

Miguel Busarello Lauterjung

EVIDÊNCIAS GENÉTICAS DA AÇÃO ANTRÓPICA PRÉ-COLOMBIANA SOBRE A EXPANSÃO DA *Araucaria angustifolia*

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 Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lauterjung, Miguel Busarello
EVIDÊNCIAS GENÉTICAS DA AÇÃO ANTRÓPICA PRÉ
COLOMBIANA SOBRE A EXPANSÃO DA Araucaria
angustifolia / Miguel Busarello Lauterjung ;
orientador, Maurício Sedrez dos Reis - Florianópolis,
SC, 2017.
93 p.

- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Araucaria
angustifolia. 3. Filogeografia. 4. Dispersão
antrópica. 5. Ecologia. I. Sedrez dos Reis, Maurício.
II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais. III. Título.

Evidências genéticas da ação antrópica pré-Colombiana sobre a expansão da *Araucaria angustifolia*

por

Miguel Busarello Lauterjung

Dissertação julgada e aprovada em 23/02/2017, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Banca Examinadora:



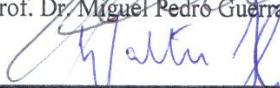
Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis (Presidente-CCA/UFSC)



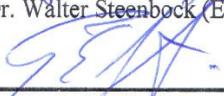
Prof. Dr. Adelar Mantovani (Externo-CAV/UDESC)



Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (Interno-CCA/UFSC)



Prof. Dr. Walter Steenbock (Externo-ICMBio/SC)



Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2017

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer o professor Dr. Maurício Sedrez dos Reis, pelo apoio, oportunidade, confiança e orientação.

À equipe que compôs o Núcleo de Pesquisa em Florestas Tropicais durante a realização do mestrado: Alison Paulo Bernardi, Andréa Gabriela Mattos, Bruno Bittencourt Schroeder Chagas, Caroline Cristofolini, Glauco Schüssler, Juliano Zago da Silva, Márcia Patrícia Hoeltgebaum, Newton Clóvis Freitas da Costa, Rafael Candido Ribeiro, Tiago Montagna, Victor Hugo Buzzi e Willian Vieira.

Ao professor Dr. Adelar Mantovani, por toda a ajuda, apoio e incentivos fornecidos desde a graduação.

Ao Giovani Festa Paludo pelos ensinamentos e oportunidades.

Ao pessoal do LFDGV por toda a ajuda.

Agradeço à Bernadete Ribas e à todos os professores do RGV.

À minha família que me permitiu chegar até aqui.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

Ao ICMBIO, todas as Unidades de Conservação, e aos proprietários das áreas, que gentilmente cederam acesso, autorizaram a coleta e possibilitaram esta pesquisa.

RESUMO

A *Araucaria angustifolia* é uma espécie importante, tanto pelas suas funções ecológicas, quanto pelos seus usos para os humanos. No passado, a exploração madeireira ocorreu de maneira exploratória, resultando na fragmentação do seu hábitat natural e a classificando como criticamente em perigo de extinção pela IUCN. Neste contexto, as medidas para a sua conservação foram no sentido de restringir o uso pelo ser humano, desconsiderando possíveis interações benéficas reportadas na literatura, que podem favorecer a conservação de um recurso por meio do seu uso. Várias evidências e características de *A. angustifolia* apontam para uma interação forte com o ser humano, especialmente no período pré-Colombiano, associada aos grupos Jê do Sul. Há fortes evidências de que esta espécie dependeu da ação antrópica para sua expansão e sobrevivência, tornando os modelos atuais de conservação limitantes para a manutenção de paisagens com araucária. O objetivo deste trabalho foi buscar evidências da ação humana pré-Colombiana sobre a expansão de *A. angustifolia*, utilizando uma abordagem genética e ecológica. A movimentação humana foi identificada pela cronologia dos dados arqueológicos existentes, e uma correlação entre a quantidade de ocupações com a porcentagem de pólen de *A. angustifolia* da data correspondente foi testada. Além disso, utilizando dados ecológicos existentes, foram construídos dois cenários para calcular a velocidade de expansão da *A. angustifolia* sem o auxílio humano: um utilizando dados médios e outro dados extremos reportados na literatura. No nível genético, foram estudadas 20 populações distribuídas no Sul do Brasil. Cada uma teve 15 indivíduos sequenciados para três locos do DNA de cloroplasto. Foram analisados desvios da neutralidade, os índices genéticos de riqueza, diversidade e de distâncias genéticas, e a possível associação desse último descritor com distâncias geográficas. Os resultados mostraram que a movimentação humana ocorreu primeiramente próxima à região da Serra Geral, seguida de um pico de expansão, atingindo regiões mais distantes até o ponto extremo no Oeste. Existiram correlações entre o número de registros humanos com a porcentagem de pólen ($\rho = 0,700$ a $0,804$). Nenhum dos cenários construídos para o cálculo da velocidade de dispersão da espécie sem o auxílio humano permitiu que a *A. angustifolia* atingisse sua área de ocorrência máxima no tempo decorrido desde o seu registro mais antigo. Os resultados genéticos encontraram valores elevados para a riqueza (número) de haplótipos ($H_r = 12$ haplótipos), e baixos para a diversidade de nucleotídeos ($\pi = 6,1 \cdot 10^{-5}$) e de haplótipos ($H_d = 0,167$).

A rede de haplótipos, que demonstra a relação evolutiva entre eles, apresentou um padrão em formato de estrela, e foram encontrados desvios da neutralidade ($D = -1,84$; $F_S = -17,00$), características que indicam uma expansão populacional recente e rápida. A divergência genética interpopulacional foi baixa ($F_{ST} = 0,04$), na qual as populações possuem um material genético de cpDNA muito semelhante entre si, e não associada à distâncias geográficas, formando apenas um grupo ($k = 1$). Todos os resultados encontrados apontam na mesma direção, trazendo mais evidências de que os grupos humanos influenciaram fortemente na dispersão e expansão da araucária. Isso demonstra que o uso de uma espécie pode ser uma boa estratégia de conservação e inclusive de expansão, diferente das principais estratégias existentes até o momento. No contexto atual, o uso, incluindo plantios para a produção de pinhão e outras ações, podem favorecer a conservação das paisagens com araucária no Sul do Brasil.

Palavras-chave: pinhão; estrutura genética; filogeografia; paisagens culturais; dispersão antrópica; diversidade genética

ABSTRACT

Araucaria angustifolia is an important species, for both its ecological functions and by its uses by humans. In the past, the wood exploitation occurred in a non-sustainable way, resulting in the fragmentation of its natural habitat and in its recent IUCN red list classification, as critically endangered. In this context, the conservation measures were to restrict humans from its use, disregarding possible benefic interactions reported in the literature, which may favor the conservation of a resource through its use. Many evidences and *A. angustifolia* characteristics point to a strong interaction with humans, especially in the pre-Columbian time, associated with Jê do Sul groups. There is strong evidence that the species relied on the anthropic action for its expansion and survival, making the current conservation models limited for the maintenance of the araucaria landscapes. The aim of this work was to search for evidences of the pre-Columbian human action over the expansion of *A. angustifolia*, using a genetic and an ecological approach. The human movement was identified by the chronology of the existing archeological data, and a correlation between the number of occupations and *A. angustifolia* pollen percent from the corresponding date was tested. Moreover, using existing ecological data, two scenarios were constructed to calculate the expansion speed of *A. angustifolia* without the human aid: one using the average data and the other using the extreme data reported in the literature. At the genetic level, 20 populations distributed in Southern Brazil were studied. Each one had 15 individuals sequenced for three cpDNA loci. Deviations from neutrality, descriptors of genetic richness, diversity and genetic distances, and possible association between the later and geographic distances were analyzed. Results showed that the human movement first occurred near the Serra Geral region, followed by an expansion peak, reaching more distant regions to the extreme point in the West. There were correlations between the number of human records and the pollen percent ($\rho = 0,700$ to $0,804$). None of the scenarios constructed for the calculation of the dispersion speed of the species without human aid allowed *A. angustifolia* to reach its maximum occurrence area in the elapsed time since its oldest record. The genetic results found high values for haplotype richness ($H_r = 12$ haplotypes), and low values for nucleotide ($\pi = 6,1 \cdot 10^{-5}$) and haplotype diversity ($H_d = 0,167$). The haplotype network presented a star shaped pattern, and deviations from neutrality were found ($D = -1,84$; $F_s = -17,00$), characteristics that indicate a quick and recent population expansion. The interpopulational genetic divergence was

low ($F_{ST} = 0,04$), in which populations have a cpDNA genetic material very similar to each other, and not associated with geographical distances, forming a single group ($k = 1$). All results point in the same direction, bringing more evidence that human groups heavily influenced in the dispersion and expansion of araucaria. This demonstrates that the use of a species can be a good conservation strategy and even facilitating in its expansion, unlike the main strategies used so far. In the present context, the use, including plantation for seed production and other actions, may favor the conservation of the araucaria landscapes in Southern Brazil.

Keywords: *pinhão*; genetic structure; phlogeography; cultural landscapes; antropic dispersion; diversidade genética

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Prancha ilustrativa da *Araucaria angustifolia*. (a) indivíduo juvenil; (b) e (c) indivíduo adulto; (d) indivíduos adultos em ambiente de campo; (e) indivíduos adultos em ambiente de floresta; (f) pinhas contendo as sementes; (g) prato típico – paçoca de pinhão; (h) prato típico – entrevero de pinhão. Fonte: acervo do Núcleo de Pesquisas em Florestas Tropicais..... 24
- Figura 2.** Diagrama palinológico de espécies de campo e de espécies florestais. A linha vermelha destaca a data de aproximadamente 4000 anos A.P. Abaixo da linha o intervalo é de 4000 até aproximadamente 40000 anos A.P., e acima da linha o intervalo é de 4000 até o presente. Fonte: retirado de Behling et al. (2004; Figura 2a). 26
- Figura 3.** Localização dos estudos palinológicos. 1) Cambará do Sul (CdS); 2) São Francisco de Paula (SFP); 3) Serra do Rio do Rastro (SRR); 4) Morro da Igreja (MdI); 5) Serra da Boa Vista (SBV); 6) Serra Campos Gerais; 7 Volta Velha. Fonte: retirado de Behling et al. (2004; Figura 1). 26
- Figura 4.** Registros palinológicos, contendo porcentagens de pólen de *Araucaria angustifolia*, de 14000 anos A.P. até o presente. a) SBV: Serra da Boa Vista; b) MdI: Morro da Igreja; c) SRR: Serra do Rio do Rastro; d) SCG: Serra Campos Gerais; e) SFP: São Francisco de Paula; f) CdS: Cambará do Sul. Fonte: gráficos adaptados de Behling (1995; 1997) e Behling et al. (2001; 2004). 27
- Figura 5.** Modelagem de nicho ecológico para *Araucaria angustifolia* durante o Último Glacial Máximo e sua escala de adaptabilidade de acordo com a modelagem climática empregada. Fonte: retirado de Barros et al. (2015; Figura 2j). 28
- Figura 6.** Frequência de registros de ocupações de todas as tradições indígenas no Sul do Brasil, no período de 13000 anos A.P. até 0 anos A.P. Fonte: adaptação gráfica dos dados de Noelli (2000). 30
- Figura 7.** Área de estudo nos estados do Sul do Brasil (de cima para baixo: Paraná – PR, Santa Catarina – SC, Rio Grande do Sul – RS). Letras representam o nome da população. Pontos verdes representam populações relictuais, e pontos vermelhos representam populações de migração. Fonte: desenvolvido pelo autor. 40
- Figura 8.** Fluxograma dos processos para a obtenção dos dados genéticos (haplótipos) individuais, a partir da união de três marcadores de cpDNA (DT, CS e SfM). Fonte: desenvolvido pelo autor. 44
- Figura 9.** Distribuição contínua de probabilidade da distância de dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia*, com intervalos de 1 m.

Fonte: adaptação (ver texto) dos dados de Bittencourt e Sebbenn (2007) e de Cristofolini (2013).....	48
Figura 10. Registros de ocupações humanas da tradição Jê do Sul (pontos azuis) no Sul do Brasil. a) - h): Cronologia das ocupações. Fonte: desenvolvido pelo autor, a partir de dados de Noelli (2000) e Iriarte e Behling (2007).	52
Figura 11. Correlações de Spearman (ρ) entre o número de ocupações e porcentagem de pólen registrados na literatura, a) sem atraso temporal; b) 100 anos de atraso temporal dos dados de pólen; c) 200 anos de atraso temporal dos dados de pólen. Fonte: desenvolvido pelo autor.....	53
Figura 12. Rede de haplótipos de <i>Araucaria angustifolia</i> , gerada a partir das populações estudadas nos estados do Sul do Brasil (RS, SC e PR) com o método <i>Median Joining</i> . O tamanho de cada círculo é proporcional a frequência do haplótipo (H1 n = 271; H3 n = 1). Fonte: desenvolvido pelo autor.	56
Figura 13. Mapa da localização geográfica das 20 populações de <i>Araucaria angustifolia</i> estudadas nos estados do Sul do Brasil (PR, SC e RS) e a frequência de seus respectivos haplótipos. Fonte: desenvolvido pelo autor.	58
Figura 14. Setas ligando haplótipos comuns de <i>Araucaria angustifolia</i> entre as populações (exceto H1), indicando possíveis movimentações de dispersão da espécie. Fonte: desenvolvido pelo autor.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localidade e classificação das populações de <i>Araucaria angustifolia</i> amostradas. Fonte: desenvolvido pelo autor.	41
Tabela 2. Primers universais de cpDNA (Demesure et al. 1995) utilizados no presente estudo. TE: tamanho esperado em <i>Araucaria angustifolia</i> ; TA: temperatura de anelamento utilizada. Fonte: desenvolvido pelo autor.	42
Tabela 3. Temperaturas, ciclos e tempos (s) utilizados no estudo para os iniciadores universais DT, CS e SfM (Demesure et al., 1995). Fonte: desenvolvido pelo autor.	42
Tabela 4. Descritores gerais de diversidade para os locos analisados. Fonte: desenvolvido pelo autor.	54
Tabela 5. Sequência dos haplótipos encontrados nos 297 indivíduos de <i>Araucaria angustifolia</i> e sua respectiva frequência. Fonte: desenvolvido pelo autor.	55
Tabela 6. Índices de diversidade (Hr: riqueza haplotípica, Hd: diversidade haplotípica, π : diversidade nucleotídica) e seus respectivos desvios padrões (d. p.), e testes de neutralidade (D: D de Tajima (1989), F _S : F _S de Fu (1997)) e seus valores de p, para as 20 populações de <i>Araucaria angustifolia</i> estudadas. Valores em negrito destacam $p < 0,05$. Fonte: desenvolvido pelo autor.	57
Tabela 7. Análise Molecular da Variância (AMOVA) para as populações estudadas de <i>Araucaria angustifolia</i> . Fonte: desenvolvido pelo autor.	59
Tabela 8. Divergência genética encontrada para alguns estudos populacionais de outras coníferas em diferentes continentes. AmN: América do Norte; AmS: América do Sul; AS: Ásia; EU: Europa.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- π – Diversidade nucleotídica
 ρ – Rho, coeficiente de correlação de Spearman
A.P. – Antes do Presente
AmN – América do Norte
AmS – América do Sul
AS – Ásia
b, pb – Bases ou pares de bases nitrogenadas
BSA – *Bovine Serum Albumine*
cpDNA – DNA do cloroplasto
CS – psbC-trnS
CdS – Cambará do Sul
D – Distância geográfica
d.p. – Desvio padrão
 D_s – Distância de dispersão de sementes
DAP – Diâmetro à altura do peito
ddNTP – Desoxirribonucleotídeos coloridos
dNTP – Desoxirribonucleotídeos
DT – trnD-trnT
EDTA – Etilenodiamino tetra-acético
EU – Europa
F – sentido *forward*, 5'-3'
GPS – *Global Positioning System*, Sistema de Posicionamento Global
h – Altura
Hd – Diversidade haplotípica
Hr – Riqueza haplotípica
IC_{95%} - Intervalo de confiança a 95%.
ICMBIO – Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade
JC69 – Jukes Cantor 1969, modelo evolucionar
L – Leste
LFDGV – Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal
MdI – Morro da Igreja
mtDNA – DNA da mitocôndria
N – Norte
 N_e – Tamanho efetivo populacional
NPFT – Núcleo de Pesquisa em Florestas Tropicais
O – Oeste
p – Probabilidade
PCR – *Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia da polimerase

