 $\pm$ 0,016	<b>0,828<math>\pm</math>0,013</b>
Diversidade total de nucleotídeos	0,00126 +/-0,00108	0,00033 +/-0,00035	0,00080 +/-0,00067	<b>0,00068 +/-0,00044</b>
Número de haplótipos observados	6	8	4	<b>16</b>

\*Tamanho aproximado

O loco DT foi o que mais contribuiu com sítios polimórficos para a análise, sendo encontrados 5 sítios em 514 bases sequenciadas. Valor este considerado alto quando comparado com os outros dois locos CS e SfM, que apresentaram somente 4 sítios polimórficos em 1120 bases e 3 sítios polimórficos em 874 bases, respectivamente.

Entretanto, o loco CS revelou um maior número de haplótipos em relação aos demais locos, mesmo possuindo um sítio polimórfico a menos que o loco DT. Isto aconteceu, pois nos sítios polimórficos do loco CS aconteceram mais de dois tipos diferentes de eventos mutacionais, culminando em um maior número de haplótipos identificados. Em relação ao índice de diversidade de haplótipos ( $h$ ), o loco SfM apresentou o maior valor. O índice de diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) foi maior para o loco CS (Tabela 7).

Após combinados os sítios polimórficos, haplótipos e índices de diversidade genética dos três locos foram obtidos um total de 16 haplótipos, oriundos de 12 sítios polimórficos, resultante da análise de 2508 pares de bases.

Schlögl *et al.*, (2007) encontraram, utilizando PCR-RFLP, outros espaçadores intergênicos polimórficos em *cpDNA* para *Araucaria angustifolia*. No entanto estas regiões portam baixo número de sítios polimórficos (AS- 2 sítios; QR- 1 sítio; K1K2- 2 sítios).

Utilizando PCR-RFLP, Marchelli *et al.*, (2010) encontraram sítios polimórficos para *Araucaria araucana* em outros quatro locos (CD- 3 sítios; QS- 2 sítios; SR- 1 sítio; SC- 3 sítios).

## 6.2. Distribuição e diversidade de haplótipos ( $h$ ) e nucleotídeos ( $\pi$ )

Na Tabela 8 são apresentados os haplótipos resultantes da combinação dos três locos em estudo e a distribuição destes haplótipos entre os indivíduos das populações amostradas. Na população de São Joaquim foram encontrados cinco haplótipos, sendo esse o maior número de haplótipos encontrados em uma única população.

Foi possível observar a formação de três grupos populacionais em função da distribuição dos haplótipos entre as populações. Estes grupos foram assim denominados: GN- Grupo Norte, contendo as populações de Barbacena, Campos do Jordão e os haplótipos isolados de Águas de Lindóia e Nova Friburgo; GC- Grupo Centro, contendo as populações do estado do Paraná; GS- Grupo Sul; contendo as populações do estado de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e da província de San Pedro.

Os critérios para essa separação foram: GN, por possuir haplótipos exclusivos (H1, H2, H3 e H4) em relação aos do sul do Brasil e estarem distanciados geograficamente em relação aos demais grupos; GC, por possuir o segundo haplótipo mais frequente (H5) e sua variação (H6), além dos haplótipos H7 e H8 que ocorrem predominantemente no

estado do Paraná; GS, por possuírem o haplótipo H9 e/ou suas variações (H10 até H16).

Entre as populações, as únicas a possuírem haplótipos exclusivos foram as populações de Barbacena e de Campos do Jordão, denominados de haplótipos H2 e H4 (Tabela 8). Estes haplótipos podem vir a ser encontrados em outras populações, caso futuramente ocorra uma ampliação da amostragem para novas populações situadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais.

**Tabela 8.** Posições dos sítios variáveis das sequências alinhadas dos três locos de *cpDNA* (*trnD-trnT*, *psbC-trnS* e *trnS-trnfM*), e distribuição dos 16 haplótipos identificados em *Araucaria angustifolia*.

Posição de cada sítio ->	<i>trnD-trnT</i>				<i>psbC-trnS</i>				<i>trnS-trnfM</i>				Paraná																
	0	1	2	3	4	1	3	6	6	2	6	8	M.G.	S. Paulo			R.J.			Paraná									
Haplótipo	4	5	4	7	9	6	0	2	4	9	6	4	BAR	AGL	CJD	NFR	FXN	MRN	IMB	PLM	PGR	TRV	LJS	IRT	CWB	DSV	CHP	PBC	
H1	A	T	A	T	C	T	A	G	T	C	T	T	8																
H2	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	6																
H3	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	7	1													
H4	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.			6														
H5	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					6	6	10	5	2	14	5	1	1	9	8	4	
H6	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.						2		3	2	1	3		5				
H7	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					3			7			7	1	7			3	
H8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A					6	7	5		11			13	7				
H9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C															7	8	
H10	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C													1				
H11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C																	
H12	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C																	
H13	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	C																	
H14	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C																	
H15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C																	
H16	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	C																	

Os traços nas linhas H15 e H16 indicam inserções-deleções (*indels*). As sequências estão numeradas no sentido 5' - 3'. Ver apêndices 1, 2 e 3 para as sequências completas dos três espaçadores intergênicos.

**Tabela 8. Continuação.** Posições dos sítios variáveis das sequências alinhadas dos três locos de *cpDNA* (*trnD-trnT*, *psbC-trnS* e *trnS-trnM*), no qual foram identificados 16 haplótipos em *Araucaria angustifolia*.

Haplótipo	Santa Catarina											Rio Grande do Sul						Arg.	Total			
	MVR	PTS	VDR	CTV	CBS	CCD	CDR	CNS	RQM	BRT	LGS	URU	SJQ	LVM	PFD	BJS	GMD	NPT		CPV	MIS	
H1																					10	
H2																						6
H3																						10
H4																						6
H5		1																		3		75
H6																						16
H7	8																					36
H8	3		1			1																54
H9	4	7	7	9	9	10	9	6	13	11	7	14	4	11	12	9	10	10	5			182
H10		7					6		2		6		5	1	2					8		38
H11				6	5	4				4	2	1	3	3						3		31
H12			7		1			8					2									18
H13												1				5						6
H14								1							1							2
H15																1	4	3	7	1		16
H16																	1	2	1			4

Das 14 substituições de sítio observadas, nove foram tranverções purina-pirimidina e cinco foram transições pirimidina-pirimidina. Os haplótipos H15 e H16 apresentaram a deleção da base número 136 para o loco CS. Como o H16 apresenta uma base adicional mutada e está em menor frequência que H16, pode-se inferir que este se originou a partir de H15. A Tabela 9 apresenta os resultados da diversidade de haplótipos ( $h$ ) e de nucleotídeos ( $\pi$ ) para cada população de *Araucaria angustifolia*.

**Tabela 9.** Populações, número e tipos de haplótipos encontrados por população, diversidade de haplótipos ( $h$ ) e nucleotídeos ( $\pi$ ) na combinação dos três locos.