PEG – Polietilenoglicol
PR – Paraná
r – Coeficiente de correlação de Pearson
R – sentido *reverse*, 3'-5'
RS – Rio Grande do Sul
S – Sul
SBV – Serra da Boa Vista
SC – Santa Catarina
SfM – trnS-trnfM
SFP – São Francisco de Paula
SMS – Sequence Manipulation Suit
SRR – Serra do Rio do Rastro
SSR – *Short Sequence Repeat*, microssatélites
T92 – Tamura 3-parameter (1992), modelo evolucionar
t_E – Tempo necessário para a expansão
t_G – Tempo de geração
UGM – Último Glacial Máximo, aproximadamente 14500 anos A.P.
v_D – Velocidade de dispersão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. ESPÉCIE DE ESTUDO	21
2.2. REGIÕES DE REFÚGIO PARA <i>Araucaria angustifolia</i>	25
2.3. DOMESTICAÇÃO, OCUPAÇÃO HUMANA E A ARAUCÁRIA	28
2.4. FILOGEOGRAFIA E MARCADORES DE ORGANELAS ...	32
3. OBJETIVOS	35
3.1. OBJETIVO GERAL	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4. HIPÓTESES	37
5. METODOLOGIA	39
5.1. ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM	39
5.2. AQUISIÇÃO DE DADOS GENÉTICOS	40
5.2.1. Extração de DNA	41
5.2.2. Amplificação por PCR e purificação	41
5.2.3. Reação de sequenciamento, purificação e sequenciamento	43
5.2.4. Transformação em dados brutos	43
5.3. ANÁLISE DE DADOS	45
5.3.1. Identificação de rotas de migração indígena	45
5.3.2. Relação entre ocupações e palinologia	45
5.3.3. Cálculo do tempo de expansão sem auxílio humano	46
5.3.3.1. Modelo	46
5.3.3.2. Velocidade requerida (v_r)	46
5.3.3.3. Velocidade calculada (v_c)	47
5.3.3.4. Cenários	48
5.3.4. Caracterização genética	49
5.3.5. Divergência genética e identificação de grupos	49
5.3.6. Testes de neutralidade	50
6. RESULTADOS	51

6.1. ECOLÓGICOS E ARQUEOLÓGICOS.....	51
6.1.1. Palinologia, ocupação e movimentação humana.....	51
6.1.2. Cálculo do tempo de expansão sem auxílio humano.....	51
6.2. GENÉTICOS	53
7. DISCUSSÃO.....	61
7.1. MOVIMENTOS HUMANOS	61
7.2. CÁLCULO DO TEMPO DE EXPANSÃO SEM AUXÍLIO HUMANO	61
7.3. GENÉTICA	63
7.3.1. Amostragem e marcadores utilizados.....	63
7.3.2. Descritores de diversidade genética	64
7.3.3. Divergência genética	65
7.3.4. Testes de neutralidade	68
7.3.5. Conjunto dos dados genéticos	68
7.4. MOVIMENTAÇÃO PELA GENÉTICA	69
8. CONCLUSÕES	71
9. PERSPECTIVAS E IMPLICAÇÕES PARA O USO E A CONSERVAÇÃO	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
ANEXO A – PROTOCOLO EXTRAÇÃO.....	89
ANEXO B – SEQUÊNCIAS ANALISADAS.....	91
ANEXO C – F_{ST} PAR-A-PAR ENTRE POPULAÇÕES.....	923

1. INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica está entre um dos cinco principais biomas classificados como *hotspots* para a conservação de biodiversidade do mundo (Myers et al., 2000). *Hotspots* são áreas prioritárias por abrigarem grande parte da biodiversidade do planeta em sua extensão, possuem um alto número de espécies endêmicas, terem sofrido reduções drásticas de suas áreas originais, e que se encontrem em um nível de ameaça antrópica elevado (Myers et al., 2000). No bioma Mata Atlântica, encontra-se a formação Floresta Ombrófila Mista, uma das mais ameaçadas do Brasil, para a qual restam apenas 24,4% de sua cobertura original no estado de Santa Catarina (Vibrans et al., 2012). No âmbito dessa cobertura remanescente, os seus fragmentos foram explorados com diversas intensidades, principalmente devido a atividades envolvendo o corte seletivo e a expansão de áreas agropecuárias (Vibrans et al., 2011).

Uma das espécies mais marcantes e de alta importância deste bioma é a *Araucaria angustifolia*, tanto pelas relações ecológicas que mantém com a fauna, quanto pelas características interessantes para o uso humano, tais como uma madeira de qualidade e, principalmente, por produzir uma semente com alto valor nutritivo. Porém, a exploração madeireira, que ocorreu de forma predatória e em larga escala, e causou grande redução e fragmentação de sua área original de ocorrência, fez com que a espécie fosse classificada como criticamente em perigo de extinção pela Lista Vermelha da IUCN (Thomas, 2013).

Por isso, as relações entre o ser humano e a araucária são vistas, de uma maneira geral, como predatórias e destrutivas. Assim, foram criados instrumentos legais para proibir o seu corte (Resolução nº 278 – CONAMA, 2001; e a Lei da Mata Atlântica, Lei nº 11.428 – Brasil, 2006), por ela ser considerada ameaçada de extinção nas listas Nacional e do estado de Santa Catarina, e a lei do Sistema Nacional das Unidades de Conservação (SNUC, Lei nº 9.985 – Brasil, 2000), que exclui o ser humano nas unidades de conservação *in situ* de proteção integral. Porém, existem evidências de que a araucária pertencia a uma paisagem culturalmente construída, havendo uma relação muito mais forte entre os humanos e esta espécie desde o Holoceno médio, pelo seu uso e manejo (Bitencourt e Krauspenhar, 2006; Reis et al., 2014), e que esta interação auxiliou na distribuição e expansão da espécie no final do Holoceno. Se a paisagem foi culturalmente construída ao longo do tempo por meio do uso de recursos por agrupamentos humanos, a exclusão das práticas de manejo tradicionais (pré-Colombianas) nas paisagens com araucária pode prejudicar as espécies que dependem dos benefícios dessa interação.

Nessa visão, as práticas de uso e manejo tradicional (pré-Colombiano) poderiam tornar a conservação da espécie mais eficiente, se fossem incluídas nas estratégias de conservação (Reis et al., 2014).

Novas informações geradas com enfoque no passado da araucária podem elucidar se a ação humana foi significativa na construção da paisagem e, caso necessário, servir de base para propor novas abordagens de conservação. Estudos genéticos com marcadores moleculares conseguem atuar em uma escala temporal diferenciada e permitem o acesso a essa informação.

Assim, este estudo visa buscar evidências genéticas e ecológicas da possível associação entre a expansão da araucária e ação humana pré-Colombiana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ESPÉCIE DE ESTUDO

A espécie de estudo é a *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze (Figura 1), popularmente conhecida como araucária, pinheiro do Paraná ou pinho (Reitz e Klein, 1966). Ela pertence à família Araucariaceae, que teve sua origem no hemisfério sul, exceto por algumas espécies do gênero *Agathis* (Reitz e Klein, 1966).

A importância da araucária é atribuída às suas diversas utilidades. A sua semente, o pinhão, é uma fonte de alimento altamente nutritivo para os seres humanos e para a fauna (Reitz e Klein, 1966), com oferta em épocas de escassez de outros produtos na floresta (Paize e Vieira, 2005). Além disso, possui uma madeira de qualidade, que pode ser utilizada para vigas, pranchões, caixas, móveis, palitos de dente, instrumentos musicais, entre outros (Reitz e Klein, 1966). Do ponto de vista ecológico, além do alimento, a espécie também atua como facilitadora (*nurse plant*) para a chegada de novos propágulos, de germinação e de crescimento de outras espécies abaixo de sua copa (Duarte et al., 2006).

A araucária encontra-se criticamente ameaçada de extinção, principalmente devido à exploração madeireira e a grande redução de sua área original (Thomas, 2013), restando cerca de 12,6% de áreas de Floresta Ombrófila Mista (Ribeiro et al., 2009). Na tentativa de mitigar a situação de ameaça e conservar a espécie, o seu corte foi proibido (Resolução nº 278 – CONAMA, 2001), aspecto reforçado pela criação da Lei da Mata Atlântica (Lei nº 11.428 – Brasil, 2006), sua regulamentação e, especialmente, em decorrência da sua inclusão nas listas de espécies ameaçadas de extinção, desde a Portaria nº 06-N (Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção - IBAMA, 1992), que a classificava como vulnerável, até a atual Portaria nº 443 (Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção - MMA, 2014), que a classifica como em perigo de extinção, e a Resolução CONSEMA nº 51 (Lista Oficial das Espécies da Flora Ameaçada de Extinção no Estado de Santa Catarina – CONSEMA, 2014), que a classifica como criticamente em perigo de extinção. Além disso, as unidades de conservação *in situ* de proteção integral exigem a desapropriação e remoção do ser humano do meio (SNUC, Lei nº 9.985 – Brasil, 2000). Essas medidas desconsideram que a interação entre o ser humano e a araucária pode ser benéfica para ambas as espécies.

A espécie tem sua ocorrência distribuída nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e também

na Argentina, com altitudes variando de 400 m a 1800 m (Mattos, 1994). No Sul do Brasil, ela ocorre desde a borda das Serras do Mar e da Mantiqueira até o Oeste brasileiro (Reitz e Klein, 1966). É uma espécie que suporta o frio e as geadas (Reitz e Klein, 1966), mas a característica mais importante para o seu sucesso parece ser a umidade, já que requer uma precipitação média mínima de 1400 mm por ano (Golte, 1978).

A araucária possui características de uma espécie pioneira longeva (Souza et al., 2008), com crescimento relativamente lento quando comparado com outras coníferas, principalmente nas fases iniciais (Reitz e Klein, 1966). Por consequência, ela possui um longo tempo de vida, e uma idade média de 140 a 200 anos, dificilmente ultrapassando 300 anos (Reitz e Klein, 1966). Dividindo o tamanho pelas taxas de incremento encontradas em um ambiente de floresta, Paludo et al. (2016a) estimaram o tempo da maior árvore encontrada em uma área (RGFC) na região de Caçador-SC (DAP = 149,4 cm) como sendo de 596 anos.

A produção de pinhas começa com mais de 50 anos em ambientes sem manejo humano (Paludo et al., em preparação), podendo esta ser explicada por relação logística com o diâmetro (Paludo et al., 2016b). Por consequência, áreas de plantio, que fornecem condições mais adequadas para o desenvolvimento da espécie e maior incremento, podem acelerar a produção de sementes.

Sua dispersão primária ocorre por sementes, que caem da árvore por gravidade. A sua dispersão secundária ocorre pelos seres vivos, como roedores (cutias, pacas, ratos-do-mato, ouriços, esquilo-brasileiro), aves (gralhas, papagaios, tucanos) e humanos (Reitz e Klein, 1966; Carvalho, 2003). A dispersão secundária é o mecanismo que mais influi sobre a distância de dispersão, quando comparado com a dispersão primária (Reitz e Klein, 1966).

No nível genético, a dispersão de alelos ocorre pelo movimento de sementes e do pólen. Para sementes, a distância média da planta mãe foram registrados 92 m, variando de 0,35 a 291 m (Bittencourt e Sebbenn, 2007), e 109 m, variando de 7,32 a 237 m (Cristofolini, 2013), distâncias estas obtidas em situação sem o auxílio humano. Já para o pólen, as distâncias médias foram de 83 m, variando de 11 a 287 m (Bittencourt e Sebbenn, 2007), de 101 m, variando de 12 a 344 m (Bittencourt e Sebbenn, 2008), de 125 m, variando de 10 a 334 m (Cristofolini, 2013), de 167 m, variando de 4 a 728 m (Costa, 2014), de 105 m, variando de 7 a 293 m (dentro da floresta, Medina-Macedo et al., 2015), e de 298 m, variando de 178 a 458 m (floresta aberta, Medina-Macedo et al., 2015).

A espécie é dioica, raramente havendo casos de indivíduos monóicos (Reitz e Klein, 1966). Sendo assim, é uma espécie de

cruzamento obrigatório, aspecto reforçado por estudos do sistema de cruzamento da espécie (Souza et al., 2005; Bittencourt e Sebbenn, 2008; Ferreira et al., 2012; Medina-Macedo et al., 2015).

Estudos genéticos referentes à espécie apontam para um índice de fixação elevado a alto (Reis et al., 2012), que pode estar associado à efeitos da endogamia, já que o seu sistema de cruzamento não permite autofecundação, e que o seu fluxo gênico é limitado, ocorrendo preferencialmente entre as primeiras classes de distância.

O maior nível da diversidade genética aparenta ser dentro das populações, pois foram encontradas baixas (F_{ST} não diferente de 0 até $F_{ST} \approx 0,1$) divergências genéticas entre as populações estudadas com marcadores SSR ou de alozimas (Auler et al., 2002; Stefenon et al., 2007; Reis et al., 2012; Zechini, 2012). Porém, para marcadores de cpDNA e em uma área de estudo mais ampla, foram encontrados valores médios ($F_{ST} = 0,269$) a altos ($F_{ST} = 0,431$) de distância genética (Klabunde, 2012). A distância genética entre populações pode ou não estar correlacionada com a distância geográfica (Stefenon et al., 2007; Reis et al., 2012; respectivamente).