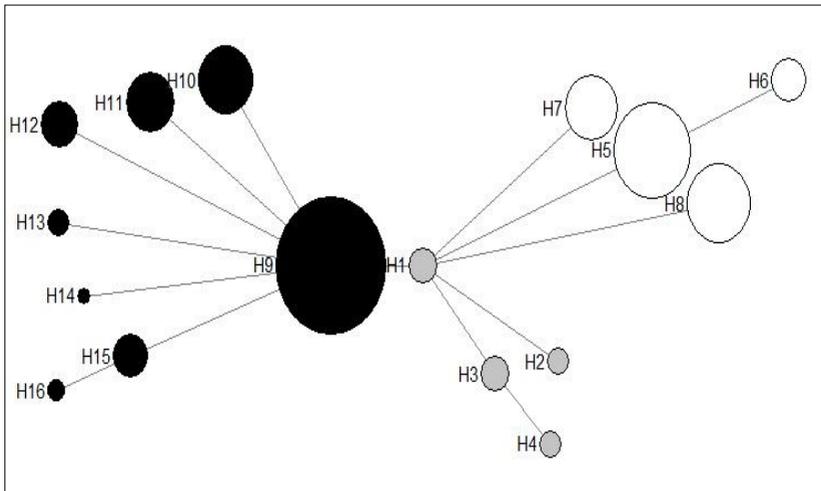
População	No. de haplótipos	Haplótipos (No. de indivíduos)	$h$	$\pi$
Barbacena	3	Hap 1(8); Hap 2(6); Hap 3(1)	0,591 +/-0,077	0,00026+/-0,00024
Nova Friburgo	1	Hap 3(1)	-	-
Agua de Lindóia	1	Hap 3(1)	-	-
Campos do Jordão	3	Hap 1(2); Hap 3(7); Hap 4(6)	0,648 +/-0,072	0,00030+/-0,00026
Faxinal	3	Hap 5(6); Hap 7(3); Hap 8(6)	0,686 +/-0,062	0,00055+/-0,00040
Manoel Ribas	3	Hap 5(6); Hap 6(2); Hap 8(7)	0,648 +/-0,072	0,00050+/-0,00039
Imbaú	2	Hap 5(10); Hap 8(5)	0,476 +/-0,092	0,00038+/-0,00031
Palmital	3	Hap 5(5); Hap 6(3); Hap 7(7)	0,676 +/-0,070	0,00056+/-0,00041
Ponta Grossa	3	Hap 5(2); Hap 6(2); Hap 8(8)	0,457 +/-0,141	0,00043+/-0,00034
Turvo	2	Hap 5(14); Hap 6(1)	0,133 +/-0,112	0,00005+/-0,00009
Laranjeiras do Sul	3	Hap 5(5); Hap 6(3); Hap 7(7)	0,676 +/-0,070	0,00056+/-0,00041
Irati	3	Hap 5(1); Hap 7(1); Hap 8(13)	0,251 +/-0,142	0,00021+/-0,00021
Curitiba	3	Hap 5(1); Hap 7(7); Hap 8(7)	0,600 +/-0,069	0,00048+/-0,00036
Dois Vizinhos	3	Hap 5(9); Hap 6(5); Hap 10(1)	0,562 +/-0,095	0,00035+/-0,00029
Chopinzinho	2	Hap 5(8); Hap 9(7)	0,533 +/-0,052	0,00043+/-0,00033
Pato Branco	3	Hap 5(4); Hap 7(3); Hap 9(8)	0,648 +/-0,088	0,00053+/-0,00038
Major Vieira	3	Hap 7(8); Hap 8(3); Hap 9(4)	0,648 +/-0,088	0,00053+/-0,00038
Caçador	2	Hap 9(9); Hap 10(6)	0,514 +/-0,069	0,00021+/-0,00021
Ponte Serrada	3	Hap 5(1); Hap 9(7); Hap 10(7)	0,600 +/-0,069	0,00032+/-0,00027
San Pedro	4	Hap 5(3); Hap 10(8) Hap 11(3); Hap 15(1)	0,676 +/-0,101	0,00068+/-0,00047
Vieira	3	Hap 8(1); Hap 9(7); Hap 12(7)	0,600 +/-0,069	0,00032+/-0,00027
Catanduvas	2	Hap 9(9); Hap 11(6)	0,513 +/-0,069	0,00022+/-0,00021
Curitiba	3	Hap 9(9); Hap 11(5); Hap 12(1)	0,562 +/-0,095	0,00024+/-0,00023
Concórdia	3	Hap 8(1); Hap 9(10); Hap 11(4)	0,513 +/-0,116	0,00027+/-0,00025
Campos Novos	3	Hap 9(6); Hap 12(8); Hap 14(1)	0,591 +/-0,077	0,00027+/-0,00024
Rancho Queimado	2	Hap 9(13); Hap 10(2)	0,248 +/-0,131	0,00010+/-0,00013
Bom Retiro	2	Hap 9(11); Hap 11(4)	0,419 +/-0,113	0,00017+/-0,00018
Lages	3	Hap 9(7); Hap 10(6); Hap 11(2)	0,648 +/-0,072	0,00030+/-0,00026
Urubici	2	Hap 9(14); Hap 11(1)	0,133 +/-0,112	0,00005+/-0,00009
São Joaquim	5	Hap 9(4); Hap 10(5); Hap 11(3) Hap 12(2); Hap 13(1)	0,448 +/-0,135	0,00087+/-0,00005
Lagoa Vermelha	3	Hap 8(11); Hap 10(1); Hap 11(3)	0,448 +/-0,135	0,00019+/-0,00020
Passo Fundo	3	Hap 9(12); Hap 10(2); Hap 14(1)	0,362 +/-0,145	0,00015+/-0,00017
Bom Jesus	3	Hap 9(9); Hap 13(5); Hap 15(1)	0,562 +/-0,095	0,00024+/-0,00023
Gramado	3	Hap 9(10); Hap 15(4); Hap 16(1)	0,514 +/-0,116	0,00024+/-0,00023
Nova Petrópolis	3	Hap 9(10); Hap 15(3); Hap 16(2)	0,533 +/-0,126	0,00029+/-0,00026
Caçapava do Sul	3	Hap 9(5); Hap 15(7); Hap 16(1)	0,603 +/-0,089	0,00027+/-0,00025
<b>Total:</b>	<b>16</b>	Hap1(10); Hap 2(6); Hap 3(10); Hap4(6); Hap 5(75); Hap 6(16); Hap7(36);Hap8(54);Hap9(182);Hap10(38); Hap11(31);Hap 12(18);Hap13(6);Hap 14(2);Hap 15(16); Hap 16(4).	0,823+/-0,012	0,00068+/-0,00044

Os valores de diversidade de haplótipos ( $h$ ) foram relativamente elevados, com exceção de populações como Urubici, Rancho Queimado, Irati e Turvo, cujos valores para  $h$  foram menores que 0,251 e

apresentaram amplo domínio de um haplótipo específico dentro da população (Tabela 9).

Patreze e Tsai (2010) sequenciaram parcialmente o *intron matK* em 105 plantas de Campos do Jordão e obtiveram um valor elevadíssimo de diversidade nucleotídica ( $\pi:0,001$ ), comparados aos  $\pi:0,000304$  na mesma população deste trabalho. Uma explicação para este fato pode residir na diferente base genética e dinâmica que uma região intragênica (*intron*) possui em relação a espaçadores intergênicos não codificantes (Bock, 2007). Os resultados de Patreze e Tsai (2010) podem ser uma alternativa para a saturação das relações filogeográficas encontradas neste trabalho com o uso do polimorfismo presente no *intron matK*.

Por mais que tenham sido encontrados 16 haplótipos neste estudo, os haplótipos não são muito divergentes entre si. Na formação da rede de haplótipos fica evidente a separação destes nos três grupos populacionais identificados (Figura 10). Este mesmo padrão de diferenciação genética considerando populações de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul foi descrito por Stefenon *et al.* (2008b), baseado em marcadores isoenzimáticos e SSR.



**Figura 10.** Rede de haplótipos baseada na sequência parcial dos locos *trnD-trnT*, *psbC-trnS* e *trnS-trnfM*. Cada linha entre os haplótipos representa um passo mutacional. O tamanho de cada círculo é proporcional a frequência geral de cada haplótipo. As cores dos círculos indicam a ocorrência destes haplótipos

nos 3 grupos populacionais (Branco: Grupo Centro 1; Preto: Grupo Sul 2; Cinza: Grupo Norte).

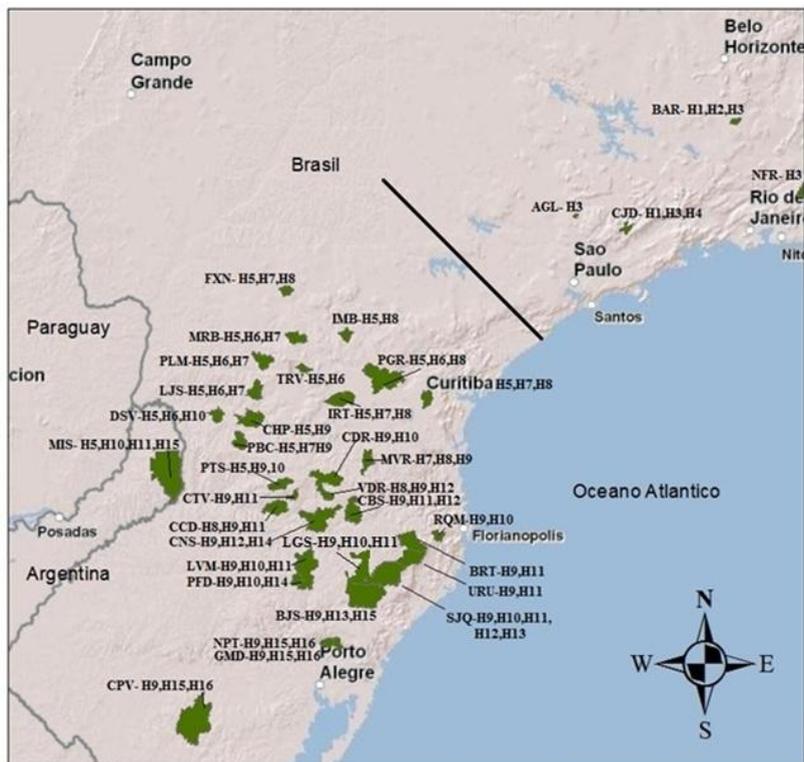
Na análise da rede, as posições centrais indicam o haplótipo encontrado mais ao norte do Brasil (H1 - Barbacena e Campos do Jordão) e o haplótipo mais frequente neste estudo (H9).

A rede mostra também que o haplótipo H9 originou os haplótipos H10 a H16. Outra constatação que reforça esta hipótese está na análise da Tabela 8, na qual o sítio número 646 do espaçador SfM apresenta apenas a base citosina mutada para H9 e esta mesma base e outras variações para os haplótipos de H10 a H16. Além disso, o haplótipo H9 é o mais frequente, ocorrendo em 35% dos indivíduos amostrados. De acordo com a teoria da coalescência (Kingman, 1982), os haplótipos mais frequentes provavelmente são os ancestrais mais antigos. Esta hipótese não pode ser testada nas populações do norte, pois neste grupo a amostragem de populações é menor em comparação com as populações do GC e GS.

Outras três derivações de haplótipos são: H5 originando o H6, H3 originando H4 e H15 originando H16.

O haplótipo H16 em relação aos haplótipos H4 e H6 são os mais divergentes entre si, divergindo em cinco passos mutacionais (quatro substituições de sítio e uma deleção, para H16-H4 e H16-H6). O haplótipo H4 é exclusivo de Campos do Jordão, o haplótipo H6 só ocorre no centro-oeste paranaense e o haplótipo H16 só ocorre no sul do estado do Rio Grande do Sul. Estes padrões de elevada divergência genética entre populações muito distanciadas geograficamente eram de certa forma esperados, pois têm sido demonstrado em estudos utilizando marcadores isoenzimáticos, SSR e AFLPs (e.g. Auler *et al.*, 2002, Sousa *et al.*, 2004, Stefenon *et al.*, 2007).

As variações do haplótipo H9 (e seus derivados H10 a H16) ocorrem quase que exclusivamente em Santa Catarina e no Rio Grande do sul.



0 120 240 480 720 Kilometers

### Populações Naturais Amostradas

Locais de Coleta

Geographic Coordinate System: GCS\_South\_American\_1969  
Datum: D\_South\_American\_1969

**Figura 11.** Mapa representando a distribuição geográfica dos haplótipos de *cpDNA* nas populações de *Araucaria angustifolia*. A linha contínua indica a barreira genética identificada. Ver Tabela 2 para as abreviações das populações e a Tabela 9 para os índices de diversidade molecular.

Os resultados evidenciaram ainda a presença de uma “zona de mistura” entre GC e GS, contendo as populações de San Pedro, Dois Vizinhos, Chopinzinho, Pato Branco, Ponte Serrada, Concórdia, Major Vieira e Videira. Nesta zona, o haplótipo H9 e algumas de suas variações ocorrem conjuntamente, em algumas populações, com o haplótipo H5, sua variação (H6) e com os haplótipos H7 e H8 (Figura 11). Acima desta zona, não existe a ocorrência do haplótipo H9 e de suas variações. E abaixo desta zona, não existe a ocorrência dos haplótipos H5 até H8.

A linha presente na Figura 11 indica uma possível barreira genética decorrente da exclusividade dos haplótipos presentes no sul do Brasil em comparação com os haplótipos do norte, e vice-versa.

Levando-se em consideração os resultados dos três locos, seria possível admitir que foi detectada uma diversidade genética média dentro da maioria das populações e também uma alta diferenciação genética entre populações.

### 6.3. Análise da Variância Molecular – AMOVA

As duas análises de variância efetuadas (Tabela 9 e Tabela 10) procuram avaliar aonde reside a maior parte da diferenciação genética encontrada. Cabe salientar que a distribuição espacial não foi levada em consideração (SAMOVA) no presente estudo.

**Tabela 10.** Análise da variância molecular entre populações e dentro de populações de *Araucaria angustifolia*, baseada nas sequências dos locos de *cpDNA* analisados.

Fonte de variação	g.l.	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação	Índice de fixação	P-value
Entre populações	2	35,219	0,126 Va	26,91	<i>Fst</i> : 0,269	<0,001
Dentro de populações	505	173,020	0,343 Vb	73,09		
<b>Total</b>	<b>507</b>	<b>208,238</b>	<b>0,46878</b>	<b>100,00</b>		

g.l., graus de liberdade.

A Tabela 11 inclui o componente de grupos na análise, sendo estes grupos os três definidos após a análise espacial dos haplótipos (GN, GC e GS). A intenção foi avaliar a porcentagem de variação contida entre as populações dentro de grupos e entre os próprios grupos.

**Tabela 11.** Análise da variância molecular entre grupos, entre populações dentro de grupos e dentro de populações de *Araucaria angustifolia*, baseada nas sequências dos locos de *cpDNA* analisados.

Fonte de variação	g.l.	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação	Índices de fixação	P-value
Entre grupos (GN+GC+GS)	2	35,219	0,118	25,17	<i>Fst</i> : 0,431	<0,001
Entre populações dentro de grupos	31	47,004	0,084	17,92		
Dentro de populações	474	126,015	0,266	56,91		
<b>Total</b>	<b>507</b>	<b>208,238</b>	<b>0,467</b>	<b>100,00</b>		

g.l., graus de liberdade.

Os grupos foram definidos após a análise da distribuição geográfica dos 16 haplótipos encontrados. Nas duas análises (Tabela 10 e Tabela 11), a maior parte da diferenciação encontrada está contida dentro das populações de *Araucaria angustifolia*, em função de algumas populações possuírem haplótipos que outras não possuem e vice-versa.

Na segunda análise de AMOVA (Tabela 11), a fonte de variação que menos captou a variação final foi “entre populações dentro de grupos”, pois dentro de cada um dos três grupos existe a predominância de certo haplótipo entre as populações.

A diferenciação genética entre os grupos foi de 25,17%. Este valor poderia ser maior caso não fosse observada a zona de mistura entre os grupos GS e GC.

#### 6.4. “D” de Tajima

**Tabela 12.** Valores do “D” de Tajima para os grupos e populações de *Araucaria angustifolia*.

Grupos (n° de plantas)	“D” de Tajima	Intervalo de neutralidade (95%)
GN (30)	1,305	-1,807 ~ -2,020
GC (195)	0,793	-1,760 ~ -2,100
GS (283)	<b>-1,043</b>	-1,748 ~ -2,114
Barbacena (15)	0,139	-1,791 ~ -1,984
Campos do Jordão	0,628	“
Faxinal	1,447	“
Manoel Ribas	1,263	“
Imbaú	1,443	“
Palmital	1,570	“
Ponta Grossa	0,526	“
Turvo	<b>-1,160</b>	“
Laranjeiras do Sul	1,570	“
Irati	<b>-1,317</b>	“

**Tabela 12. Continuação.** Valores do “D” de Tajima para os grupos e populações de *Araucaria angustifolia*.

Curitiba	0,894	“
Dois Vizinhos	<b>-0,923</b>	“
Chopinzinho	1,932	“
Pato Branco	1,201	“
San Pedro	0,865	“
Major Vieira	1,2012	“
Ponte Serrada	<b>-0,399</b>	“
Videira	<b>-0,395</b>	“
Catanduvas	1,376	“
Curitibanos	<b>-0,238</b>	“
Concórdia	<b>-0,764</b>	“
Caçador	1,376	“
Campos Novos	0,221	“
Rancho Queimado	<b>-0,399</b>	“
Bom Retiro	0,742	“
Lages	0,762	“
Urubici	<b>-1,160</b>	“
São Joaquim	<b>-0,079</b>	“
Lagoa Vermelha	<b>-0,594</b>	“
Passo Fundo	<b>-1,001</b>	“
Bom Jesus	1,122	“
Nova Petrópolis	<b>-0,399</b>	“
Gramado	<b>-1,159</b>	“
Caçapava do Sul (13)	<b>-1,149</b>	-1,779 ~ -1,976

Todos os valores para o D de Tajima são significativos. A hipótese nula (Neutralidade) foi rejeitada em função dos valores de  $P$  não estarem dentro do intervalo de neutralidade. Valores negativos indicam expansão populacional, já as populações e grupos populacionais que apresentam valores positivos podem estar sofrendo declínio populacional.

O Grupo Sul - GS apresenta forte expansão populacional, já os outros dois grupos estão sofrendo declínio populacional em diferentes proporções. Este teste apenas sugere expansão e declínio populacional. Estudos adicionais deve ser efetuados para a comprovação destas hipóteses.

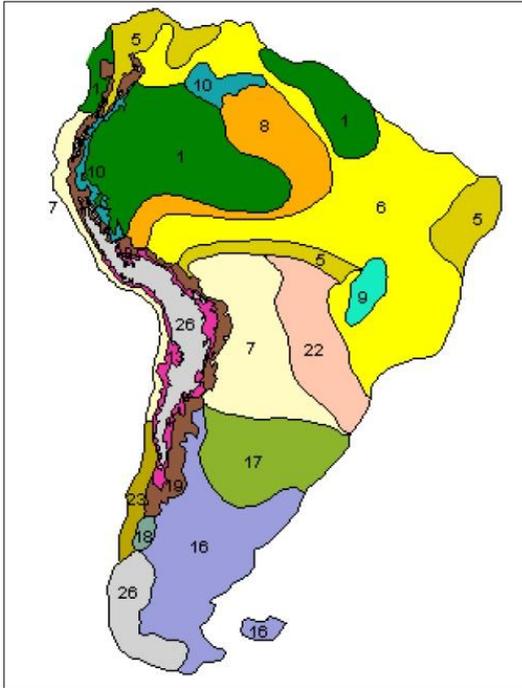
## 6.5. Estrutura filogeográfica

Na análise conjunta dos três grupos populacionais, pode ser observado o padrão filogeográfico I (Avise *et al.* 1987). Este padrão é caracterizado por uma descontinuidade muito acentuada na distribuição geográfica dos haplótipos do GN em relação aos do GC e GS. Os

haplótipos do GN são exclusivos em relação aos do GC e GS. Essa barreira genética pode ter sido causada em função da extinção de genótipos intermediários durante o último máximo glacial (27.500 - 14.500 A.P.), sendo que o fluxo gênico (entre GN e GC) não foi registrado do holoceno mediano até o presente, com os dados deste estudo. Stefenon *et al.*, (2008) sugerem que a diferenciação acentuada das populações de São Paulo em relação às do sul, podem ser devido a uma diferença no período de re-colonização dos planaltos onde a espécie ocorre atualmente.

Restringindo-se a análise somente os grupos do sul, é possível sugerir a existência de um refúgio para cada grupo e expansão destes grupos até a formação de uma “zona de mistura”. Esta zona contém as populações de San Pedro, Dois Vizinhos, Chopinzinho, Pato Branco, Ponte Serrada, Concórdia, Major Vieira e Videira. O valor negativo do “D” de Tajima para o GS sugere que este grupo populacional continua seu avanço sobre a zona de mistura (Tabela 12). No entanto esta hipótese deverá ser comprovada com a realização de amostragens mais direcionadas nesta região. O valor positivo para o “D” de Tajima para GC não significa que este grupo sempre esteve em declínio. Análises estatísticas de expansão/declínio populacional deverão ser realizadas para a comprovação da hipótese da zona de mistura.

A Figura 12 traz uma simulação da vegetação durante o auge do último período glacial (25.000-15.000 A.P.), (Ray e Adams, 2001).

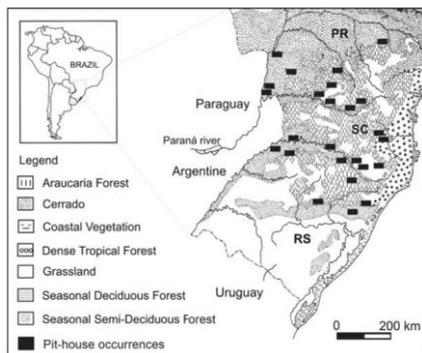


**Figura 12.** Mapa da vegetação Sul-Americana durante o auge do último período glacial (25.000-15.000 A.P.). Legenda: 1- Floresta tropical; 5- Semi-deserto tropical; 6- Pradaria tropical; 7- Deserto tropical extremo; 8- Savana; 9- Floresta temperada latifoliada; 10- Floresta tropical montanhosa; 16- Deserto temperado; 17- Semi deserto temperado; 18- Estepe florestal; 19- Mosaico montanhoso; 22- Estepe seca; 23- Estepe/pradaria temperada; 26- Gelo permanente. Retirado de Ray e Adams (2001).