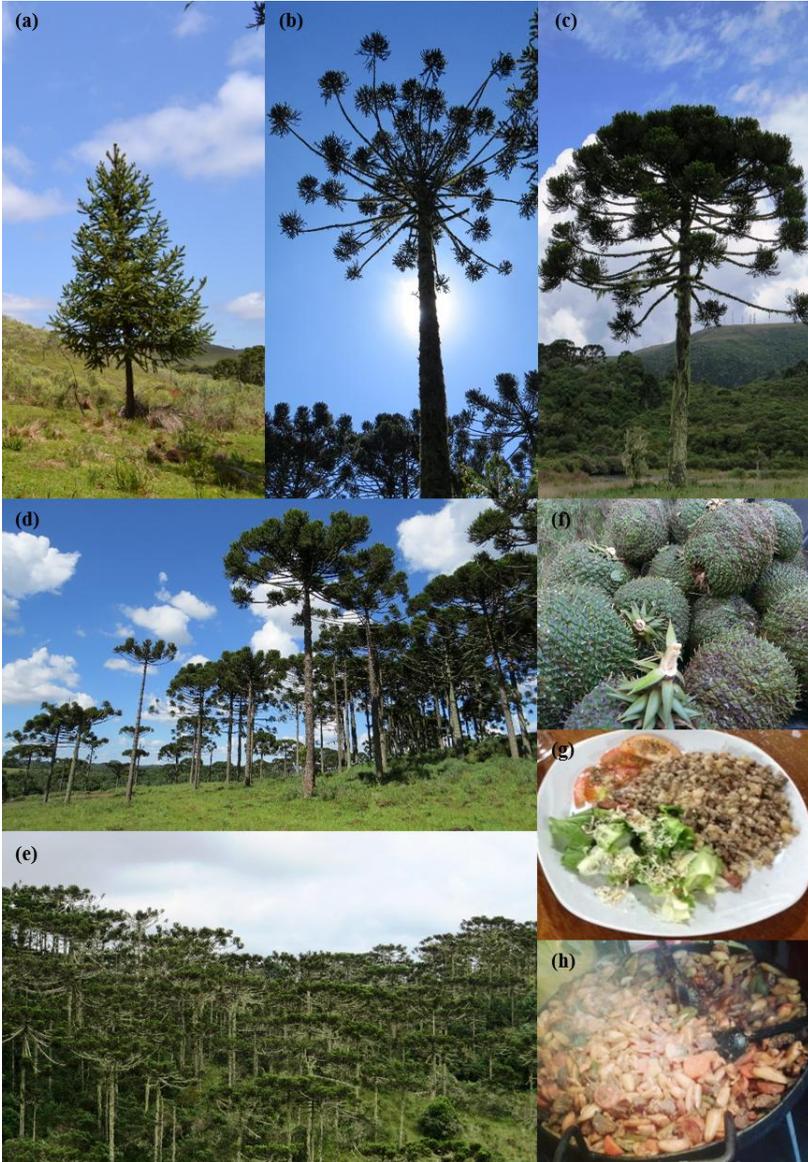


Figura 1. Prancha ilustrativa da *Araucaria angustifolia*. (a) indivíduo juvenil; (b) e (c) indivíduos adultos; (d) indivíduos adultos em ambiente de campo; (e) indivíduos adultos em ambiente de floresta; (f) pinhas contendo as sementes; (g) prato típico – paçoca de pinhão; (h) prato típico – entreviro de pinhão. Fonte: acervo do Núcleo de Pesquisas em Florestas Tropicais.

2.2. REGIÕES DE REFÚGIO PARA *Araucaria angustifolia*

Do ponto de vista ecológico, um refúgio é uma área, de tamanho variado, para a qual espécies recuam, persistem e eventualmente se expandem a partir dela, devido a mudanças adversas, principalmente climáticas, que dificultam a sobrevivência no seu hábitat natural (Keppel et al., 2012). A identificação de áreas de refúgio no passado pode ser realizada por estudos palinológicos, ecológicos, genéticos e filogeográficos (Keppel et al., 2012).

Durante o Último Glacial Máximo (aproximadamente 14500 anos A.P.), que ocorreu no período entre o final do Pleistoceno até o início do Holoceno, as condições climáticas eram mais secas e frias (Behling, 1995), e a vegetação existente no Sul do Brasil era, quase que em totalidade, de campo (Figura 2; Behling et al. 2004). Isso reduziu as populações de *Araucaria angustifolia* para regiões com condições climáticas menos restritivas, que serviram de refúgio para a sobrevivência da espécie. A araucária permaneceu nesses locais até o final do Holoceno, cerca de 4000-3000 anos A.P., quando as condições climáticas se tornaram mais úmidas, quentes e favoráveis ao seu desenvolvimento (Behling, 1995).

As possíveis regiões de refúgio para a espécie foram apontadas por estudos palinológicos como vales próximos à regiões montanhosas encontradas no Leste da região Sul do Brasil. Estes estudos encontraram pólen de araucária nessas regiões (Figura 3 exceto o ponto 7 e Figura 4; Behling, 1995; 1997; Behling et al. 2001; 2004). Mais recentemente, um estudo ecológico utilizando dados de modelagem de nicho para *A. angustifolia* (Figura 5; Barros et al., 2015) demonstra uma área de maior adaptabilidade para a espécie no passado, e reforça essa área como refúgio, principalmente a formação Serra Geral. Porém, não se sabe ao certo como era o seu tamanho e o número de indivíduos suportados por eles.

Portanto, a área mais provável de refúgio da araucária ocorreu nesta única área, a qual forneceu o material genético para a expansão da espécie.

Ainda, as melhorias nas condições climáticas não tiveram muito efeito sob a expansão da araucária a partir de suas áreas de refúgio. A expansão da espécie só começa cerca de 2000 a 1500 anos A.P. em todas as regiões estudadas, podendo ser considerado um curto intervalo de tempo para a ampla distribuição máxima atingida pela espécie.

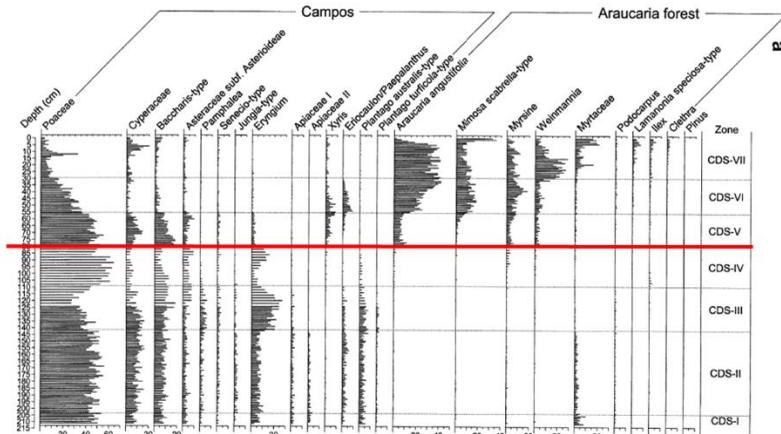


Figura 2. Diagrama palinológico de espécies de campo e de espécies florestais. A linha vermelha destaca a data de aproximadamente 4000 anos A.P. Abaixo da linha o intervalo é de 4000 até aproximadamente 40000 anos A.P., e acima da linha o intervalo é de 4000 até o presente. Fonte: retirado de Behling et al. (2004; Figura 2a).

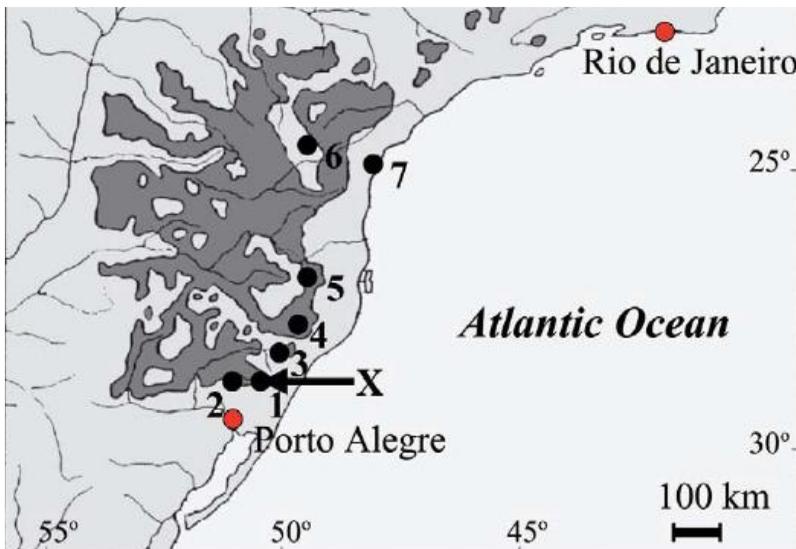


Figura 3. Localização dos estudos palinológicos. 1) Cambará do Sul (CdS); 2) São Francisco de Paula (SFP); 3) Serra do Rio do Rastro (SRR); 4) Morro da Igreja (MdI); 5) Serra da Boa Vista (SBV); 6) Serra Campos Gerais; 7) Volta Velha. Fonte: retirado de Behling et al. (2004; Figura 1).

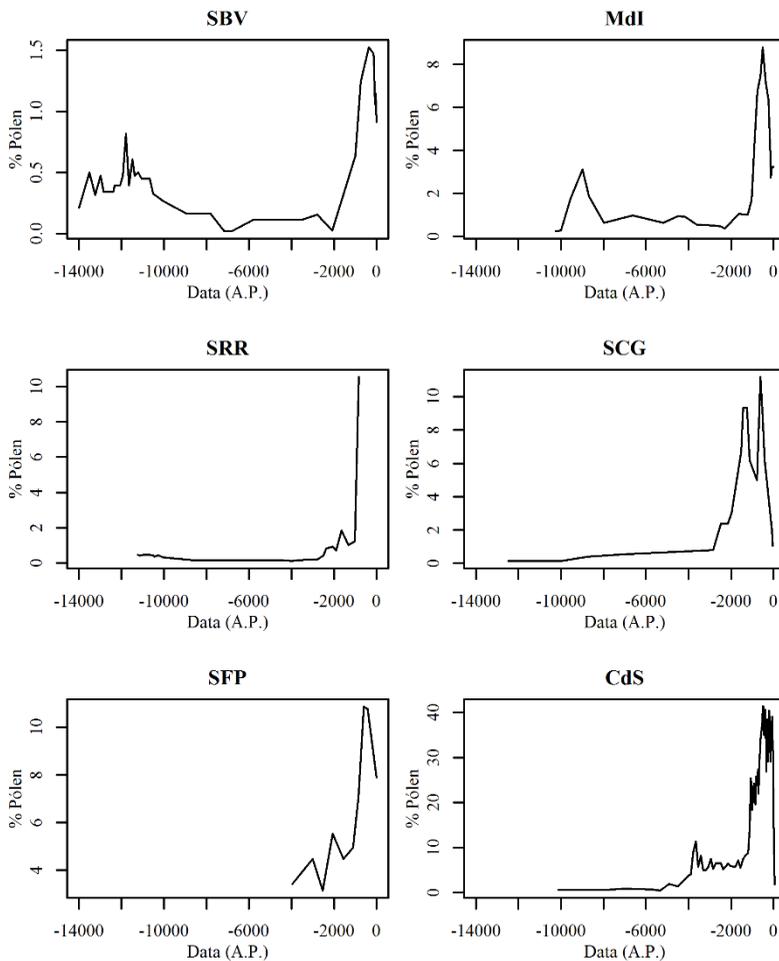


Figura 4. Registros palinológicos, contendo porcentagens de pólen de *Araucaria angustifolia*, de 14000 anos A.P. até o presente. a) SBV: Serra da Boa Vista; b) MdI: Morro da Igreja; c) SRR: Serra do Rio do Rastro; d) SCG: Serra Campos Gerais; e) SFP: São Francisco de Paula; f) CdS: Cambará do Sul. Fonte: gráficos adaptados de Behling (1995; 1997) e Behling et al. (2001; 2004).

Araucaria angustifolia

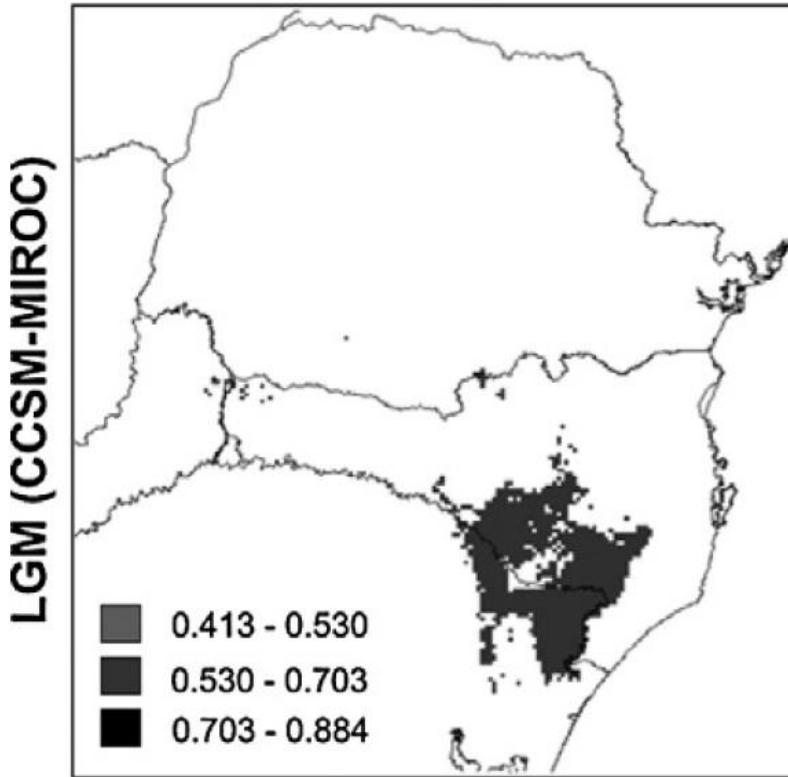


Figura 5. Modelagem de nicho ecológico para *Araucaria angustifolia* durante o Último Glacial Máximo e sua escala de adaptabilidade de acordo com a modelagem climática empregada. Fonte: retirado de Barros et al. (2015; Figura 2j).

2.3. DOMESTICAÇÃO, OCUPAÇÃO HUMANA E A ARAUCÁRIA

Domesticação é um processo coevolutivo, no qual o ser humano realiza modificações no meio e nos seus componentes, visando melhorias para suas condições de vida, e pode ser subdividido em domesticação de paisagens e domesticação de espécies (Clement, 1999).

A domesticação de paisagens as torna mais produtivas e agradáveis para os humanos, através de práticas culturais (Clement, 1999). Essas práticas podem ocorrer de forma consciente ou inconsciente, como a

abertura de espaço para construir assentamentos, e o principal agente pelo qual o processo atua é a cultura (Clement, 2014).

Algumas das evidências da domesticação de paisagens na América do Sul, que foram praticadas por muito tempo antes da chegada dos europeus, são situações com uso de engenharias de terra (e.g. montículos de finalidade ritualística, com ou sem estruturas anelares – *mound and enclosures*, Iriarte e Behling, 2007), a agricultura de corte e queima, e descarte de resíduos e sementes em “lixões”, que formavam os solos antropogênicos (Roosevelt, 2013), sendo este último um processo altamente ligado a domesticação de espécies (Clement, 2014).

Além disso, a domesticação de espécies é também um processo coevolutivo no qual os humanos selecionam fenótipos de seu interesse, que os tornam mais úteis e adaptados às paisagens modificadas ao longo do tempo (Clement, 1999). Por ser um processo, a domesticação pode variar quanto ao tempo da intervenção humana (Clement, 1999), à intencionalidade e ao nível de dependência entre as espécies (Zeder, 2006).

Na Amazônia, 68% dos cultivos são árvores ou espécies perenes (Clement, 2010). Algumas mostram sinais claros de domesticação, com grandes variações morfológicas (Clement, 1989), entretanto, nem todas possuem sinais tão claros. Dentro de uma classificação referente ao nível de domesticação para a Amazônia, 45 das espécies foram classificadas como incipiente domesticadas, das quais todas eram arbóreas e possuíam potencial alimentício (sementes ou frutos) exceto uma (Clement, 1999). Isso demonstra que os povos indígenas que habitavam estas áreas, utilizando todos os recursos possíveis, iniciaram vários processos de domesticação, mas as espécies perenes não necessariamente deixaram grandes traços de domesticação, identificáveis nos dias de hoje, provavelmente devido ao longo tempo de geração das espécies arbóreas.

Ainda, espécies anuais possuem uma dependência mais forte da presença do ser humano do que as arbóreas e perenes e, por isso, sofrem erosão genética mais rápida após o abandono do uso (Clement, 1999), havendo relatos de desaparecimentos e extinções de espécies (Clement, 1999). Na remoção do ser humano do meio, corre-se o risco de também perdemos espécies que dependem da intervenção e manejo para sua manutenção, como discutido em Clement (1999). No Sul do Brasil, a realidade não foi diferente, apesar de não ter sido tão intensamente estudada quanto à região Amazônica. É muito provável que as populações mais antigas já utilizassem recursos das florestas, incluindo a araucária, o butiá, o palmito, e a erva-mate, auxiliando na dispersão destas espécies,

tendo em vista que todos os espaços desta região foram ocupados sem exceções, podendo ser de forma sistemática ou ocasional (Noelli, 2000).