As regiões que atualmente possuem populações de *Araucaria angustifolia* são as regiões de número 6, 22, 7 e 17 (Figura 12). Destas, a região 6 poderia ter oferecido condições limitadas para a sobrevivência da espécie durante o último máximo glacial, já que nas outras regiões se tornaria impossível a sobrevivência da espécie. Deve-se levar em consideração também que apesar dos ambientes representados pelos números 7, 17 e 22 não serem propícios para o amplo desenvolvimento de formações florestais, eles poderiam conter zonas com condições ambientais favoráveis para o estabelecimento de refúgios para a *Araucaria angustifolia*, como os vales de diversas serras encontradas no sul do Brasil (Behling *et al.*, 2004).

A proximidade das casas subterrâneas indígenas em diversas áreas do sul do Brasil, aliada com o amplo compartilhamento de haplótipos em populações adjacentes nestas respectivas áreas podem sugerir o possível efeito antropogênico na dispersão de *Araucaria angustifolia*. Considerando-se que a dispersão de sementes a longas distâncias não ocorre efetivamente em *A. angustifolia* de forma natural, a ação humana poderia ter amplificado esta dispersão para algumas regiões mais distantes ou auxiliar na transposição de barreiras geográficas.

Analisando a Figura 13, pode ser observada a existência dois agrupamentos de casas subterrâneas, um na divisa dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul e outro no estado do Paraná. Considerando a hipótese da existência passada de um refúgio glacial no GC e outro no GS, podemos sugerir que após o Holoceno mediano e tardio, tenha existido um possível efeito antropogênico de dispersão de haplótipos dentro das respectivas regiões.



**Figura 13.** Distribuição geográfica das “casas subterrâneas” em territórios elevados do sul do Brasil. Retirado de Bitencourt e Krauspenhar (2006).

No entanto, segundo Bitencourt e Krauspenhar (2006), esse possível efeito antropogênico na dispersão da espécie só poderia ter ocorrido entre 2000 e 200 anos A.P., durante o Holoceno tardio, mais de dois mil anos após a rápida expansão da *Araucaria angustifolia* (Behling *et al.*, 2004). Portanto, esse efeito de dispersão culminaria no auge da distribuição da espécie nos tempos atuais, antes da exploração massiva da madeira e da introdução do gado em determinadas áreas.

Sendo assim, esse possível efeito antropogênico pode ter contribuído muito para a miscigenação da espécie, com a introdução de

novos alelos e haplótipos em populações, culminando no aumento no aumento da diversidade genética, expansão e compartilhamento de haplótipos em populações adjacentes em Santa Catarina e no Paraná, como visto nos resultados deste trabalho.

Dentro do GS, um possível refúgio glacial poderia estar localizado dentro do Parque Nacional da Serra Geral, nos municípios de Cambará do Sul (RS), Jacinto Machado (SC) e Praia Grande (SC). A existência de cânions protegidos pode ter servido de refúgio para a espécie durante o último máximo glacial (27.500 - 14.500 A.P.).

Muito próximo a este possível refúgio, estão presentes três populações amostradas neste trabalho (Bom Jesus, Gramado e Nova Petrópolis). Estas populações possuem o haplótipo H9 e três de suas variações (H13, H15 e H16). Para a comprovação da hipótese deste refúgio, existe a necessidade da amostragem de uma população pertencente a este parque. A serra do Rio do Rastro, em Santa Catarina, apresenta os mesmos padrões de Cambará do Sul.

Outro suporte para a hipótese levantada da existência de um refúgio no âmbito da Serra Geral vem da palinologia. Behling *et al.* (2004) encontraram em Cambará do Sul, pólen de *Araucaria angustifolia* datando de 42.840 anos antes do presente. Além disso, Bitencourt e Krauspenhar (2006) identificaram a ocorrência de casas subterrâneas dentro da Serra Geral, em Cambará do Sul. Este fato reforça a hipótese do possível efeito antropogênico de dispersão da espécie, levando haplótipos (H9 e suas variações) do possível refúgio glacial para as demais áreas do GS.

A região de Campos do Jordão pode ter sido um dos possíveis refúgios glaciais dentro do grupo norte. Sua elevada altitude, incomum para as cidades de seu entorno, pode ter propiciado condições de sobrevivência para a espécie. No entanto, neste momento é prematura qualquer inferência sobre o grupo norte, em virtude da rasa amostragem populacional ainda restrita desta região. Outro possível refúgio glacial do GN pode ter sido a Serra da Mantiqueira (SP-MG).

Dentro do GC, um possível refúgio glacial pode ter ocorrido dentro da Serra dos Campos Gerais, acima de Ponta Grossa (PR). Behling também registrou a ocorrência de pólen de *Araucaria angustifolia* durante o último máximo glacial (Behling, 1997) nesta referida região. Próximo a este possível refúgio está a população de Ponta Grossa com os haplótipos H5, H6 e H8. Bitencourt e Krauspenhar (2006) também identificaram a presença de casas subterrâneas indígenas nesta região.

## 7. IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DE *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze

Do ponto de vista conservacionista, é importante considerar que possíveis distúrbios futuros podem vir a eliminar alguns haplótipos de baixa frequência. É importante entender como a variação genética está distribuída na natureza para a eleição de áreas prioritárias para a conservação da espécie e do ecossistema na qual ela está inserida.

Com a introdução em grande escala de dados oriundos do genoma cloroplastidial, obtém-se uma nova fonte de informações genéticas para a espécie, além dos marcadores moleculares nucleares usualmente utilizados, tais como os Microsatélites e as Alozimas (e.g. Auler *et al.*, 2002, Stefenon *et al.*, 2007).

Atenção especial deve ser dada às populações situadas ao norte, especialmente para a região de Barbacena, possuidora de haplótipos exclusivos e em elevado grau de fragmentação florestal. Nesta referida região, remanescentes florestais com a presença de *Araucaria angustifolia* devem ser conservados com a criação de unidades de conservação, pois esta região possui polimorfismos de *cpDNA* não encontrados nas plantas situadas ao sul do Brasil. Na região de Barbacena não existem unidades de conservação que contenham araucária.

A coleta sustentável de sementes para a conservação *in situ on farm* de *Araucaria angustifolia* pode ser direcionada para as regiões possuidoras de maior polimorfismo de *cpDNA* dentro dos três grupos filogeográficos identificados.

No entanto, o baixo número de haplótipos ou a homogeneidade total de uma população em nível de *cpDNA* não significa uma baixa diversidade genética a nível de genoma nuclear. Patreze e Tsai (2010) acessaram a diversidade genética dos dois genomas em uma população de Campos do Jordão, e encontraram um maior polimorfismo quando avaliaram a informação contida em marcadores microsatélites nucleares em relação ao *intron matK*.

De fato, marcadores nucleares polimórficos como as alozimas e os microsatélites possuem uma dinâmica e evolução muito mais rápida que as marcas organelares. No entanto, apesar destes marcadores demandarem de elevado volume de dados e trabalho para o estabelecimento de inferências evolutivas, eles são de extrema importância para o monitoramento da diversidade genética e sua perda, fluxo gênico e análises de parentesco em populações.

## 8. CONCLUSÕES

O espaçador intergênico DT foi o que mais contribuiu sítios polimórficos para a caracterização da estrutura filogeográfica em *Araucaria angustifolia*. No entanto, mais dois marcadores foram integrados à análise em função do baixo número de haplótipos observados na análise de um loco individual.

Os resultados obtidos sugerem que as populações de *Araucaria angustifolia* situadas no Grupo Norte permaneceram isoladas em relação as populações do sul ao final do último período glacial (UGM). Uma barreira genética foi sugerida (Figura 11) para também fundamentar esta hipótese.

O padrão encontrado de divergência genética se encaixa na categoria descontínua I proposta por Avise *et al.* (1987), sendo que a mais provável circunstância evolutiva é a extinção de genótipos intermediários e ou a presença de barreiras impedindo o fluxo gênico entre o grupo norte e os grupos do sul.

Na análise individual dos grupos GC e GS, estes apresentam o padrão filogeográfico descontínuo 2, caracterizado por apresentar zonas secundárias de mistura.

Podemos sugerir, preliminarmente, que ao término do último período glacial (27.500 até 14.500 A.P.) a espécie *Araucaria angustifolia* se expandiu até os limites atuais, com uma maior intensidade a partir de 4.300 anos A.P., a partir de três refúgios glaciais, sendo um refúgio situado em cada grupo populacional. Os locais mais prováveis para o estabelecimento de refúgios são Campos do Jordão e/ou Serra da Mantiqueira para o Grupo Norte, Serra dos Campos Gerais/ PR para o Grupo Central e Serra Geral, Aparados da Serra e/ou Serra do Rio do Rastro para o Grupo Sul. Estes locais apresentam evidências palinológicas da presença de araucária datando antes do início do Último Máximo Glacial. Outra constatação que suporta esta hipótese é a presença dos três grupos populacionais e da zona de mistura entre GS e GC.

Contudo, a identificação exata dos epicentros de dispersão da espécie requer ainda a inclusão de novas populações nas análises filogeográficas, um amplo levantamento e integração de dados oriundos de estudos arqueológicos, botânicos, geográficos e palinológicos, pois provavelmente antes do início do último período glacial, a espécie ocupou áreas com diferentes perfis da atual, contraindo e expandindo em função das constantes variações das condições ambientais.

Para a realização de inferências mais concretas, existe a necessidade de se estudarem as relações filogenéticas intra-específicas nos genomas nuclear (codificante e não codificante) e mitocondrial, em função das diferentes dinâmicas destes genomas. Além do fato da herança ser paterna do cloroplasto (pólen) e materna da mitocôndria (óvulo), (Williams, 2009).

## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para o futuro, existe a necessidade da ampliação desta análise inicialmente para outras populações e, posteriormente para o genoma mitocondrial, pois sua transmissão é exclusivamente materna (Williams, 2009), sendo, portanto, um contraponto à análise do DNA cloroplastidial.

A partir da introdução de um marcador de *mtDNA*, poderá ser estudado o efeito diferencial da dispersão do pólen e das sementes, em função da herança paterna do cloroplasto (via pólen) e materna da mitocôndria (via semente). As gimnospermas apresentam esta vantagem em relação às angiospermas.

Considerando-se que a dispersão de pólen deve ser mais abrangente que a dispersão natural de sementes, espera-se que haplótipos mitocondriais (distribuídos por meio das sementes) apresentem-se agrupados, enquanto haplótipos cloroplastidiais (distribuídos por meio do pólen) tendam a ser distribuídos de forma relativamente mais homogênea. Neste caso, a hipótese será aceita se a diferenciação genética entre populações apresentar diferentes padrões de divergência genética quando acessados por meio do genoma cloroplástico ou mitocondrial.

O genoma nuclear também pode ser integrado na análise filogeográfica, com a análise de regiões codificantes, como alguns genes nucleares portando baixo número de cópias (Sang, 2002) e regiões não codificantes, tais como os marcadores moleculares microssatélites (SSR), do gênero *Araucaria* (Scott *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2007; Salgueiro *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2004). Deve-se atentar para a correta re-amostragem dos indivíduos quando se utilizarem marcadores moleculares situados em locos diplóides (Pons e Chaouche, 1995).

Estas necessidades se dão em virtude das diferentes dinâmicas destes genomas, como as diferentes taxas de mutação, evolução, pressões de seleção distintas e a presença de recombinações e rearranjos no genoma nuclear.

Adicionalmente, com a análise de um gene nuclear codificante, poderá ser possível caracterizar sinais de adaptação seletiva em função das diferenças entre ambientes de ocorrência de *Araucaria angustifolia*, principalmente do gradiente norte-sul e leste-oeste acentuado.

Para a realização de inferências mais concretas, existe a necessidade da ampliação da amostragem populacional para as populações situadas no grupo norte (GN). Os municípios de Taboão da Serra (SP), Itapeçerica da Serra (SP), São Carlos (SP), Camanducaia (MG), e Poços de Caldas (MG) possuem fragmentos florestais contendo *Araucaria angustifolia* (Mattos, 2012). Caso estas populações sejam integradas à análise filogeográfica, o Grupo Norte (GN) será mais saturado, com a possibilidade de serem encontrados, haplótipos comuns aos dos grupos GC e GS, quebrando assim a possível barreira genética identificada neste trabalho. Caso o padrão haplotípico do Grupo Norte se mantenha o mesmo, estes novos dados irão corroborar a barreira genética encontrada e a categoria descontínua tipo I.

Futuramente, a comparação do estado filogeográfico de *Araucaria angustifolia*, com o padrão de outras espécies associadas e pertencentes à Floresta Ombrófila Mista (FOM), como a *Acca sellowiana* e *Dicksonia sellowiana*, podem revelar padrões interessantes entre estas espécies filogeneticamente distantes.

## REFERÊNCIAS

- AGAPITO-TENFEN, S.; STEINER, N.; GUERRA, M. e NODARI, R. 2012. Patterns of polyembryony and frequency of surviving multiple embryos of the Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze). **Australian Journal of Botany** **59(8)**, 749-755.
- ALDRIDGE, C.; MAPLE, J. e MOLLER, S.G. 2005. The molecular biology of plastid division in higher plants. **J. Exp. Bot.** **56**:1061-1077.
- AULER, N.M.F.; REIS, M.S.; GUERRA, M.P. e NODARI, R.O. 2002. The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: I. Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptive variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology** **25**: 329-338.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A. e SAUNDERS, N.C. 1987. INTRASPECIFIC PHYLOGEOGRAPHY: The Mitochondrial DNA Bridge Population Genetics and Systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** **18**: 489-522.
- AVISE, J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, New York, 512 p.
- AVISE, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. **Molecular Ecology** **7**: 371-379.
- AVISE, J.C. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA, 447 p.
- AVISE, J.C. 2006. Evolutionary Pathways in Nature: A Phylogenetic Approach. Cambridge University Press, Cambridge MA, 286 p.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P. e RÖHL, A. 1999. Median-Joining Networks for Inferring intraspecific Phylogenies. **Molecular Biology Evolution** **16**: 37-48.
- BEHEREGARAY, L.B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology** **17**: 3754-3774.
- 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 Paleobotany and Palynology** **97**: 109-121.
- BEHLING, H.; PILLAR, D.V.; ORLÓCI, L. e BAUERMANN. 2004. Late Quaternary *Araucaria* forest, grassland (Campos), fire and climate dynamics, studied by high-resolution pollen, charcoal and

- multivariate analysis of the Cambará do Sul core in southern Brazil. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology** **203**: 277-279.
- BITENCOURT, A.L.V. e KRAUSPENHAR, P. 2006. Possible prehistoric anthropogenic effect on *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze expansion during the late holocene. **Revista Brasileira de Paleontologia** **9**: 109-116.
- BITENCOURT, J.V.M. e SEBBENN, A.M. 2007. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity** **99**:580-591.
- BOCK, R. 2006. Extranuclear inheritance: Gene transfer out of plastids. **Progress in Botany** **67**:75-100.
- BOCK, R. 2007. Structure, function, and inheritance of plastid genomes. In: **Cell and Molecular Biology of Plastids**, R. Bock, ed. (Göteborg: Göteborg University), pp. 29-64.
- CARVALHO, P.E.R. 1994. Espécies florestais brasileiras. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. **EMBRAPA**, Colombo, 639 pp.
- CHIANG, T.Y.; SCHAAL, B.A. e PENG, C.I. 1998. Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between the *atpB* and *rbcL* genes of chloroplast DNA. **Bot. Bull. Acad. Sin.** **39**: 245-250.
- CHUMLEY, T.W.; PALMER, J.D. e MOWER, J.P. 2006. The complete chloroplast genome sequence of *Pelargonium x hortorum*: organization and evolution of the largest and most highly rearranged chloroplast genome of land plants. **Mol. Biol. Evol.** **23**:2175-2190.
- CRONN, R.; LISTON, A. e PARKS, M. 2008. Multiplex sequencing of plant chloroplast genomes using Solexa sequencing-by-synthesis technology. **Nucleic Acids Res.** **36**: 122.
- DEMASURE, B.; SODZNI, N. e PETIT, R.J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. **Molecular Ecology** **4**:129-131.
- DONG, J. e WAGNER, D.B. 1994. Paternally Inherited Chloroplast Polymorphism in *Pinus*: Estimation of Diversity and Population Subdivision, and Tests of Disequilibrium With a Maternally Inherited Mitochondrial Polymorphism. **Genetics** **136**:1187-1194.

- DOYLE, J.J. e DOYLE, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus 12**: 13 -15.
- DUARTE, L.S. e DILLENBURG, L.R. 2000. Ecophysiological responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seedlings to different irradiance levels. **Australian Journal of Botany 48**: 531-537.
- DUARTE, L.S.; DOS SANTOS, M.M.G. e HARTZ, S.M. 2006. Role of nurse plants on Araucaria Forest expansion over grassland in south Brazil. **Austral Ecology 31**: 520-528.
- DUMOLIN-LAPÈGUE, S.; PEMONGE, M.H. e PETIT, R.J. 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. **Molecular Ecology 6**: 393-7.
- DYALL, S.D.; BROWN, M.T. e JOHNSON, P.J. 1994. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. **Science 304**:253-257.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE P.E. e QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics 131**: 479-4 91.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G. e SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis, **Evolutionary Bioinformatics Online 1**: 47-50.
- FARJON, A. 2006. *Araucaria angustifolia*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em 15 de março de 2011.
- FLORIN, R. 1963. The distribution of conifer and taxad genera in time and space. Pinaceae. **Acta Horti Bergiani 20**:240-258.
- FRANCO, A.M.S. e DILLENBURG, L.R. 2007. Ajuste morfológico e fisiológico em plantas jovens de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em resposta ao sombreamento. **Hoehnea 34**: 135-144.
- GILLAM, N.W. 1994. Organelle Genes and Genomes. Oxford University Press, New York, 424 p.
- GOREMYKIN, V.V.; SALAMINI, F. e VELASCO, R. 2009. Mitochondrial DNA of *Vitis vinifera* and the issue of rampant horizontal gene transfer. **Mol. Biol. Evol.** **26**:99-110.
- GUERRA, M.P.; SILVEIRA, V.; SANTOS, A.L.W.; ASTARITA, L.V. e NODARI, R.O. 2000. Somatic Embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze.. In: Jain, S.M., Gupta, P.K., Newton, R.J.. (Org.). **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 457-478.

- GUERRA, M.P.; SILVEIRA, V.; REIS, M.S. e SCHNEIDER, L. 2002. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). in: **Sustentável mata atlântica: a exploração de seus recursos florestais** (Simões, L.L. & Lino, C.F., eds.), São Paulo: Editora SENAC, p. 85-101.
- GUERRA, M. P.; STEINER, N. e MANTOVANI, A. 2008. Evolução, ontogênese e diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. In: Barbieri, R.L.; Stumpf, E.R.T. (Org.). **Origem e Evolução de Plantas Cultivadas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 149-184.
- HIRAO, T.; WATANABE, A. e KURITA, M. (2008). Complete nucleotide sequence of the *Cryptomeria japonica* D. Don. chloroplast genome and comparative chloroplast genomics: diversified genomic structure of coniferous species. **BMC Plant Biol.** **8**:70.
- HONG, Y.P.; HIPKINS, V.D.; STRAUSS, S.H. 1993. Chloroplast DNA Diversity Among Trees, Populations and Species in the California Closed-Cone Pines (*Pinus radiata*, *Pinus muricata* and *Pinus attenuate*). **Genetics** **135**:1187-1196.
- HUANG, C.Y.; AYLIFFE, M.A. e TIMMIS, J.N. 2003. Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. **Nature** **422**:72-76.
- HUANG, C.Y.; GRUNHEIT, N. e AHMADINEJAD, N. 2005. Mutational decay and age of chloroplast and mitochondrial genomes transferred recently to angiosperm nuclear chromosomes. **Plant Physiology** **138**:1723-1733.
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1993. Mapas da Vegetação do Brasil. Disponível em <[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)> . Acesso em 14/02/2012.
- IUCN. 2010. IUCN Red List of Threatened Species. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em 15 de março de 2011.
- INNIS, M.A.; WHITE, T.; GELFAND, D.H. e SNINSK, J. 1990. PCR Protocols: *A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc. New York, 482 p.
- JANSEN, R.K.; KAITTANIS, C. e SASKI, C. 2006. Phylogenetic analysis of *Vitis* (Vitaceae) based on complete chloroplast genome sequences: effects of taxon sampling and phylogenetic methods on resolving relationships among rosids. **BMC Evol Biol.** **6**:32.

- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F. e DONOGHUE, M.J. 2009. **Sistemática vegetal, um enfoque filogenético**. 3.Ed. Porto Alegre: Artmed, 612p.
- KINGMAN, J.F.C. 1982. The Coalescent. **Stochastic Processes and their Applications** **13**: 235-248.
- KONDO, T.; TSUMURA, Y. e KAWAHARA, T. 1998. Paternal inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in interspecific hybrids of *Chamaecyparis* spp. **Breed. Sci.** **48**:177-179.
- KLEIN, R.M. 1960. Aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Sellowia** **12**:17-44.
- LIBRADO, P. e ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** **25**: 1451-1452.
- LIDHOLM, J.; SZMIDT, A.E. e HALLGREN, J.E. 1988. The chloroplast genomes of conifers lack one of the rRNA-encoding inverted repeats. **Mol. Gen. Genet.** **212**:6-10.
- LIDHOLM, J. e GUSTAVSSON, P. 1991. The chloroplast genome of the gymnosperm *Pinus contorta*: a physical map and a complete collection of overlapping clones. **Curr. Genet.** **20**:161-166.
- LIN, C.P.; HUANG, J.P.; WU, C.S.; HSU, C.Y. e CHAW, S.M. 2010. Comparative chloroplast genomics reveals the evolution of Pinaceae genera and subfamilies. **Genome Biol. Evol.** **2**:504-517.
- MACPHAIL, M.; HILL, K.; PARTRIDGE, A.; TRUEWELL, E. e FOSTER, C. 1995. “Wollemi Pine” — Old Pollen Records for a Newly Discovered Genus of Gymnosperm. **Geology Today** **11**:48-50.
- MANTOVANI, A.; MORELLATO, A.P.C. e REIS, M.S. 2004. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica** **27**: 787-796.
- MANTOVANI, A.; MORELLATO, A.P.C. e REIS, M.S. 2006. Internal genetic structure and outcrossing rate in a natural population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Journal of Heredity** **97**: 466-472.
- MARCHELLI, P.; BAIER, C.; MENGEL, C.; ZIEGENHAGEN, B. e GALLO, L.A. 2010. Biogeographic history of the threatened species *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch and implications for conservation: a case study with organelle DNA markers. **Conserv Genetics** **11**: 951-963.

- MATTOS, J.R. de. 2012. O Pinheiro Brasileiro. Editora da UFSC, Florianópolis. 698 p.
- MEAGHER, T.R. 2010. A fragmented future for the forest flora. **Heredity** **105**: 163-164.
- MILLER, C. N. 1977. Mesozoic conifers. **Botanical Review** **43**: 217–280.
- MILLER, C.N. 1988. The origin of modern conifer families. In: C. B. Beck ed. **Origin and evolution of gymnosperms**, 448–486. Columbia, University Press, New York, NY.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. INSTRUÇÃO NORMATIVA N°6, DE 23 DE SETEMBRO DE 2008.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; da FONSECA, G.A.B. e KENT, K. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** **403**: 853-858.
- NEALE, D.B.; MARSHALL, K.A. e SEDEROFF, R.R. 1989. Chloroplast and mitochondrial DNA are paternally inherited in *Sequoia sempervirens* D.Don Endl. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**:9347-9349.
- NEALE, D.B. e SEDEROFF, R.R. 1989. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. **Theor. Appl. Genet.** **77**:212-216.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** **70**: 3321-3323.
- OHYAMA, K.; FUKUZAWA, H. e KOHCHI, T. 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. **Nature** **322**:572-574.
- PALMER, J.D. 1985. Comparative organisation of chloroplast genomes. **Annual Review of Genetics** **19**: 325-354.
- PALMER, J.D. e STEIN, D.B. 1986. Conservation of chloroplast genome structure among vascular plants. **Curr. Genet.** **10**:823-833.
- PATREZE, C.M. 2008. Análise molecular da diversidade genética em uma população natural de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no Estado de São Paulo. **Tese de Doutorado**, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, 127 p.
- PATREZE, C.M. e TSAI, S.M. 2010 Intrapopulational genetic diversity of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is different when

- assessed on the basis of chloroplast or nuclear markers. **Plant Systematics and Evolution** **284**:111-122.
- PETIT, R.J.; DEMESURE, B. e LAPÈGUE, D.S. 1996. CpDNA and plant mtDNA primers. *In* Molecular tools for screening biodiversity: Plants and Animals. A Karp, PG Isaac, D Ingram eds, Chapman & Hall, 528 pp.
- PINHEIRO, C.C. e GANADE, G. 2009. Influência do microhabitat no processo de predação de sementes em uma área degradada. **Neotropical Biology and Conservation** **4**:20-27.
- PONS, O. e PETIT, R.J. 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity I. Haploid loco. **Theoretical and applied genetics** **90**: 462-470.
- PONS, O. e CHAUCHE, K. 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity II. Diploid loco. **Theoretical and applied genetics** **91**: 122-130.
- RAY, N. e ADAMS, J.M. 2001. A GIS-based Vegetation Map of the World at the Last Glacial Maximum (25,000-15,000 BP). **Internet Archaeology** **11**: 1-44.
- REITZ, R. e KLEIN, R.M. 1966. Araucariáceas. **Flora Ilustrada Catarinense**. 62 pp.
- REITZ, R.; KLEIN, R.M. e REIS, A. 1978. Projeto Madeira de Santa Catarina. **Sellowia** **28**:1-320.
- RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J. e HIROTA, M.M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation** **142**: 1141-1153.
- ROBERTSON, A.; HOLLINGSWORTH, P.M.; KETTLE, J.; ENNOS, R.A. e GARDNER, M.F. 2004. Characterization of nuclear microsatellites in New Caledonian *Araucaria* species. **Molecular Ecology Notes** **4**: 62-63.
- SALGUEIRO, F.; CARON, H.; DE SOUZA, M.I.F.; KREMER, A. e MARGIS, R. 2005 Characterization of nuclear microsatellite *locos* in South American Araucariaceae species. **Molecular Ecology Notes** **5**: 256-258.
- SAMBROOK, J. e RUSSEL, D. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque, 1448 p.

- SANG, T. 2002. Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology** **37**: 121-147.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. e COULSON R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **74**: 5463-5467.
- SANT'ANNA, C.S., 2011. Diversidade genética, estrutura genética espacial e dispersão realizada de pólen e sementes em uma população contínua de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no planalto norte de Santa Catarina. **Dissertação de Mestrado**, PPG em Recursos Genéticos Vegetais, UFSC. 89 p.
- SCOTT, L. J.; SHEPHERD, M. e HENRY, R. J. 2003. Characterization of highly conserved microsatellite *locos* in *Araucaria cunninghamii* and related species. **Plant Systematics and Evolution** **236**: 115-123.
- SCHLÖGL, P. S.; SOUZA, P. A. e NODARI, R. O. 1997. PCR-RFLP analysis of non-coding regions of *cpDNA* in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Genetics and Molecular Biology** **30**: 423-427.
- SCHMIDT, A.B.; CIAMPI, A.Y.; GUERRA, M.P. e NODARI, R.N. 2007. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Molecular Ecology Notes** **7**: 340-342.
- SEIDO, K.; MAEDA, H. e SHIRAISHI, S. 2000. Determination of the selfing rate in a Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) seed orchard by using a chloroplast PCR-SSCP marker. **Silvae Genetica** **49**:165-168.
- SETOGUCHI, H.; OSAWA, T.A.; PINTAUD, J.-C.; JAFFRÉ, T. e VEILLON, J.-M. 1998. Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on *RBCL* gene sequences. **American Journal of Botany** **85(11)**: 1507-1516.
- SHINOZAKI, K.; OHME, M. e TANAKA, M. 1986. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. **EMBO J.** **5**:2043-2049.
- SOUSA, V.A.; ROBINSON, L.P. e HATTEMER, H.H. 2004. Variation and population structure at enzyme gene loci in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kte. **Silvae Genetica** **53**:12-19.