A ocupação no Sul do Brasil teve início a partir de 13000 a 12000 A.P. (Figura 6), com povos de características caçadores-coletores, até cerca de 2500 A.P., quando começaram a ser invadidas por tradições Tupi e Macro-Jê, havendo uma quantidade muito maior de registros de ocupações (Figura 6; Noelli, 2000).

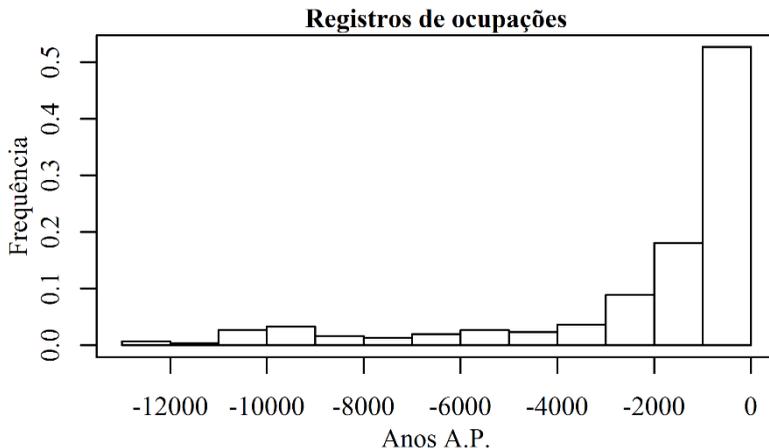


Figura 6. Frequência de registros de ocupações de todas as tradições indígenas no Sul do Brasil, no período de 13000 anos A.P. até 0 anos A.P. Fonte: adaptação gráfica dos dados de Noelli (2000).

As tradições Tupi e Macro-Jê eram ceramistas com modelos de organização baseados no manejo agroflorestal (Noelli, 2000). Porém, com a chegada dos povos europeus, grande parte de suas tradições se perderam na devastação causada por epidemias e guerras. Isso causou grande desestruturação de territórios e de culturas, muitas vezes forçando o abandono da agricultura e do sedentarismo, criando uma falsa impressão que os povos sempre foram caçadores-coletores (Noelli, 2000).

A ocupação indígena com maior intensidade no Sul do Brasil foi marcada pela intensificação de ocorrências de fogo iniciados por humanos (Behling, 1997; Behling et al., 2005; Iriarte e Behling, 2007) e da ocorrência de casas subterrâneas (*pit houses*, Bitencourt e Krauspenhar, 2006). Grupos humanos já coexistiam com a araucária cerca de 7500 anos A.P., porém a ocupação ocorria de maneira irregular e infrequente até cerca de 4000 a 3000 anos A.P. (Reis et al., 2014). Juntamente com essa data, a dispersão da araucária só se teve início a

partir do final do Holoceno em todo o Sul do Brasil, juntamente com melhorias nas condições climáticas (Behling, 1997; Behling et al., 2004). Entre 2000 a 1000 anos A.P., a intensificação da expansão da araucária foi contínua, de tal forma que, dentro de um período de 100 anos, a vegetação florestal poderia ter substituído a vegetação de campo existente no planalto do Sul do Brasil (Iriarte e Behling, 2007). Coincidente com este período, ocorreram o maior número de registros de ocupações indígenas (Figura 6), especificamente da tradição linguística Jê do Sul, que teve o seu pico entre 1000 e 600 anos A.P. (Noelli, 2000).

A tradição Jê do Sul coexistiu temporalmente com a *Araucaria angustifolia*, e foi a que possuiu uma relação mais forte com a espécie. Os grupos dessa tradição eram sedentários, agricultores, e realizavam o manejo das florestas (Noelli, 2000). Construíam casas subterrâneas (*pit houses*) como forma de abrigo (Noelli, 2000; Bitencourt e Krauspenhar, 2006) e estruturas ritualísticas onde habitavam (Iriarte e Behling, 2007). Além disso, tinham a semente da araucária, o pinhão, como item básico da dieta vegetal (Noelli, 2000; Reis et al., 2014), podendo ainda ser utilizada para atrair caça e plantada para a demarcação de territórios (Reis et al., 2014). Essas características apontam fortemente para o manejo e um processo de domesticação da araucária, com uma relação de interdependência.

Semelhante à *A. angustifolia*, a *A. araucana*, também nativa da América do Sul, mas com distribuição na Argentina e no Chile, possuiu uma relação cultural forte com grupos humanos de sua região, os Mapuche-Pehuenche (Reis et al., 2014). *Araucaria angustifolia* e *A. araucana* apresentam características ecológicas atrativas para o uso, tais como dispersão barocórica (reduz o esforço de coleta); regeneração facilitada em ambientes abertos; adaptabilidade em uma grande variabilidade de ambientes; e elevada produção de sementes de alto valor nutricional, que é interessante para alimentação e para atrair a fauna para caça (Reis et al., 2014). Ainda, existem evidências de outros usos das duas espécies de araucária, como usos sagrados e de cosmologia (somente *A. araucana*), de demarcação de territórios entre grupos, lenha, uso medicinal, forragem e madeira (Reis et al., 2014).

Estas características reforçam a ideia de que as florestas com araucária e as paisagens ao seu redor podem ter sido construídas culturalmente pelos agrupamentos humanos, que coexistiram com a espécie por longo tempo e, nas suas práticas de uso, conservaram e auxiliaram na expansão da araucária.

2.4. FILOGEOGRAFIA E MARCADORES DE ORGANELAS

A palavra filogeografia foi primeiramente usada por Avise et al. (1987) para descrever uma nova disciplina, que surge para realizar a conexão entre os estudos de processos microevolutivos e de hereditariedade com os estudos de processos macroevolutivos, de filogenia, sistemática e especiação. Sendo assim, filogeografia é um campo de estudo multidisciplinar, que investiga processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas entre e dentro de espécies, no tempo e espaço (Avise, 2000; Avise, 2009). Para conseguir estes resultados, a filogeografia utiliza ferramentas da biologia molecular, genética de populações, demografia, biologia filogenética, paleontologia, geologia e geografia histórica (Avise, 2000).

Dentro da biologia molecular, marcadores do DNA de organelas (DNA de mitocôndria: mtDNA, e de cloroplasto: cpDNA) são preferidos e amplamente utilizados pela filogeografia, por não sofrerem recombinação, terem normalmente herança uniparental, serem homoplásmicos (todas as moléculas são idênticas em sua sequência de DNA dentro do organismo, com raras exceções) e possuírem certo nível de polimorfismo, variável conforme a região analisada (Avise, 2009).

No caso das plantas, o cpDNA tem um tamanho de 120 a 217 quilobases (kb), possui uma taxa de evolução, em média, cerca de 3x a 4x mais rápido que o mtDNA (Avise, 2009) e, normalmente, é herdado maternalmente em angiospermas e paternalmente para as gimnospermas (Mogensen, 1996). Estudos de dispersão em espécies arbóreas se beneficiam da herança materna, por permitir inferências na movimentação de sementes (Marchelli et al., 2010). Para a família Araucariaceae, a única inferência que existia sobre a herança das organelas foi realizada a partir da espécie *Agathis australis*, com técnicas de microscopia (Kaur e Bhatnagar, 1984, citados em Mogensen, 1996; Owens et al., 1995), sendo o mtDNA e o cpDNA ambos herdados paternalmente. Mais recentemente, Marchelli et al. (2010) reforçaram esta ideia para *Araucaria araucana*, com uma metodologia de inferência indireta.

A análise filogeográfica permite então um melhor entendimento das pressões ecológicas que moldaram o padrão de distribuição geográfica da espécie ao longo do tempo de sua evolução (Avise, 2000), assim como inferir sobre o tempo de expansão de uma espécie, por meio de testes de neutralidade (e. g. Tajima, 1983; Fu, 1997). Tais desvios podem indicar quebras nos seus pressupostos, causados pela ação da seleção ou de fortes mudanças demográficas (expansões ou reduções) no

passado; e apresentar padrões característicos para eventos de expansão recente (e.g. baixa divergência genética; rede de haplótipos *starburst*, *star-like*; Avise, 2009).

Nesta abordagem de expansão de espécies, já foram realizados estudos para verificar se populações encontradas hoje podem representar populações que se encontravam em condições de refúgio em eras passadas (e.g. *Araucaria araucana*, Marchelli et al., 2010; *Oxyria sinensis*, Meng et al., 2015).

Araucaria angustifolia tem a sua rede de haplótipos definida em praticamente toda a sua região de ocorrência (Klabunde, 2012), e o seu padrão aparenta ser decorrente de uma expansão recente. Klabunde (2012) sugeriu que possíveis pontos de refúgio de eras passadas estariam entre Serra Geral, Aparados da Serra e a Serra do Rio do Rastro, coincidente com os registros de pólen (Behling, 1995; Behling, 1997), por estas apresentarem o haplótipo mais frequente. A partir dessa informação, foi possível evoluir na detecção dos refúgios glaciais e da interação da genética da espécie com os povos humanos, especificamente na região da ocorrência dos povos Jê do Sul.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi o de buscar evidências da interferência humana pré-Colombiana sobre a expansão da *Araucaria angustifolia*, a partir dos seus refúgios pleistocênicos por meio de uma abordagem genética, ecológica e filogeográfica.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Testar relações entre os dados paleoecológicos e arqueológicos existentes.

Determinar, calcular e comparar as velocidades de expansão e de dispersão da araucária sem e com o possível auxílio humano.

Identificar rotas de migração humana pré-Colombiana do grupo Jê do Sul na área de ocorrência da *A. angustifolia*.

Trazer evidências genéticas de possível(is) área(s) de refúgio.

Caracterizar geneticamente populações de *Araucaria angustifolia* existentes em potenciais refúgios (relictuais) e populações ao longo da sua distribuição (migração).

Avaliar se a espécie sofreu uma expansão mais acelerada do que a esperada ao acaso.

Verificar como é a divergência genética entre as populações e identificar possíveis agrupamentos (e. g. populações relictuais e de migração).

Avaliar se a divergência genética tem associação com a distância geográfica.

4. HIPÓTESES

A dispersão da *Araucaria angustifolia* se deu principalmente pela ação antrópica, seguindo a movimentação humana, existindo evidências ecológicas e genéticas ainda não exploradas.

A restrição da araucária em uma única área de refúgio e por um período de tempo prolongado gerou um grande efeito gargalo, resultando em uma baixa diversidade genética.

Regiões de vales encontrados nas serras do Sul do Brasil, estas apontadas em outros estudos como possíveis refúgios da espécie durante o Último Glacial Máximo, forneceram o material para a expansão da espécie.

O auxílio humano acelerou a dispersão e o crescimento populacional da araucária, não havendo tempo necessário para acumular divergências entre populações, e gerou desvios do que seria esperado ao acaso para os descritores genéticos.

Eventos de migração humana podem atingir desde curtas até longas distâncias. Por isso, não será encontrada associações entre a distância geográfica e a genética.

5. METODOLOGIA

5.1. ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM

A área de estudo foi a região sul do Brasil, nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná. Dentro dessa área, foram amostradas 20 populações, divididas em duas categorias:

- i) populações relictuais*: 11 populações de araucária que se encontram em ambientes que supostamente serviram de refúgios durante o Último Glacial Máximo (ver item 2.2.2. e Figura 5), partindo do pressuposto que estas mantenham o mesmo material genético dos seus antepassados.
- ii) populações de migração*: nove populações de araucária distribuídas ao oeste das populações relictuais, próximas à rotas de movimentação indígena (ver item 5.3.1.).

As populações foram coletadas sempre em fragmentos com área ≥ 50 ha e sem evidência de plantios recentes, distribuídas em um grid amostral de pontos de quatro linhas por cinco colunas (Figura 7; Tabela 1).

Foram coletadas acículas de 15 indivíduos com DAP > 30 cm por população, com localização geográfica registrada por GPS de navegação, e sempre espaçados entre si por, no mínimo, 50 m para evitar possível estrutura familiar.

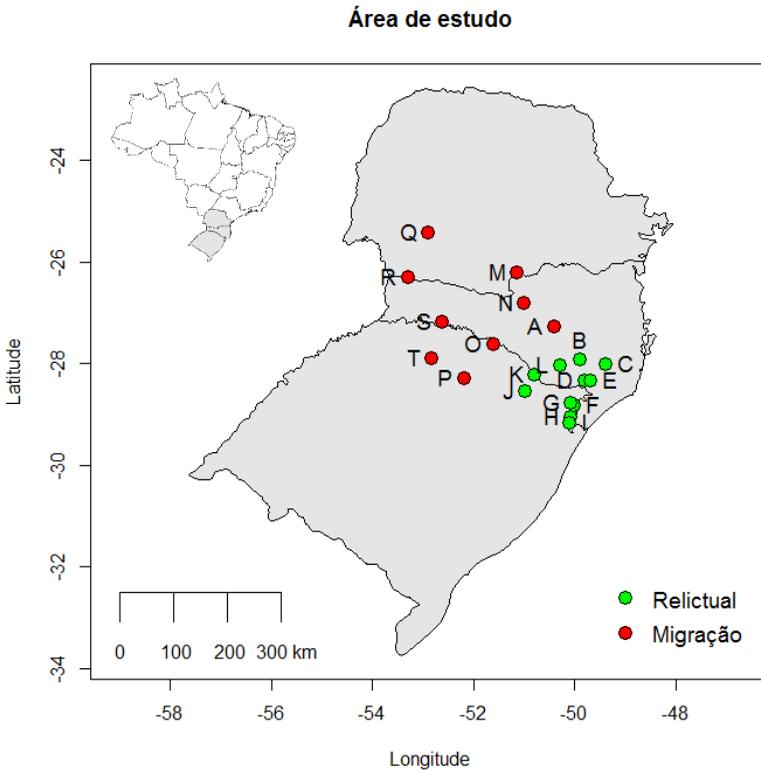


Figura 7. Área de estudo nos estados do Sul do Brasil (de cima para baixo: Paraná – PR, Santa Catarina – SC, Rio Grande do Sul – RS). Letras representam o nome da população. Pontos verdes representam populações relictuais, e pontos vermelhos representam populações de migração. Fonte: desenvolvido pelo autor.

5.2. AQUISIÇÃO DE DADOS GENÉTICOS

A caracterização genética foi feita a partir da identificação de haplótipos do DNA de cloroplasto (cpDNA) de cada indivíduo, por meio de marcadores universais específicos do cpDNA. Eles se ligam em regiões de genes conservados, flanqueando regiões intergênicas com maiores taxas relativas de mutação.

Tabela 1. Localidade e classificação das populações de *Araucaria angustifolia* amostradas. Fonte: desenvolvido pelo autor.

Pop.	Município	UF	Lat. (°)	Long. (°)	Classif.
A	São Cristóvão do Sul	SC	-27,27	-50,40	Migração
B	Urupema/Painel	SC	-27,92	-49,88	Relictual
C	Urubici	SC	-28,01	-49,37	Relictual
D	São Joaquim	SC	-28,34	-49,80	Relictual
E	Bom Jardim	SC	-28,33	-49,67	Relictual
F	São José dos Ausentes (L)	RS	-28,82	-49,99	Relictual
G	São José dos Ausentes (O)	RS	-28,78	-50,07	Relictual
H	Cambará do Sul (N)	RS	-29,05	-50,07	Relictual
I	Cambará do Sul (S)	RS	-29,16	-50,09	Relictual
J	Vacaria (S)	RS	-28,55	-50,97	Relictual
K	Vacaria (N)	RS	-28,21	-50,79	Relictual
L	Lages	SC	-28,05	-50,29	Relictual
M	União da Vitória	PR	-26,22	-51,13	Migração
N	Caçador	SC	-26,82	-50,99	Migração
O	Machadinho	RS	-27,62	-51,60	Migração
P	Mato Castelhano	RS	-28,29	-52,19	Migração
Q	Quedas do Iguaçu	PR	-25,43	-52,89	Migração
R	Palma Sola	SC	-26,31	-53,29	Migração
S	Chapecó	SC	-27,17	-52,61	Migração
T	Sarandi	RS	-27,91	-52,82	Migração

5.2.1. Extração de DNA

A extração do DNA total (nuclear + cloroplasto + mitocôndria) foi realizada para os 15 indivíduos coletados por população pelo método de Doyle e Doyle (1990), com pequenas modificações (protocolo no Anexo A). A qualidade do DNA extraído, mensurado pelas razões dos comprimentos de onda 260/230 nm ($\sim 2,0 - 2,2 =$ puro) e 260/280 nm ($\sim 1,8 - 2,0 =$ puro), e a sua concentração foram quantificadas com auxílio do espectrofotômetro NanoDrop 1000. O DNA dos 15 indivíduos foram diluídos a 5 ng/ μ l e seguiram para as próximas etapas.

5.2.2. Amplificação por PCR e purificação

A região de interesse do cpDNA foi amplificada por meio da técnica da *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Foram utilizados três iniciadores universais de cpDNA, desenvolvidos por Demesure et al. (1995): trnD-trnT (DT), psbC-trnS (CS) e trnS-trnfM (SfM). Estes iniciadores já foram testados e se apresentaram polimórficos para a *A. angustifolia* (Schlögl et al., 2007; Klabunde, 2012). As sequências, os

tamanhos esperados e a temperatura de anelamento utilizada estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Primers universais de cpDNA (Demesure et al. 1995) utilizados no presente estudo. TE: tamanho esperado em *Araucaria angustifolia*; TA: temperatura de anelamento utilizada. Fonte: desenvolvido pelo autor.

Primer	Sequência 5' - 3'	TE (pb)*	TA (°C)
trnD (F)	CTACCACTGAGTTAAAAGGG	1400	52,0
trnT (R)	ACCAATTGAACTACAATCCC		
psbC (F)	GGTTCGAATCCCTCTCTCTC	1500	58,0
trnS (R)	GGTCGTGACCAAGAAACCAC		
trnS (F)	CATAACCTTGAGGTCACGGG	1200	63,0
trnM (R)	GAGAGAGAGGGATTCTGAACC		

* de acordo com Klabunde (2012).

A reação de PCR constituiu-se de 0,2 mg/ml de *Bovine Serum Albumin* (BSA), 1X PCR Buffer, 2,0 mM de MgCl₂, 0,3 mM de dNTPs, 0,2 µM do iniciador forward (F), 0,2 µM do iniciador reverse (R), 1 unidade de Taq platinum polimerase e 5 ng de DNA, para um volume final de 20 µl. Os reagentes utilizados foram da marca Invitrogen™, e os ciclos utilizados para cada iniciador estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Temperaturas, ciclos e tempos (s) utilizados no estudo para os iniciadores universais DT, CS e SfM (Demesure et al., 1995). Fonte: desenvolvido pelo autor.

Etapa	T (°C)	Número de ciclos	Tempo (s)		
			DT	CS	SfM
Desnaturação inicial	95	1	180	180	180
Desnaturação	95		30	30	30
Anelamento	x	30	30	30	30
Extensão	72		240	120	150
Extensão final	72	1	900	900	900

O produto de PCR foi purificado com polietilenoglicol (PEG), visando a remoção de *primers* e dNTPs não incorporados na amplificação, que podem prejudicar a reação de sequenciamento.

5.2.3. Reação de sequenciamento, purificação e sequenciamento

Em seguida à amplificação por PCR e purificação por PEG, foi realizada a reação de sequenciamento do tipo Sanger (Sanger et al., 1977), envolvendo uma PCR com o kit de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 da Applied Biosystems. A PCR foi realizada separadamente para os iniciadores forward e reverse, com 1 µl do Ready Reaction Premix, 4 µl do tampão de sequenciamento, 3.2 pmol de primer (F ou R), e aproximadamente 40 ng do produto amplificado na primeira PCR, para um volume final de 20 µl. Os ciclos foram realizados de acordo com o manual do BigDye® (Applied Biosystems, 2002).

O produto dessa reação foi purificado para a remoção de *dyed* dNTPs (ddNTPs) não incorporados, de acordo com o protocolo de precipitação com etanol/EDTA/acetato de sódio contido no manual do BigDye® (Applied Biosystems, 2002), porém utilizando acetato de amônio 5 M ao invés de acetato de sódio 3 M. Após a purificação, foi realizado o sequenciamento no sequenciador ABI 3500xl, gerando os eletroferogramas das sequências.

5.2.4. Transformação em dados brutos

Os eletroferogramas foram analisados visualmente no programa Seq Scanner 2.0 para a conferência da qualidade, identificação de picos ambíguos e exportação das sequências no formato FASTA. As sequências geradas pelos iniciadores reverse foram transformadas em reverse-complement para ficarem no mesmo sentido das sequências forward, pelo programa Sequence Manipulation Suit (SMS; Stothard, 2000).

As sequências geradas pelos iniciadores forward e reverse, de cada iniciador e para cada indivíduo, foram então alinhadas no programa MEGA7 (Kumar et al., 2016) pela sua área de sobreposição comum e transformadas em uma única sequência contínua. Por fim, as sequências de cada primer foram unidas em uma única (Figura 8), tendo em vista que o cpDNA está ligado e é herdado de um único parente, podendo ser analisado como um único loco. Essas sequências serviram de base para as análises de dados subsequentes.

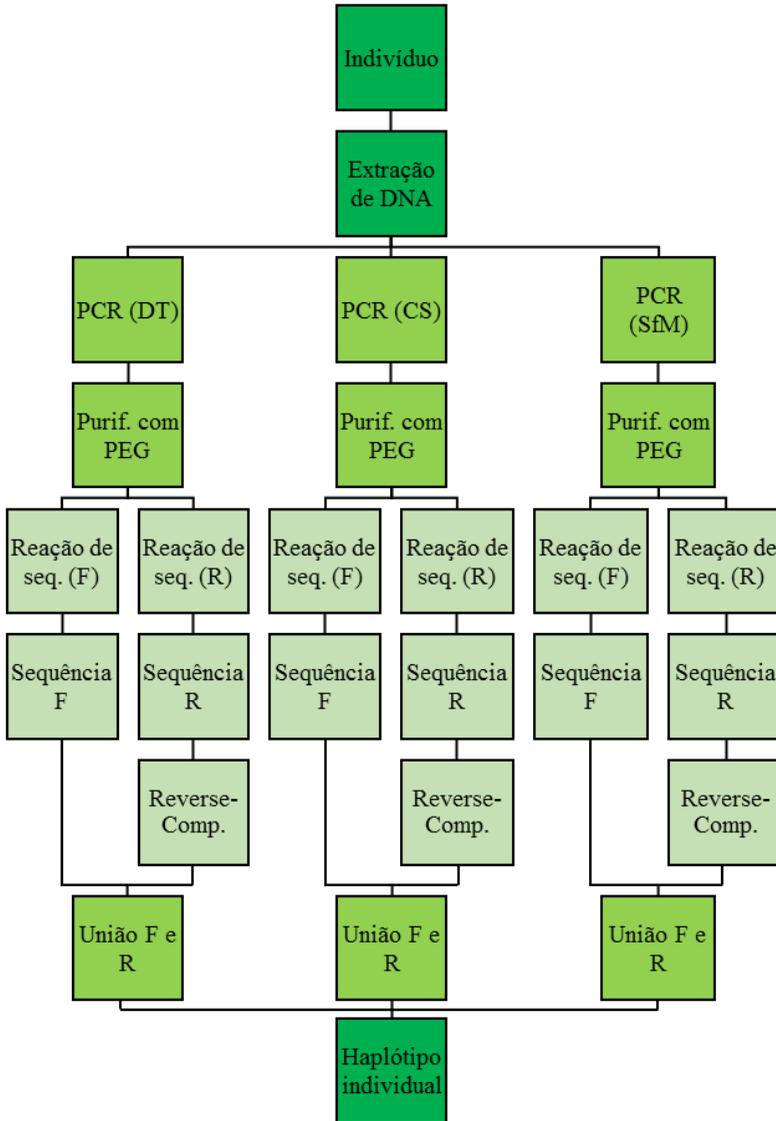


Figura 8. Fluxograma dos processos para a obtenção dos dados genéticos (haplótipos) individuais, a partir da união de três marcadores de cpDNA (DT, CS e SfM). Fonte: desenvolvido pelo autor.

5.3. ANÁLISE DE DADOS

5.3.1. Identificação de rotas de migração indígena

O estudo se delimitou nas ocupações do grupo linguístico Jê do Sul, que reúne os grupos étnicos Kaingang e Xokleng, de acordo com Noelli (2000) e Bittencourt e Krauspenhar (2006). Essa delimitação foi empregada por este grupo ter uma relação mais forte com a araucária, como apontado por Reis et al. (2014).

A identificação das rotas de migração foi realizada a partir de uma busca bibliográfica na área de arqueologia, que identificaram datas e posições de ocupações dos grupos Jê do Sul por evidências de cerâmica e de *pit houses*. Os estudos que contiveram o maior número dessas informações foram os de Noelli (2000), Iriarte e Behling (2007) e de Bittencourt e Krauspenhar (2006). As datas de ocupações utilizadas foram idênticas ao que constavam nestes artigos, sem nenhum tipo de calibração.

As posições das ocupações foram mapeadas de acordo com a sua datação, utilizando um intervalo temporal de 100 em 100 anos, considerada adequada devido aos desvios padrões associados às datações (média = 116 anos, mediana = 70 anos; Noelli, 2000; Iriarte e Behling, 2007). Se as ocupações forem consideradas cronologicamente, é possível se ter uma ideia de rotas de movimento e migração.

5.3.2. Relação entre ocupações e palinologia

Como demonstrado no item 2.2.2., as ocupações humanas (Figura 6) e a porcentagem de pólen (Figura 4) possuíram expansões recentes, praticamente contemporâneas. Para verificar alguma possível associação entre esses conjuntos de dados, foi realizada uma correlação de Spearman (descrita em Zar, 2010).

Para isso, foram criados intervalos temporais de 100 em 100 anos (e. g., 100 anos A.P. – 0 anos A.P.). Dentro de cada intervalo, foram contados os respectivos número de ocupações registradas na literatura (Noelli, 2000; Schmidt et al., 2010). A porcentagem de pólen foi calculada também dentro desses intervalos de tempo, a partir das sete regiões estudadas por Behling (1995; 1997) e Behling et al. (2001; 2004). Como a porcentagem de pólen máximo variou muito entre regiões (Figura 4; SBV \approx 1,5%; CdS \approx 40%), o uso do valor médio entre regiões seria enviesado a favor da região CS, já que possuía desproporcionalmente os maiores valores. Por isso, todos os valores observados foram

padronizados, dividindo-os pelo valor máximo da respectiva região antes do cálculo da média. O valor de pólen existente antes a primeira ocupação dos povos Jê do Sul (14000 – 2300 anos A.P.) foi calculado apenas uma vez e associado ao valor de zero ocupações, pois os valores antes desta data possuem pouca variação e inflariam o valor da correlação.

Além da correlação proposta acima, foram testadas correlações com atraso temporal de 100 e 200 anos para os dados de pólen. Levando em conta que a araucária leva, no mínimo, de 12 a 15 anos para se tornar reprodutiva (Thomas, 2013) e, normalmente, mais de 40 anos (Paludo et al., em preparação); persiste por longo tempo, por ser uma espécie pioneira longeva (Souza et al., 2008); e se mantém reprodutiva e produzindo pólen nas maiores classes diamétricas (Paludo et al., 2016b); a aplicação dos atrasos temporais fazem sentido ecológico.

5.3.3. Cálculo do tempo de expansão sem auxílio humano

5.3.3.1. Modelo

Para testar se a *Araucaria angustifolia* conseguiria atingir toda a sua distribuição máxima, foi realizada uma comparação entre a velocidade requerida (v_r) e a velocidade calculada (v_c). Caso a $v_r > v_c$, é um indicativo de que a espécie necessitou de um auxílio externo para a sua expansão.

5.3.3.2. Velocidade requerida (v_r)

A velocidade requerida (v_r) para a espécie atingir a sua distribuição máxima foi calculada de acordo com a equação a seguir:

$$v_r = D_r/t_d \quad (1)$$

Em que D_r : distância requerida (m) e t_d : tempo disponível (anos).

O t_d foi estabelecido em 14000 anos, já que a data do registro mais antigo de pólen da espécie foi de 14000 anos A.P. (Behling, 1995). A D_r foi estabelecida como a distância linear entre o ponto desse registro (Serra da Boa Vista, 665296 E, 6911455 S; Behling, 1995) e o ponto máximo da expansão, sendo esse o ponto mais curto da coluna do extremo Oeste do presente estudo (população S, Chapecó, 340407 E, 6993462 S), gerando uma distância de 335 km. Ainda, para contabilizar desvios ao redor do ponto de início, que poderia ser encontrado em uma área maior (Figura 5;

Barros et al., 2015), a distância foi reduzida para 300 km. Isso gerou uma v_r de 21 m.ano⁻¹.

5.3.3.3. Velocidade calculada (v_c)

A velocidade calculada (v_c) foi simplificada a partir de pressupostos, com a finalidade de possibilitar o cálculo. Os pressupostos tomados foram: dispersão em linha reta; ausência de barreiras ao fluxo de sementes; sobrevivência de 100%; produção ilimitada de sementes. Todos atuam no sentido a acelerar a velocidade. Muitos deles não foram inclusos no modelo por necessitarem de mais de uma equação, inter-relacionadas de uma maneira complexa e com a necessidade de um número de cálculos que cresceriam exponencialmente.

Portanto, o cálculo da velocidade calculada foi simplificado na seguinte equação:

$$v_c = D_{df} / t_g \quad (1)$$

Em que D_{df} : distância de dispersão de sementes pela fauna e t_g : tempo de geração.

A distância de dispersão de sementes pela fauna (D_{df}) utilizada foi de acordo com os estudos genéticos de Bittencourt e Sebbenn (2007) e Cristofolini (2013). Os autores utilizaram classes de distância distintas. Para a padronização, assumiu-se uma distribuição uniforme dentro de cada classe de distância, e os valores foram transformados em uma distribuição de frequência contínua, com intervalos de 1 m. Após isso, foi feita uma média ponderada entre esses estudos, gerando uma distribuição de probabilidade contínua (Figura 9).

O tempo de geração (t_g) foi determinado como o tempo necessário para um indivíduo recém germinado se tornar reprodutivo. Ele foi calculado com base em uma regressão logística (Equação 3; Paludo et al., 2016b), que associa o estágio reprodutivo e o tamanho do indivíduo (Paludo et al., 2016b), e em dados de incremento individuais de uma paisagem de campo, sem manejo humano, de altura e de DAP (Paludo et al., em preparação).

$$DAP = -(-7,48 + \ln((p^{-1} - 1)^{-1})) \cdot 0,31^{-1} \quad (3)$$

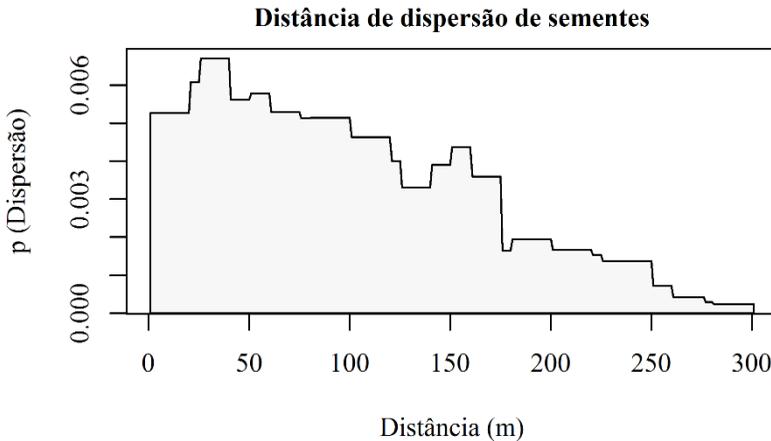


Figura 9. Distribuição contínua de probabilidade da distância de dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia*, com intervalos de 1 m. Fonte: adaptação (ver texto) dos dados de Bittencourt e Sebbenn (2007) e de Cristofolini (2013).