- STEFANOVIC, S.A.; JAGER, M. e DEUTSCH, J. 1998. Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequences. **American Journal of Botany** **85**: 688-697.
- STEFENON, V.M.; NODARI, R.O. e REIS, M.S. 2003. Padronização de protocolo AFLP e sua capacidade informativa para análise da diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. **Scientia Forestalis** **64**: 163-171.
- STEFENON, V. M.; GAILING, O. e FINKELDEY, R. 2007. Genetic structure of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) populations in Brazil: implications for in situ conservation of genetic resources. **Plant Biology** **9**:516–525.
- STEFENON, V. M.; GAILING, O. e FINKELDEY, R. 2008a. Genetic structure of plantations and the conservation of genetic resources of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*). **Forest Ecology and Management** **255**:2718–2725.
- STEFENON, V. M.; BEHLING, H. GAILING, O. e FINKELDEY, R. 2008b. Evidences of delayed size recovery in *Araucaria angustifolia* populations after post-glacial colonization of highlands in Southeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** **80**:433–444.
- STEGEMANN, S. e BOCK, R. 2006. Experimental reconstruction of functional gene transfer from the tobacco plastid genome to the nucleus. **Plant Cell** **18**:2869-2878.
- STEGEMANN, S.; HARTMANN, S. e RUF, S. 2003. High-frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **100**:8828-8833.
- STOCKEY, R.A. 1982. The Araucariaceae: an evolutionary perspective. **Review of Palaeobotany and Palynology** **37**: 133–154.
- STRAUSS, S.H.; PALMER, J.D. e HOWE, G.T. 1988. Chloroplast genomes of two conifers lack a large inverted repeat and are extensively rearranged. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85**:3898-3902.
- SUGIURA, M. 1989. The chloroplast chromosomes in land plants. **Annu. Rev. Cell. Biol.** **5**:51-70.
- SZMIDT, A.E.; ALDEN, T. e HALLGREN, J.E. 1987. Paternal inheritance of chloroplast DNA in *Larix*. **Plant Mol. Biol.** **9**:59-64.
- TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G. e BOUVET, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology** **17**: 1105-1109.

- TAJIMA, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. **Genetics** **105**: 437-460.
- TAJIMA, F. 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics** **123**: 585-595.
- TSUDZUKI, J.; NAKASHIMA, K. e TSUDZUKI, T. 1992. Chloroplast DNA of black pine retains a residual inverted repeat lacking rRNA genes: nucleotide sequences of trnQ, trnK, psbA, trnI and trnH and the absence of rps16. **Mol. Gen. Genet.** **232**:206-214.
- TSUMURA, Y.; OGIHARA, Y. e SASAKUMA, T. 1993. Physical map of chloroplast DNA in sugi, *Cryptomeria japonica*. **Theor. Appl. Genet.** **86**:166-172.
- TSUMURA, Y.; SUYAMA, Y.; TAGUCHI, H. e OHBA, K. 1994. Geographical cline of chloroplast DNA variation in *Abies mariesii*. **Theor. Appl. Genet.** **89**:922-926.
- VELOSO, H.P. e GOES-FILHO, L. 1982. Fitogeografia Brasileira - Classificação Fisionômico-Ecológica da Vegetação Neotropical. **Projeto RADAM Brasil**, Brasília, Boletim Técnico, **Série Vegetação** **1**:3-79.
- VELOSO, H.P.; RANGEL-FILHO, A.L.R.R. e LIMA, J.C.A. 1991. Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. **IBGE**, Rio de Janeiro.
- WAGNER, D.B.; FURNIER, G.R. e SAGHAI-MAROOF, M.A. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**:2097-2100.
- WAKASUGI, T.; HIROSE, T., e HORIHATA, M. 1996. Creation of a novel protein-coding region at the RNA level in black pine chloroplasts: The pattern of RNA editing in the gymnosperm chloroplast is different from that in angiosperms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **93**:8766-8770.
- WAKASUGI, T.; SUDZUKI, J., e ITO, S. 1994. Loss of all ndh genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **91**:9794-9798.
- WATTERSON, G.A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. **Theoretical Population Biology** **7**: 256-276.
- WHITE, E.E. 1990. Chloroplast DNA in *Pinus monticola*. 1. Physical map. **Theor. Appl. Genet.** **79**:119-124.
- WILLIAMS, C. 2009. Conifer Reproductive Biology. **Springer**, London & New York, 171 p.

- WU, C.S.; WANG, Y.N. e LIU, S.M. 2007. Chloroplast Genome (cpDNA) of *Cycas taitungensis* and 56 cp Protein-Coding Genes of *Gnetum parvifolium*: Insights into cp DNA Evolution and Phylogeny of Extant Seed Plants. **Mol. Biol. Evol.** **24**:1366-1379.
- YUKAWA, M.; TSUDZUKI, T. e SUGIURA, M. 2005. The 2005 Version of the Chloroplast DNA Sequence from Tobacco (*Nicotiana tabacum*). **Plant Mol. Biol. Rep.** **23**:359–365.

## APÊNDICE 1

### Sequência parcial do espaçador intergênico *trnD-trnT* (514 pb), *Araucaria angustifolia*, haplótipo 1.

5´  
GGATCAACAAAACATTTGATCTCTCACTTTCCTCTCTTCTGAAGTAACTG 50  
TTTGGTCTATTCTATATATTTCTAATACATCTATATCTAGATGTAGATAG 100  
ATATAGATATATCGGGGGTTCATAACTAATTACTTTTTCCACCAATGTCA 150  
GAAATTGACATAAAAAATTACCGATGGATCATGTTTATATTGGGTCGAGCT 200  
GGAAATTGAACCAGCGTCGGCATATTGCCAACGGATTTACAATCCGCCCCC 250  
ATGAGCCACTCGGGCATCGACCCAGGAACAAGAAATGGAAAGTCTTTAGC 300  
ATACCCAATGCGTATCCTAAAGACTTTCATAGCATAATACCCTAGGGGA 350  
AGTCGAATCCCGTTGCCTCCTTGAAAGAGAGATGTCCTGGGCCACTAGA 400  
CGATAGGGGCCCGCCTATCATCATTCTATTCAAATCCCTATGAAATTGTC 450  
AACAGTATGAACAAAATTCCACTAATCTTCTCTAGGTTAGTAGTTTAATA 500  
TTTTTATTATTGTA 3´

Os sítios variáveis estão destacados em cinza. Ver Tabela 8 para a variação e distribuição dos demais haplótipos.

## APÊNDICE 2

### Sequência parcial do espaçador intergênico *psbC-trnS* (1.120 pb), *Araucaria angustifolia*, haplótipo 1.

5´	
ATCTAGATAGCCAAGTATAGCTGAGCCACAAGGAAGGATT	50
GGTAATAGCGAAAAGATCCCGCTATCCTGCCTGCCACCATGGGAAACGGAA	100
TTCAATTTTTAATTTTCATCCAGTTTTCTCTGTTGTTTAATTAAGAGGAGT	150
CATGGAAAGGACAGGTTCAAAATCACGATCAATTCCCTTTCTCAAATCCTG	200
CTGCAGCTGCACGAGCCCTTCTGCATGCCACAAATGACCTACGAAGAAG	250
AAAAATCCTAGAACAAAATGAGAGGTGGATAAACCAACTTCGGGGGGATAC	300
AAAATTCACCGCATTAAATCTCGGTAGCTACACCACCCACGGAGTTTAAAG	350
AACCTAAAGGAGCATGAGTACTATATTCGCGGAACGTCGTTCTTGCCAA	400
GGCTGTATGTCCTTTTTCAGCCTTACTCAGGTCTAAAACCATAGGACCC	450
CCTAATGGTTCTAACCCAGGGGGCACGGAGATCCCAAAACGCATTGTTTC	500
CCCTCCAAAGATGATTTCTCCAGTAGGAGAACGCATAGATATTTACCTAA	550
ACAAGTTAGGCCCTTGGGCAGACCCAAAACCTAGCTCCAAAGACGTTGAAT	600
CCTCTAACTAGAAACAGTAATGGCTGGAGCTTGAAGAAGGCCTCCTGGGG	650
GCCCGGGAAAGGCCCAATAAGATTCACCAAGGGAAAAAGCGGATTTGGG	700
TCTTAACTTAATAGGACAAAGTAAGCTTCTCCCGGACCATACAACGCGCG	750
GACGAGCCCCAATGCAAAGGGTTTTGCTTAAGATGTGCCAGATACCAC	800
CGAAGATACAAATGGGAACCTTAACCATAACATGTTCTCCAAATTATAT	850
CTTCTAGATTGTCTACGCTAACGATCCATCCCTCTCCTCCAAAGGGGAC	900
TTAAGTAAATAACCAAATATAAACACTGGGTTAAGAGTTAAGTTCGTAAT	950
TTTTCTTACATCTGCCACCGCCGGGAGCCCAAGTATCATATACACGCCCA	1000
AAATACAAAGCCTTGAGCACTAGAAGAAAAGCACCAACACCTAGCAAGAT	1050
TAGATGAATACCCAAAATTGTGGTCATTTTGTTCCTATCTTTCCATACAT	1100
AACCAAAAATGGAAAAGAT	3´

Os sítios variáveis estão destacados em cinza. Ver Tabela 8 para a variação e distribuição dos demais haplótipos.

### APÊNDICE 3

#### Sequência parcial do espaçador intergênico *trnS-trnfM* (874 pb), *Araucaria angustifolia*, haplótipo 1.

5´

GTTACGGTCAAACCCATAACTATTCCTGGCTCTCTCCATCCTTCGGATG	50
GGCGGGTAGCGGGGATCGAACCCGCATCTTCTCCCTGGCAAAGAGAAATT	100
TTACCATFCAACCATACCCGCATTTGGCTCGTTCTTGGCATAATATATAT	150
ATATATATCTTATGCCATATATTTGTATGCAGATATATTTTATGAAATAA	200
CGAAATTTTCATGATTTTCCTCATTGAAATAACCCCTCCCTGAGCACTTT	250
CATTTGGTTTCTTGGGACTTGTTCGAAAGACCCTTCCGAGCTATAATCCC	300
CTTCGGGGAGGGGGGAGAGAATTTACCAAAGATTCTAGACATATTAAGA	350
TATGAAAGAATTAAGGATACCTACTAAAAGACTAAATCCAATCCATAAGTG	400
AGTACACCCGAAATAAACATTTTTGCTACTTGACCAACCATTAGGAGAGG	450
CAAGTGCACAGGTACACCAATCAC TAGGAGAAATGAAATGCAATTAAT	500
GCAAATACAGACGATTGGAAAGCAATAGTCATGTTGTGATCTTAAAAGC	550
TTCCAACAGATTCAATAGACTATACCATCTGATCCCTATCCGGTCAATTT	600
ATAATCCATTGCACTCGGATTTGATTTGATCATAAATTCATCTAGTTTAA	650
AACTCTTTTTTTTTTCTATCCAATTTCTATTTGAGTGGGAGAGAAGAGG	700
GAAAGAGATTCATTTATTTTTCCCATACATAATGAAAATTTATTACAACA	750
TGTATATCTATGCATATGTAAGCATAGATATGTACCTATGTTTATGTGAT	800
TGATCTGCATCTATGTGCATATCATATGCATGCCTATGATCTATGCATC	850
TAGGCTCATTATGAGCCCGATGG	3´

Os sítios variáveis estão destacados em cinza. Ver Tabela 8 para a variação e distribuição dos demais haplótipos.