5.3.3.4. Cenários

Foram construídos dois cenários para esses cálculos:

a) *médio*: utilizando os valores médios obtidos na literatura, com intervalos de confiança construídos a partir de reamostragens bootstrap.

Os valores utilizados para D_{df} foram de 99 m (IC_{95%}: 91-106 m), e os valores utilizados para o t_g foram de 122 anos (IC_{95%}: 122-172 anos), correspondente aos valores médios de incremento em um ambiente de campo (incremento de altura = 4,4 cm.ano⁻¹ e incremento de DAP = 0,44 cm.ano⁻¹; Paludo et al., em preparo) e a um tamanho correspondente à probabilidade de 50% do indivíduo estar reprodutivo (Equação 3; DAP = 24,4 cm).

b) *extremo*: utilizando valores extremos reportados na literatura.

Os valores extremos encontrados para D_{df} foram de 297 m, os quais foram arredondados para 300 m. O t_g utilizado foi de 20 anos, correspondente ao valor de incremento que divide os 5% dos maiores valores em um ambiente de campo (incremento de altura = 8,5 cm.ano⁻¹ e incremento de DAP = 1,26 cm.ano⁻¹; Paludo et al., em preparo) e a um tamanho correspondente à probabilidade de 10% do indivíduo estar reprodutivo (Equação 3; DAP = 17,2 cm).

5.3.4. Caracterização genética

A caracterização e avaliação genética das populações foi realizada por meio de índices genéticos. A identificação dos haplótipos foi realizada com auxílio do programa DnaSP (Librado e Rozas, 2009). Foram analisados os índices de riqueza haplotípica (Hr), diversidade de haplótipos (Hd; Nei, 1987) e diversidade de nucleotídeos (π ; Nei, 1987) corrigida de acordo com o modelo evolucionar de Jukes-Cantor (1969; JC69), para os níveis populacionais e total, com auxílio do programa Arlequin ver 3.5 (Excoffier e Lischer 2010). A frequência dos haplótipos por população foi mapeada com o programa QGIS (QGIS Development Team 2016).

O modelo evolucionar escolhido para as análises foi o de JC69 por ser o mais simples e pela sequência analisada conter um loco SSR, podendo gerar estimativas tendenciosas em outros modelos. Os testes também foram realizados com outros modelos evolutivos, gerando mínimas diferenças nos resultados entre o JC69 e o modelo com melhor aderência aos dados (Tamura 3-parameter, T92; dados não mostrados).

Para descrever uma relação evolutiva entre os haplótipos, foi construída uma rede haplotípica da espécie para a região de estudo. A rede foi construída pelo algoritmo *Median Joining*, com auxílio do programa Network 5 (Bandelt et al., 1999). A definição do haplótipo ancestral foi realizada a partir das características da rede de haplótipos e da frequência haplotípica. Haplótipos ancestrais tendem ser dispersos com maior frequência e estarem localizados no centro da rede de haplótipos em eventos de expansões recentes a partir de uma única fonte geográfica (Avisé, 2009).

5.3.5. Divergência genética e identificação de grupos

A possível formação de grupos geneticamente e espacialmente distintos (k) entre as populações foi testada por inferência Bayesiana, com auxílio do programa BAPS 6.0, utilizando a análise de mistura de estrutura genética espacial, e k variando de 1 a 20 (Corander et al., 2008).

Para quantificar a divergência existente entre as populações, foi calculado o F_{ST} pelo estimador de Weir e Cockerham (1984), utilizando uma Análise Molecular da Variância (AMOVA), com auxílio do programa Arlequin (Excoffier e Lischer 2010). O F_{ST} par-a-par entre as populações também foi calculado.

Para testar se existe associação das distâncias geográficas (D) e da divergência genética (isolação por distância), foi utilizado o teste de Mantel (1967; descrito em Sokal e Rohlf, 1995). As distâncias utilizadas foram transformadas ($\ln(D) \sim [F_{ST}/(1-F_{ST})]$) de acordo com Rousset (1997), e foi utilizando o coeficiente de correlação de momentos de Pearson (Sokal e Rohlf, 1995), com auxílio do programa R (R Development Core Team, 2014).

5.3.6. Testes de neutralidade

Para testar desvios da neutralidade, foram empregados os testes D de Tajima (1989) e F_S de Fu (1997). Desvios da neutralidade podem ser causados por efeitos mudanças no tamanho efetivo (N_e) populacional, consequentes de gargalos populacionais ou de expansões recentes; e/ou de seleção, que podem ser desconsiderados pelo pressuposto dos marcadores utilizados serem neutros.

O teste D de Tajima possui um maior rigor, e é mais recomendado para testar gargalos populacionais, enquanto o F_S de Fu possui um maior poder, e é mais recomendado para testar expansões recentes (Ramírez-Soriano et al., 2008). Os testes foram realizados com auxílio do programa Arlequin (Excoffier e Lischer 2010).

6. RESULTADOS

6.1. ECOLÓGICOS E ARQUEOLÓGICOS

6.1.1. Palinologia, ocupação e movimentação humana

A cronologia das ocupações está mapeada na Figura 10, a partir de 2000 anos A.P. O surgimento de novos pontos indica a possível movimentação humana. A data do primeiro registro da tradição Jê do Sul ocorreu há 2180 anos A.P. (Figura 10a). As próximas ocupações ocorreram próximas às regiões de serra, apontadas como possível refúgio, até 1500 anos A.P. (Figura 10b, Figura 10c). Os movimentos até essa data foram predominantemente curtos, na direção N-S. De 1500 a 600 anos A.P., as ocupações passam a ser registradas mais distantes do ponto do primeiro registro, e se tornam mais intensificadas (Figura 10d, Figura 10e, Figura 10f), ocorrendo a expansão territorial e movimentos mais distantes, e predominantes na direção L-O. De 600 a 0 anos A.P., foram encontrados poucos pontos de ocupação novos, com intensificações em pontos já existentes (Figura 10g e Figura 10h).

A correlação de Spearman encontrada entre o número de registros de ocupações e a porcentagem de pólen foi de $\rho = 0,700$ ($n = 22$; $p < 0,001$; Figura 11a). Este valor se torna maior quando considera-se que o número de ocupações corresponde a porcentagem de pólen 100 anos ($\rho = 0,790$; $n = 21$; $p < 0,001$; Figura 11b) e 200 anos ($\rho = 0,804$; $n = 20$; $p < 0,001$; Figura 11c) após as ocupações (atraso temporal).

6.1.2. Cálculo do tempo de expansão sem auxílio humano

Como mencionado na metodologia, os valores utilizados foram:

a) cenário médio: D_{df} de 99 m ($IC_{95\%}$: 91-106 m), t_g de 122 anos ($IC_{95\%}$: 122-172 anos), incremento de altura = 4,4 cm.ano⁻¹ e incremento de DAP = 0,44 cm.ano⁻¹, com probabilidade de um indivíduo estar reprodutivo de 50% (Equação 3; DAP = 24,4 cm; Paludo et al., em preparo).

b) cenário extremo: D_{df} de 300 m, t_g de 20 anos, incremento de altura = 8,5 cm.ano⁻¹ e incremento de DAP = 1,26 cm.ano⁻¹ (Paludo et al., em preparo), com probabilidade de um indivíduo estar reprodutivo de 10% (Equação 3; DAP = 17,2 cm; Paludo et al., em preparo).

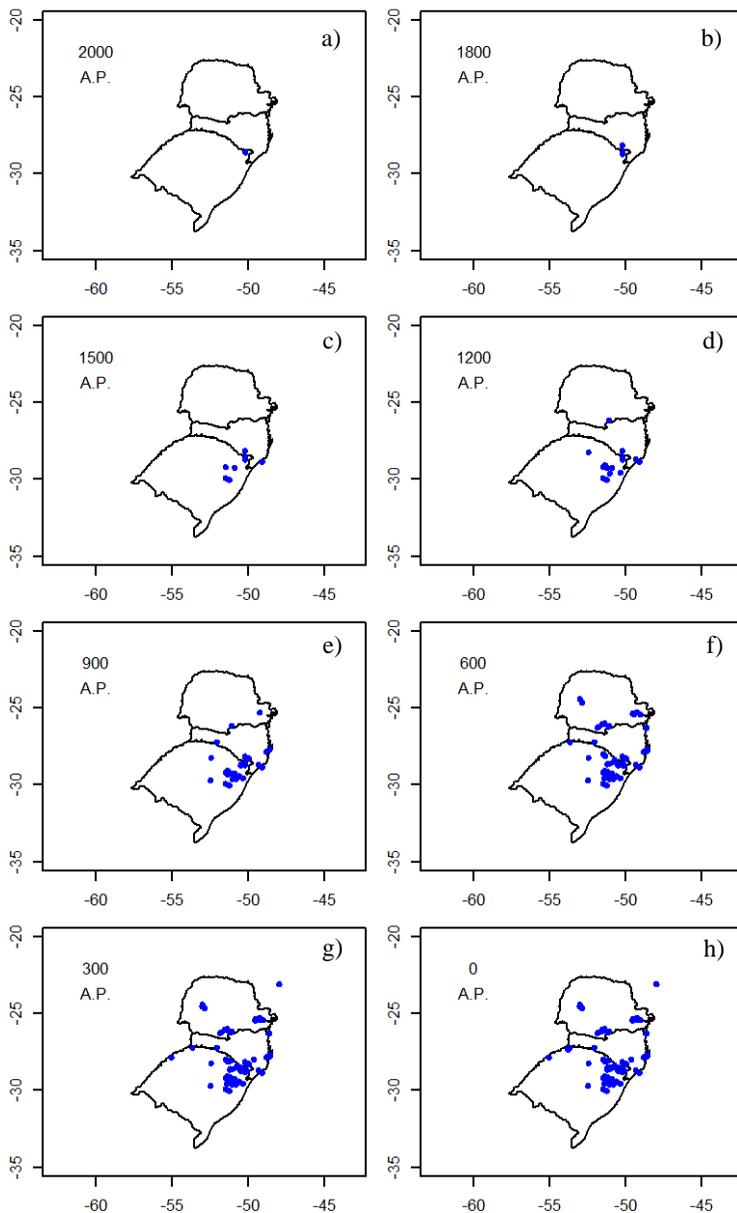


Figura 10. Registros de ocupações humanas da tradição Jê do Sul (pontos azuis) no Sul do Brasil. a) - h): Cronologia das ocupações. Fonte: desenvolvido pelo autor, a partir de dados de Noelli (2000) e Iriarte e Behling (2007).

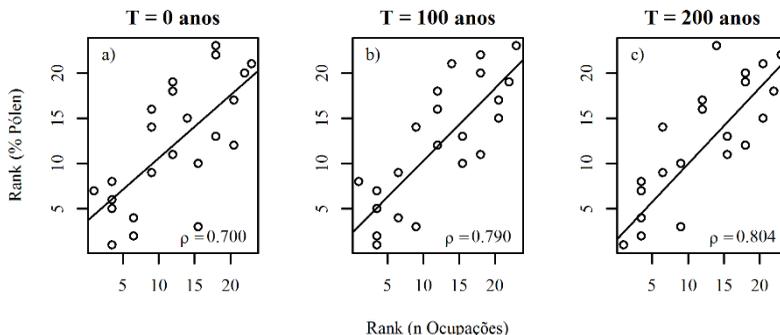


Figura 11. Correlações de Spearman (ρ) entre o número de ocupações e porcentagem de pólen registrados na literatura, a) sem atraso temporal; b) 100 anos de atraso temporal dos dados de pólen; c) 200 anos de atraso temporal dos dados de pólen. Fonte: desenvolvido pelo autor.

Portanto, as velocidades calculadas para o cenário médio e extremo foram de $0,69 \text{ m.ano}^{-1}$ ($\text{IC}_{95\%}$: $0,57\text{-}0,82 \text{ m.ano}^{-1}$) e de 15 m.ano^{-1} , respectivamente. Os dois cenários construídos encontraram velocidades inferiores a velocidade requerida de 21 m.ano^{-1} , sendo insuficientes para que a espécie se dispersasse por si só, por toda a sua área de ocorrência máxima, sem um auxílio externo.

Essas velocidades geram tempos necessários de 436367 anos ($\text{IC}_{95\%}$: 530120-363638 anos) e de 20000 anos, respectivamente para os cenários médio e extremo, enquanto o limite necessário para uma dispersão sem o auxílio humano seria de 14000 anos (primeiro registro de pólen). Porém, ressalta-se que o tempo da expansão significativa da araucária só ocorre a partir de 2000 anos A.P., data muito além da encontrada pelo cenário extremo.

6.2. GENÉTICOS

Foram analisados 297 indivíduos para o conjunto de três locos intergênicos de cpDNA (Tabela 4). O loco SfM identificou o maior número de haplótipos (nove) e a maior diversidade haplotípica ($Hd = 0,104$). O loco DT apresentou a maior diversidade de nucleotídeos ($\pi = 42,0 \cdot 10^{-5}$). O loco CS não apresentou polimorfismo.

O conjunto dos locos totalizou 3616 pares de base (pb) analisados (Anexo B), dos quais 10 sítios foram polimórficos, possibilitando a identificação de 12 haplótipos.

Os 12 haplótipos encontrados e seus respectivos passos mutacionais estão dispostos na Tabela 5. O haplótipo H1 foi identificado

na maioria dos indivíduos, com uma frequência relativa de 91,2%, seguido pelo H2 (2,0%) e pelo H5 (1,7%). Ocorreu um excesso de haplótipos raros (frequência inferior a 5%, H2-H12), onde cinco deles foram identificados como cópias únicas (*singletons*) na amostra (H3, H4, H8, H10 e H12), e seis foram exclusivos de uma única população (além dos cinco *singletons*, o H9). Os haplótipos H9, H10 e H11 estão associados à uma região de microssatélite composto (AT₈CT₁) no loco SfM.

Tabela 4. Descritores gerais de diversidade para os locos analisados. Fonte: desenvolvido pelo autor.

Parâmetro	Loco			
	DT	SfM	CS	Conjunto
n amostral	299	300	298	297
pb analisados	1185	981	1450	3616
Número de sítios polimórficos	3	7	0	10
Número de haplótipos	4	9	1	12
Diversidade de haplótipos (Hd)	0,072	0,104	-	0,167
Diversidade de nucleotídeos ($\pi \cdot 10^{-5}$)	42,0	9,0	-	6,1

A rede de haplótipos (Figura 12) apresentou um formato conhecido como “tipo estrela” (*starburst, star-like*), na qual todos os haplótipos, exceto o H9 (2 ind.) e o H12 (1 ind.), foram gerados por um único passo mutacional a partir do H1. O H1 pode ser considerado o haplótipo ancestral, por possuir maior frequência e originar quase todos os outros (Avice, 2009).

Eventos de crescimento populacional recente favorecem o surgimento de novos haplótipos derivados do ancestral, que ainda não tiveram tempo suficiente para entrar em equilíbrio (mutação-deriva genética) na população, e provavelmente serão removidos pelos efeitos da deriva genética. Para uma população evoluindo sob a teoria da neutralidade, seria esperado um menor número de haplótipos derivados do ancestral, com ramos mais longos (mais de um passo mutacional entre os haplótipos), e que novas mutações também surgissem a partir de haplótipos secundários (Hartl e Clark, 2007). Além disso, o formato de estrela é característico de populações que sofreram expansões recentes, rápidas e a partir de um único local (Avice, 2009). No caso de mais de uma área de refúgio, seria esperado um haplótipo de grande frequência que originasse outros a partir de si como o H1, por área de refúgio.

Tabela 5. Sequência dos haplótipos encontrados nos 297 indivíduos de *Araucaria angustifolia* e sua respectiva frequência. Fonte: desenvolvido pelo autor.

Haplótipo	Freq. Abs.	Freq. Rel. %	Sítios DT			Sítios SfM						
			126	634	1088	1387	1388	1546	1858	1860	1884	1892
H1	271	91.2	G	C	G	A	T	G	G	T	A	T
H2	6	2.0	T
H3	1	0.3	A
H4	1	0.3	.	.	T
H5	5	1.7	C	.
H6	3	1.0	.	A
H7	2	0.7	-
H8	1	0.3	T	.	.	.
H9	2	0.7	.	.	.	-	-	.	T	.	.	.
H10	1	0.3	.	.	.	-	-
H11	3	1.0	.	.	.	C
H12	1	0.3	T	A	.	-

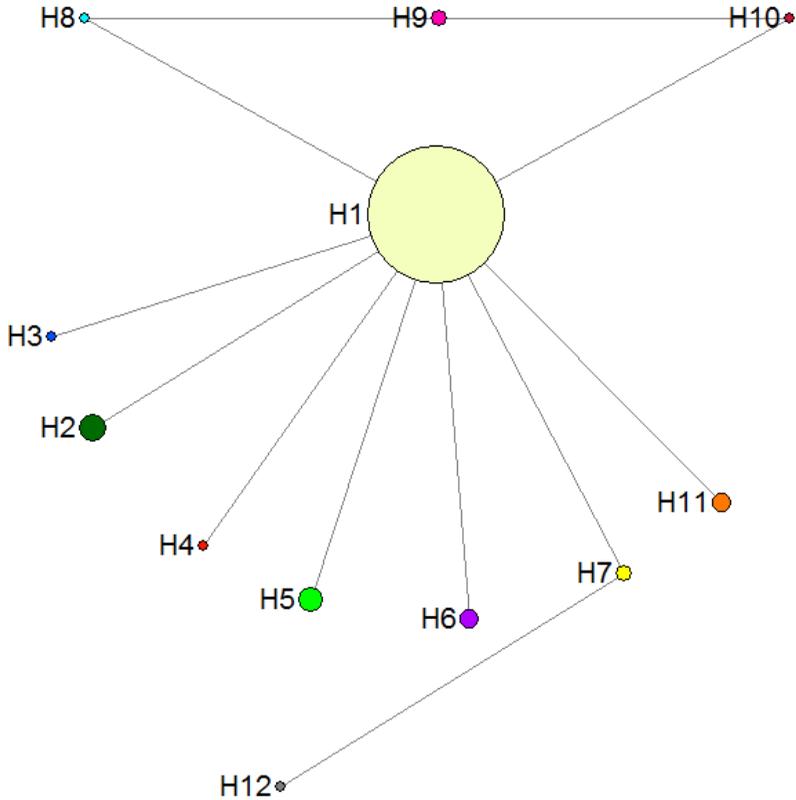


Figura 12. Rede de haplótipos de *Araucaria angustifolia*, gerada a partir das populações estudadas nos estados do Sul do Brasil (RS, SC e PR) com o método *Median Joining*. O tamanho de cada círculo é proporcional a frequência do haplótipo (H1 n = 271; H3 n = 1). Fonte: desenvolvido pelo autor.

O número de haplótipos por população variou de um a quatro, e todas apresentando o H1 (Tabela 6, Figura 13). Seis populações foram monomórficas (30%). O índice de diversidade haplotípica (H_d) variou de 0 a 0,467, e o de diversidade de nucleotídeos (π) variou de 0 a $11,1 \cdot 10^{-5}$ (Tabela 6).

Tabela 6. Índices de diversidade (Hr: riqueza haplotípica, Hd: diversidade haplotípica, π : diversidade nucleotídica) e seus respectivos desvios padrões (d. p.), e testes de neutralidade (D: D de Tajima (1989), F_S : F_S de Fu (1997)) e seus valores de p, para as 20 populações de *Araucaria angustifolia* estudadas. Valores em negrito destacam $p < 0,05$. Fonte: desenvolvido pelo autor.

Pop.	n	Hr	Hd	d.p.	π ($\cdot 10^{-5}$)	d.p. ($\cdot 10^{-5}$)	D	p	F_S	p
A	14	3	0,275	0,148	7,9	10,0	-1,48	0,06	-1,48	0,02
B	15	1	-	-	-	-	-	-	-	-
C	15	2	0,248	0,131	6,8	9,2	-0,40	0,30	0,13	0,28
D	15	3	0,257	0,142	7,4	9,6	-1,49	0,07	-1,55	0,01
E	15	1	-	-	-	-	-	-	-	-
F	15	3	0,257	0,142	7,4	9,6	-1,49	0,06	-1,55	0,02
G	15	2	0,248	0,131	6,8	9,2	-0,40	0,26	0,13	0,28
H	15	1	-	-	-	-	-	-	-	-
I	15	3	0,257	0,142	7,4	9,6	-1,49	0,07	-1,55	0,02
J	15	2	0,133	0,112	-	-	-	-	-0,65	0,09
K	15	2	0,133	0,112	3,7	6,5	-1,16	0,15	-0,65	0,11
L	15	1	-	-	-	-	-	-	-	-
M	15	4	0,467	0,148	9,7	11,3	-1,12	0,16	-0,25	0,39
N	15	2	0,248	0,131	6,8	9,2	-0,40	0,29	0,13	0,28
O	14	1	-	-	-	-	-	-	-	-
P	14	2	0,143	0,119	4,0	6,8	-1,16	0,14	-0,59	0,09
Q	15	2	0,133	0,112	3,7	6,5	-1,16	0,15	-0,65	0,10
R	15	1	-	-	-	-	-	-	-	-
S	15	3	0,257	0,142	11,1	12,2	-1,69	0,02	-0,31	0,26
T	15	3	0,257	0,142	3,7	6,5	-1,16	0,15	-1,55	0,02
Total	297	12	0,167	0,030	6,1	8,0	-1,84	0,00	-17,00	0,00

Frequência haplotípica por população

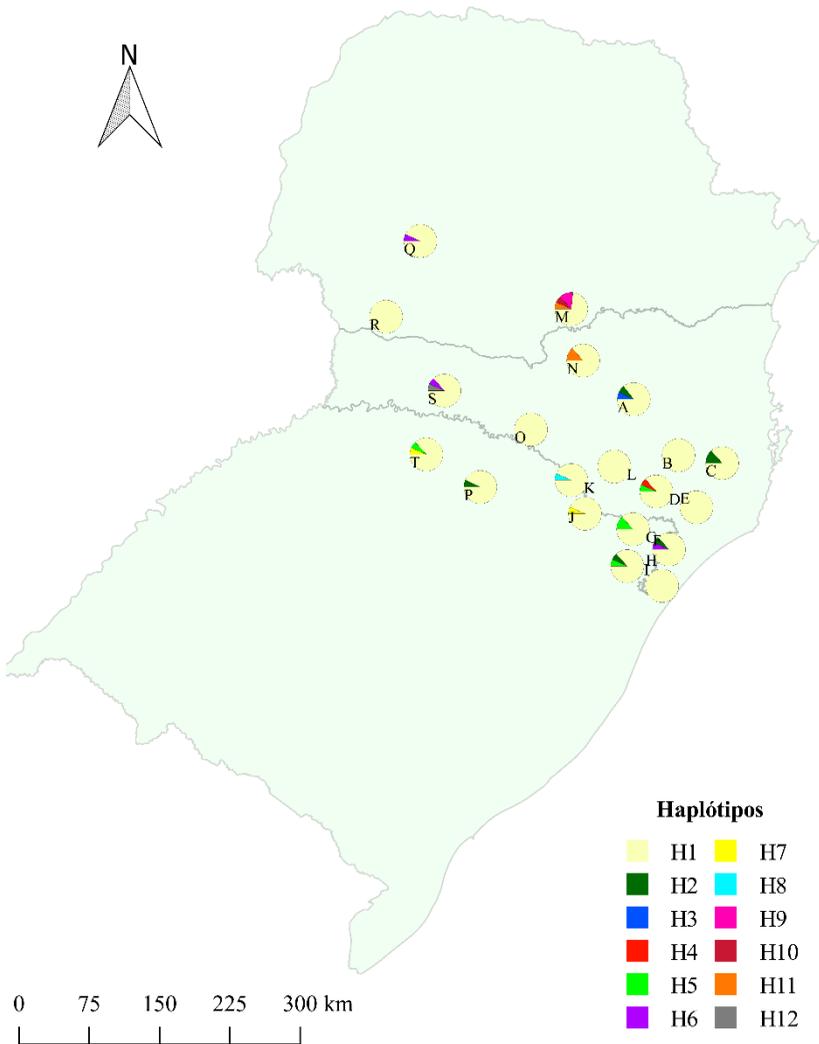


Figura 13. Mapa da localização geográfica das 20 populações de *Araucaria angustifolia* estudadas nos estados do Sul do Brasil (PR, SC e RS) e a frequência de seus respectivos haplótipos. Fonte: desenvolvido pelo autor.

A população como um todo apresentou um valor de D de Tajima de -1,84 ($p < 0,001$), indicando um desvio da neutralidade (Tabela 6). Dentro das 14 populações nas quais o cálculo foi possível por questão de polimorfismo, todas apresentaram valores negativos para o D de Tajima, porém o valor só foi significativo para a população S, indicando uma tendência geral de desvios da neutralidade.

O valor do F_S de F_u para a população como um todo foi de -17,00 ($p < 0,001$), em concordância com os valores de D de Tajima (Tabela 6). Para as 14 populações calculadas, 11 apresentaram valores negativos, dos quais cinco foram significativos ($p < 0,05$), e três apresentaram valores positivos (n. s.), também indicando tendências de desvio da neutralidade. Todas as populações com valores positivos (C, G e N) se encontram próximas à vales dentro de regiões de serras, onde duas delas (C e G) foram classificadas como populações relictuais, localizadas em potenciais refúgios.

A Análise Molecular da Variância (AMOVA, Tabela 7) detectou um $F_{ST} = 0,041$ ($p < 0,01$), indicando que apenas 4% da variação encontrada está entre as populações, e 96% dentro das populações. Não houveram divergências significativas entre as populações analisadas pelo F_{ST} par-a-par (Anexo C). Isso é um indicativo de fluxo gênico intenso e da ausência de barreiras físicas, o que não seria esperado para uma espécie de dispersão relativamente limitada.

Tabela 7. Análise Molecular da Variância (AMOVA) para as populações estudadas de *Araucaria angustifolia*. Fonte: desenvolvido pelo autor.

Fonte de variação	G.L.	Soma de quadrados	Componentes da variância		% de variação
Entre populações	19	3,276	0,0045	Va	4,09
Dentro de populações	277	2,252	0,1056	Vb	95,91
Total	296	32,529	0,1101		$F_{ST}: 0,0409$

Não houve correlação entre a distância geográfica (ln) e a distância genética ($F_{ST}/(1-F_{ST})$; $r = 0,068$, $p = 0,246$; ou qualquer outro tipo de distância geográfica-genética, dados não apresentados) entre as populações estudadas. Para a araucária, pelos motivos de dispersão relativamente limitada, poderia ser esperada um isolamento genético por distância, com uma correlação significativa.

A análise Bayesiana da estrutura genética identificou apenas um grande grupo ($k = 1$), reforçando a baixa divergência encontrada entre populações.

7. DISCUSSÃO

7.1. MOVIMENTOS HUMANOS

A primeira ocupação da tradição Jê do Sul ocorre justamente na região indicada como refúgio da *Araucaria angustifolia*, podendo ser o ponto da “descoberta” da espécie. As ocupações permaneceram em áreas próximas até 1500 anos A.P. (Figura 10a, Figura 10b e Figura 10c). Após este período, ocorreu um pico de intensidade de registros de ocupações, chegando no extremo Oeste dos três estados em praticamente menos de 1000 anos (600 anos A.P.; Figura 10d, Figura 10e e Figura 10f). A redução de registro subsequente pode estar relacionada com a chegada dos europeus, que reduziram as populações nativas por meio de guerras e doenças (Noelli, 2000).

O valor de correlação encontrado entre o número de registros e da porcentagem de pólen pode ser considerado alto, com picos de intensidades das ocupações (Figura 6) e de pólen (Figura 4) ocorrendo praticamente no mesmo período de tempo, próximos ao intervalo de 1500 a 600 anos A.P. Cerca de 1000 anos A.P., as intensificações dos dados de pólen foram contínuas, podendo substituir a paisagem de campo em um intervalo de 100 anos (Iriarte e Behling, 2007), incompatível com o ciclo de vida da espécie e um processo de regeneração “natural” (ver item 6.1.2. e 7.2.). Ainda, antes da ocupação humana da tradição linguística Jê do Sul nessa região, a araucária mostra fracos sinais de expansão, ou até mesmo insignificantes. Esses dados servem como mais uma evidência do auxílio humano, a partir dos povos do grupo Jê, na dispersão da araucária.

7.2. CÁLCULO DO TEMPO DE EXPANSÃO SEM AUXÍLIO HUMANO

Os valores médios de incremento utilizados foram baixos quando comparados com a literatura existente, que encontraram incrementos de DAP de 0,22, 0,27, 0,40, 1,09, 1,55 e 1,66 cm.ano⁻¹ (os últimos dois valores correspondem a uma situação de plantio, com uma intervenção humana intensiva; Mattos et al., 2007; Hess et al., 2009; Zanon e Finger, 2010), com média de 0,87 cm.ano⁻¹ entre eles. Já o valor extremo utilizado (1,26 cm.ano⁻¹) está acima da média reportada pela literatura. Esses valores de incremento correspondem ao clima atual, e poderiam ser inferiores em condições mais frias e secas. Mesmo com o UGM se encerrando cerca de 14500 anos A.P. no Hemisfério Sul (Clark et al.,

2009), as condições climáticas mais úmidas só ocorreram cerca de 4000-3000 anos A.P. (Behling, 1995).

Para a distância de dispersão de sementes, podem existir distâncias maiores do que os 291 m observado nos estudos genéticos (Bittencourt e Sebbenn, 2007), devido à limitação do tamanho da área estudada e ao fluxo gênico críptico de sementes. Porém, a distância média foi de aproximadamente 100 m, e a grande maioria ocorre antes dos 200 m de distância (Figura 9). Ainda, Schüssler (2014) detectou distâncias de remoção médias de aproximadamente 4 m, e máxima de 32 m, juntamente com uma alta taxa de predação, utilizando sementes amarradas à linhas e carretéis no nível do solo. Portanto, um valor de 300 m de distância de dispersão pode ser considerado um bom extremo. Existe também a possibilidade da dispersão de sementes ter ocorrido com auxílio da megafauna existente do local, porém esta se extinguiu aproximadamente em 13000 - 11000 anos A.P (Martin e Steadman, 1995), enquanto o clima ainda era desfavorável para o crescimento populacional da araucária. Já grupos humanos, no caso da *Araucaria araucana*, poderiam transportar mais de 100 kg de sementes à longas distâncias, até 100 km (Reis et al., 2014).