## APÊNDICE 4

**Populações e valores de *Fst* (par a par) para todos os possíveis pares de populações.**

List of labels for population samples used below:

Label	Population name
1:	Barbacena
2:	Campos do Jordao
3:	Faxinal
4:	Manoel Ribas
5:	Imbaú
6:	Palmital
7:	Ponta Grossa
8:	Turvo
9:	Laranjeiras do Sul
10:	Irati
11:	Curitiba
12:	Dois Vizinhos
13:	Chopinzinho
14:	Pato Branco
15:	Missiones
16:	Major Vieira
17:	Ponte Serrada
18:	Videira
19:	Catanduvas
20:	Curitibanos
21:	Concórdia
22:	Caçador
23:	Campos Novos
24:	Rancho Queimado
25:	Bom Retiro
26:	Lages
27:	Urubici
28:	Lagoa Vermelha
29:	Passo Fundo
30:	Bom Jesus
31:	Gramado
32:	Nova Petrópolis
33:	Caçapava do Sul
34:	Serra

\*Serra, leia-se São Joaquim

-----  
 Population pairwise FSTs  
 -----

Computing conventional F-Statistics from haplotype frequencies

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.00000											
2	0.31047	0.00000										
3	0.36190	0.33333	0.00000									
4	0.38095	0.35238	-0.02041	0.00000								
5	0.46667	0.43810	0.03175	0.02747	0.00000							
6	0.36667	0.33810	0.11946	0.21202	0.25918	0.00000						
7	0.47619	0.44762	0.12536	0.05844	0.30000	0.38995	0.00000					
8	0.63810	0.60952	0.34650	0.36793	0.19328	0.40085	0.65934	0.00000				
9	0.36667	0.33810	0.11946	0.21202	0.25918	-0.07143	0.38995	0.40085	0.00000			
10	0.57619	0.54762	0.23137	0.20480	0.45000	0.50704	-0.00446	0.79181	0.50704	0.00000		
11	0.40476	0.37619	0.07280	0.17437	0.32738	0.16040	0.18542	0.60900	0.16040	0.23469	0.00000	
12	0.42381	0.39524	0.17920	0.15484	0.13492	0.15584	0.41806	0.16793	0.15584	0.57341	0.39484	0.00000
13	0.43810	0.40952	0.22518	0.24939	0.21675	0.26448	0.46685	0.33628	0.26448	0.59019	0.41244	0.19468
14	0.38095	0.35238	0.21875	0.27505	0.31660	0.19061	0.42725	0.48014	0.19061	0.53309	0.29821	0.28005
15	0.36667	0.33810	0.25983	0.28054	0.33516	0.27551	0.41781	0.50234	0.27551	0.52703	0.35328	0.26692
16	0.38095	0.35238	0.18033	0.28571	0.39796	0.11877	0.35268	0.60952	0.11877	0.42817	0.05164	0.39524
17	0.40476	0.37619	0.33953	0.35910	0.43688	0.34740	0.46669	0.60900	0.34740	0.56952	0.39732	0.37457
18	0.40476	0.37619	0.33953	0.35616	0.44968	0.36190	0.44426	0.63333	0.36190	0.54515	0.38073	0.41905
19	0.44762	0.41905	0.40000	0.41905	0.50476	0.40476	0.51429	0.67619	0.40476	0.61429	0.44286	0.46190
20	0.42381	0.39524	0.37619	0.39524	0.48095	0.38095	0.49048	0.65238	0.38095	0.59048	0.41905	0.43810
21	0.44762	0.41905	0.38356	0.40039	0.49351	0.40476	0.48932	0.67619	0.40476	0.59063	0.42497	0.46190
22	0.44762	0.41905	0.40000	0.41905	0.50476	0.40476	0.51429	0.67619	0.40476	0.61429	0.44286	0.44716
23	0.40952	0.38095	0.36190	0.38095	0.46667	0.36667	0.47619	0.63810	0.36667	0.57619	0.40476	0.42381
24	0.58095	0.55238	0.53333	0.55238	0.63810	0.53810	0.64762	0.80952	0.53810	0.74762	0.57619	0.59161
25	0.49524	0.46667	0.44762	0.46667	0.55238	0.45238	0.56190	0.72381	0.45238	0.66190	0.49048	0.50952
26	0.38095	0.35238	0.33333	0.35238	0.43810	0.33810	0.44762	0.60952	0.33810	0.54762	0.37619	0.37867
27	0.63810	0.60952	0.59048	0.60952	0.69524	0.59524	0.70476	0.86667	0.59524	0.80476	0.63333	0.65238
28	0.48095	0.45238	0.43333	0.45238	0.53810	0.43810	0.54762	0.70952	0.43810	0.64762	0.47619	0.49298
29	0.52381	0.49524	0.47619	0.49524	0.58095	0.48095	0.59048	0.75238	0.48095	0.69048	0.51905	0.53395
30	0.42381	0.39524	0.37619	0.39524	0.48095	0.38095	0.49048	0.65238	0.38095	0.59048	0.41905	0.43810
31	0.44762	0.41905	0.40000	0.41905	0.50476	0.40476	0.51429	0.67619	0.40476	0.61429	0.44286	0.46190
32	0.43810	0.40952	0.39048	0.40952	0.49524	0.39524	0.50476	0.66667	0.39524	0.60476	0.43333	0.45238
33	0.40371	0.37411	0.35444	0.37411	0.46324	0.35935	0.47320	0.64457	0.35935	0.57861	0.39877	0.41855
34	0.30000	0.27143	0.25238	0.27143	0.35714	0.25714	0.36667	0.52857	0.25714	0.46667	0.29524	0.29870

	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													
11													
12													
13	0.00000												
14	0.03024	0.00000											
15	0.32303	0.30080	0.00000										
16	0.32560	0.13779	0.33810	0.00000									
17	0.24107	0.14935	0.13511	0.28753	0.00000								
18	0.27557	0.16948	0.36190	0.27651	0.23295	0.00000							
19	0.27249	0.14566	0.35300	0.30839	0.22619	0.22619	0.00000						
20	0.23942	0.11064	0.33673	0.28005	0.19312	0.15668	-0.06203	0.00000					
21	0.23963	0.09852	0.37123	0.28179	0.19124	0.18599	-0.04247	-0.05280	0.00000				
22	0.27249	0.14566	0.24334	0.30839	-0.04464	0.22619	0.19643	0.15923	0.14286	0.00000			
23	0.30913	0.21308	0.36667	0.30704	0.26815	-0.05456	0.27318	0.20465	0.24675	0.27318	0.00000		
24	0.34435	0.16765	0.50273	0.41784	0.20536	0.28838	0.20635	0.15675	0.09774	0.10714	0.35860	0.00000	
25	0.27606	0.12409	0.42153	0.33702	0.22539	0.22539	-0.02941	-0.04111	-0.06061	0.16667	0.28571	0.08537	0.00000
26	0.24513	0.13779	0.12907	0.26033	-0.04744	0.20252	0.12857	0.10479	0.11079	-0.03741	0.23888	0.17447	0.14286
27	0.40945	0.22250	0.58977	0.48014	0.35039	0.35039	0.21659	0.16793	0.10053	0.26407	0.42249	0.00332	0.07249
28	0.25434	0.10063	0.39217	0.31926	0.16413	0.20367	-0.00198	-0.02317	-0.05062	0.09821	0.26550	0.02232	-0.05978
29	0.28571	0.11960	0.44122	0.35835	0.14792	0.23252	0.15751	0.11172	0.06122	0.06122	0.29511	-0.05495	0.05530
30	0.23942	0.11064	0.37819	0.28005	0.19312	0.19312	0.15923	0.12202	0.10317	0.15923	0.24185	0.15675	0.12415
31	0.23963	0.09852	0.39399	0.29344	0.19124	0.19124	0.14286	0.10317	0.07429	0.14286	0.24675	0.09774	0.08696
32	0.22581	0.08374	0.38707	0.28185	0.17742	0.17742	0.12698	0.08730	0.05714	0.12698	0.23377	0.07519	0.06832
33	0.30913	0.21289	0.33556	0.30270	0.26723	0.26723	0.27571	0.24380	0.25063	0.27571	0.29524	0.37176	0.29236
34	0.23314	0.15063	0.05032	0.21565	0.02116	0.13349	0.12907	0.10299	0.13914	0.06334	0.14865	0.27038	0.18216

	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									
26	0.00000								
27	0.29714	0.00000							
28	0.09401	0.03887	0.00000						
29	0.11960	0.02256	-0.00078	0.00000					
30	0.16005	0.20996	0.09864	0.11172	0.00000				
31	0.15668	0.14286	0.05901	0.06122	0.07579	0.00000			
32	0.14286	0.11765	0.04037	0.04082	0.06656	-0.06178	0.00000		
33	0.23745	0.44058	0.27171	0.30885	0.20672	0.06237	0.09314	0.00000	
34	-0.01819	0.36102	0.15312	0.21086	0.16149	0.19498	0.18340	0.21043	0.00000

## ANEXO 1

Marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder (New England Biolabs), utilizado como padrão de peso molecular nas Figuras 6, 7 e 8.

Foto do fabricante, disponível em:

<http://www.neb.com/nebecomm/products/productn3232.asp> Acesso em 30/01/2012.