O modelo em si assumiu pressupostos que não seriam encontrados naturalmente, e todos acelerando a velocidade de dispersão. A produtividade média de pinhas por matriz encontrada foi de 17,4, variando de 0 a 232, com um número médio de pinhões férteis de 83,3 pinhões por pinha, gerando em média, 1450 pinhões por árvore (Zechini, 2012). Cada pinhão teria que sobreviver ao processo de predação, que pode atingir até 79,5% das sementes produzidas (Schüssler, 2014); ser disperso de acordo com um modelo radial, com distâncias de acordo com a Figura 9 e desconsiderando barreiras ao fluxo; e sobreviver para atingir a fase reprodutiva. Paludo et al. (2016a) encontraram taxas de mortalidade anuais de 0,795, 0,196, 0,064, 0,022 e 0,003, respectivamente para as classes plântula, juvenil 1, juvenil 2, imaturas e potencialmente reprodutivas em um ambiente de floresta em estágio secundário avançado, tornando muito raro o evento de uma planta recém germinada atingir a fase reprodutiva. Ou seja, a velocidade de dispersão poderia ser significativamente inferior.

Além disso, a velocidade requerida (vr) do modelo assume a expansão a partir de 14000 anos A.P., porém evidências palinológicas apontam para o início da expansão da espécie a partir de aproximadamente 2000-1500 anos A.P. (Figura 4).

Os valores médios de tempo foram muito superiores à 14000 anos, e mesmo valores encontrados em condições extremas não atingem esse

limite, reforçando a ideia que a araucária teve sua dispersão auxiliada por grupos humanos.

7.3. GENÉTICA

7.3.1. Amostragem e marcadores utilizados

A amostragem realizada ($n = 297$) pode ser considerada boa para a população como um todo. Para as subpopulações ($n = 14$ a 15), seria interessante um maior número de indivíduos. Uma maior amostragem permitiria maior precisão dos índices genéticos de diversidade (H_d e π), tendo em vista que seus desvios padrões foram altos, e também permitiria, possivelmente, um menor número de populações monomórficas do que foi encontrado (30%).

Dentro de uma população, encontrar um único indivíduo com um haplótipo diferente dos demais (e. g. pop. Q, Tabela 6) resulta em uma mudança no H_d de 0 para 0,133 (15% do valor máximo possível), e uma mudança no π de 0 para $6,5 \cdot 10^{-5}$. Essas mudanças afetam diretamente o cálculo dos estimadores F_S de F_u (afetado pelo H_d) e D de Tajima (afetado pelo π) dos testes de neutralidade. Amostras maiores poderiam aumentar a precisão dos mesmos, inclusive torna-los estatisticamente significativos, já que vários valores apresentaram tendências semelhantes, na mesma direção e $0,05 < p < 0,10$ (Tabela 6).

Para o cálculo da divergência genética entre as populações, o n amostral utilizado é ideal para detectar diferenças iguais ou maiores a 5% com boa precisão (Pons e Petit, 1995; Kalinowski, 2005). Como o valor encontrado foi de 4%, pode considerar-se que não haveria necessidade de aumento para melhorar a precisão desse parâmetro, mas a divergência encontrada pode estar sendo levemente superestimada.

Todavia, um n amostral maior dentro de cada população pode tornar o trabalho inviável financeiramente..

O conjunto dos três marcadores utilizados detectaram uma diversidade reduzida, causada por um efeito gargalo, supostamente em consequência do último período glacial. Porém, também apresentaram uma elevada riqueza e sinais de expansão populacional, que ocorreram após as melhorias climáticas. A escala temporal do marcador, em conjunto com o padrão de diversidade encontrado, aparentam ter sofrido pouca interferência dos desmatamentos recentes. Portanto, considera-se que os marcadores foram ideais para a escala temporal desejada.

7.3.2. Descritores de diversidade genética

Os índices genéticos encontrados no presente estudo foram muito inferiores ao encontrado em outras coníferas, como *Tsuga forrestii* ($Hd = 0,663$; $\pi = 0,00036$), *T. chinensis* (área Leste; $Hd = 0,790$; $\pi = 0,00091$), *T. chinensis* (área Oeste; $Hd = 0,880$; $\pi = 0,00077$; Cun e Wang, 2016), e *Podocarpus parloterei* ($Hd = 0,599$; $\pi = 0,00024$; Quiroga et al., 2012).

O valor de $Hd = 0,348$ encontrado para *Pinus bungeana* já foi considerado baixo em relação à outras coníferas (Yang et al., 2016). Para *P. sylvestris*, Sinclair et al. (1999) encontraram $Hd = 0,586$ na Espanha, e para a Escócia um valor semelhante ao encontrado no presente estudo, de $Hd = 0,120$, sugerindo diferentes pontos de refúgio para a espécie. Os refúgios próximos à Escócia podem ter perdido maior parte da diversidade por condições de sobrevivência mais restritivas. Para *Picea mariana*, Gamache et al. (2003) encontraram valores de $Hd = 0,19$, porém cinco populações extremas ao Norte possuíam haplótipos fixados, possivelmente sendo o último ponto de recolonização. Desconsiderando-as, o valor foi de $Hd = 0,58$. Em outro estudo de *P. mariana*, Gérardi et al. (2010) encontraram $Hd = 0,80$, e notaram uma redução da diversidade no sentido Leste-Oeste.

Os valores de π encontrados para essas outras coníferas foram de 3 a 12 vezes superiores ao encontrado para o conjunto de locos utilizados ($\pi = 0,000061$). Todavia, o loco DT encontrou a mesma magnitude de variação ($\pi = 0,00042$) dos demais estudos.

A diversidade haplotípica também foi bastante inferior. A redução da diversidade genética é causada por efeitos de seleção, desconsiderados para os marcadores utilizados, ou de deriva genética acentuada, como em efeitos gargalos (Futuyma, 2009). O efeito gargalo causado pelo UGM pode ter sido mais intenso para a *Araucaria angustifolia* em relação às outras coníferas, nas quais alguns autores apontam para mais de um ponto de refúgio. Já a araucária provavelmente ficou confinada uma única área de refúgio (Barros et al., 2015; ao entorno das áreas estudadas por Behling, 1995; 1997), o que reforçaria a baixa diversidade encontrada.

Ressalta-se que, além de característicos das espécies e da sua evolução, os diferentes índices encontrados nas coníferas podem ser em decorrência dos marcadores utilizados (mtDNA ou cpDNA); a variação do loco; e/ou abrangência do estudo (área amostrada, número de populações).

Também estudando a *Araucaria angustifolia* e utilizando os mesmos locos, porém em uma região mais ampla, Klabunde (2012)

obteve valores de $H_r = 16$ haplótipos, $\pi = 0,00068$ e de $H_d = 0,828$. Parte dessa diferença pode ser explicada por diversas questões amostrais, desde o critério de coleta dentro das populações, até o número de indivíduos, número de populações e abrangência do estudo. Desconsiderando o Grupo Norte, a riqueza haplotípica encontrada por Klabunde (2012) é semelhante ao presente estudo ($H_r = 12$ haplótipos), porém a diversidade permaneceria distinta. No seu estudo, foram encontradas muitas populações com mais de um haplótipo, e geralmente bem distribuídos, consequentes de suas respectivas frequências. A frequência haplótipo mais comum nesse estudo foi de 91%, e o segundo de 2%, enquanto para Klabunde (2012) foram respectivamente de 36% e de 15%, gerando índices de H_d elevados. Uma possível explicação para essa diferença seria o polimorfismo do loco CS, que foi responsável pela identificação do maior número de haplótipos para Klabunde (2012), e monomórfico no presente estudo.

7.3.3. Divergência genética

Os valores de divergência encontrados podem ser indicativos do fluxo gênico no passado, com valores baixos geralmente indicando alto fluxo, e valores altos indicando barreiras, limitação de fluxo e, geralmente, mais de um ponto de refúgio glacial. Isso ocorre porque populações em condição de refúgio geralmente mantêm um número de indivíduos reduzidos e geograficamente isolados das outras populações por um longo período de tempo, facilitando o acúmulo de divergências genéticas entre si pelo efeito da deriva (Avise, 2009). Eventualmente, as populações tornam-se fixadas para diferentes haplótipo (Avise et al., 2009; Yang et al., 2016).

A divergência encontrada para a *Araucaria angustifolia* ($F_{ST} = 0,041$) foi inferior ao encontrado para algumas coníferas de outros gêneros (Tabela 8), as quais geralmente tiveram mais de uma região de refúgio no UGM, e divergências associadas à distância geográfica. Além disso, a divergência da araucária foi o menor valor encontrado em comparação com toda a literatura consultada.

A média da divergência genética (G_{ST}) encontrada para 22 espécies arbóreas da Europa, não necessariamente coníferas, foi de $G_{ST} = 0,54$, com marcadores de cpDNA (Petit et al., 2003). Dentro dessas, as espécies *Fagus sylvatica* (faia, $G_{ST} = 0,74$), *Quercus* sp. (carvalhos, $G_{ST} = 0,84$) e *Corylus avellana* (avelã, $G_{ST} = 0,89$) possuem sementes com características semelhantes às da araucária, por serem comestíveis e estocadas pela fauna, e tiveram uma média de divergência superior ao

conjunto ($G_{ST} = 0,823$). Elas poderiam servir como uma certa base de comparação com a araucária, porém são espécies de outro continente (Europa), e que podem (ou não) ter interagido com grupos humanos de maneiras e em épocas distintas.

Tabela 8. Divergência genética encontrada para alguns estudos populacionais de outras coníferas em diferentes continentes. AmN: América do Norte; AmS: América do Sul; AS: Ásia; EU: Europa.

Espécie	Estimador	DNA	r Mantel	Local	Ref.	
<i>Abies balsamea</i>	F _{ST}	0,69	mtDNA	-	AmN	[1]
<i>Abies balsamea</i>	G _{ST}	0,48	mtDNA	-	AmN	[1]
<i>Abies balsamea</i>	F _{ST}	0,15	cpDNA	-	AmN	[1]
<i>Abies balsamea</i>	G _{ST}	0,10	cpDNA	-	AmN	[1]
<i>Picea abies</i>	F _{ST}	0,41	mtDNA	-	EU	[2]
<i>Picea mariana</i>	Θ _{ST}	0,53	mtDNA	0,748	AmN	[3]
<i>Pinus bungeana</i>	F _{ST}	0,55	ncDNA	-	AmS	[4]
<i>Pinus sylvestris</i>	F _{ST}	0,81	mtDNA	-	EU	[5]
<i>Pinus sylvestris</i>	F _{ST}	0,37	mtDNA	-	EU	[5]
<i>Podocarpus matudae</i>	N _{ST}	0,81	cpDNA	0,27	AmN	[6]
<i>Podocarpus parlatorei</i>	φ _{PT}	0,10	cpDNA	0,17	AmS	[7]
<i>Tsuga chinensis</i>	F _{ST}	0,23	cpDNA	-	AS	[8]
<i>Tsuga chinensis</i>	F _{ST}	0,97	mtDNA	-	AS	[8]
<i>Tsuga forrestii</i>	F _{ST}	0,12	cpDNA	-	AS	[8]
<i>Tsuga forrestii</i>	F _{ST}	0,70	mtDNA	-	AS	[8]
Média		0,47				

[1] Cinget et al. (2016); [2] Gugerli et al. (2001); [3] Gamache et al. (2003); [4] Yang et al. (2016); [5] Sinclair et al. (1999); [6] Ornelas et al. (2010); [7] Quiroga et al. (2012); [8] Cun e Wang (2016).

Dentro do gênero *Araucaria*, Gaudeul et al. (2014) estudaram a divergência genética de cinco espécies da Nova Caledônia: *A. scopulorum* ($N_{ST} = 0,293$), *A. rulei* ($N_{ST} = 0,108$), *A. biramulata* ($N_{ST} = 0,433$) e *A. montana/laubenfelsii* ($N_{ST} = 0,203$), com média de $N_{ST} = 0,259$. O valor tende a uma maior semelhança com o encontrado no presente estudo em relação às outras coníferas (Tabela 8), porém os autores apontam para mais de um refúgio para todas essas araucárias. Ressalta-se que nenhuma dessas possui um uso comestível.

Ainda dentro das araucárias, a *Araucaria araucana*, de ocorrência na América do Sul, apresentou os parâmetros genéticos mais semelhantes à *A. angustifolia*. Marchelli et al. (2010) encontraram uma baixa

divergência genética entre as populações ($G_{ST} = 0.110$), e sem correlação com distâncias ou estruturação geográfica. Ainda, sugerem a possibilidade de mais de um ponto de refúgio porque populações geograficamente distintas apresentaram constituições de frequência de haplótipos contrastantes e de maneira abrupta, o que também resulta em uma maior divergência genética. Ambas as araucárias possuem características ecológicas muito similares, e também existem evidências de usos da *A. araucana* por grupos humanos (Reis et al., 2014). Porém, o estudo genético (Marchelli et al., 2010) não levanta a hipótese da dispersão da espécie ter sido facilitada pelos grupos humanos.

Estudos de *A. angustifolia*, amostrando populações somente no estado de Santa Catarina e utilizando marcadores de isoenzimas, encontraram divergências de $F_{ST} = 0,044$ / $G_{ST} = 0,056$ ($n = 9$; Auler et al., 2002), e de $F_{ST} = 0,129$, não associado à distâncias geográficas, com uma amostragem mais intensa ($n = 31$; Reis et al., 2012). Estes valores estão de acordo com o encontrado no presente estudo, tendo em vista que as variações podem ser decorrentes dos diferentes locais amostrados e marcadores utilizados. O estudo de Reis et al. (2012) também não encontrou relações entre as distâncias genéticas e geográficas. Já estudos que utilizaram marcadores de cpDNA encontraram divergências de $G_{ST} = 0,28$ (Schlögl, 2007), provavelmente pelo maior número de marcadores utilizados, e de $F_{ST} = 0,269$ (Klabunde, 2012), com os mesmos marcadores do presente estudo. A principal diferença para o estudo de Klabunde (2012) talvez seja a inclusão do Grupo Norte na sua amostragem, já que a subdivisão em grupos gerou uma parcela significativa de divergência genética (25,17%), e os grupos Sul e Central possuem zonas similares e de mistura. Existe a possibilidade desse Grupo Norte ter sido disperso a partir de outro refúgio, possivelmente na Serra da Mantiqueira (Klabunde, 2012), em um ponto de coleta não incluído no presente estudo; ou ainda surgido de um evento fundador, a partir da expansão das populações do Sul, aumentando a divergência.

No presente estudo, não ocorreram conjuntos de populações com diferentes haplótipos fixados e que convergem ou se misturam em alguma região, como acontece quando uma espécie apresenta mais de um ponto de refúgio. Ainda, todas as populações apresentaram o haplótipo ancestral (H1) em grande frequência, com haplótipos derivados diretamente dele (H2-12) em baixa frequência. Isso reforça a ideia de um único refúgio para *A. angustifolia*.

A baixa divergência genética ($F_{ST} = 0,041$), em conjunto com a formação de um único grupo de populações ($k = 1$) pela análise Bayesiana, reforçam a ideia de que a expansão foi recente a partir desse

refúgio, não havendo tempo para divergências genéticas suficientes serem acumuladas.

7.3.4. Testes de neutralidade

A população de *Araucaria angustifolia* analisada como um todo ($n = 297$ ind.) apresentou valores negativos ($p < 0,001$) em ambos os testes de neutralidade (Tabela 6). Descarta-se a hipótese que o desvio encontrado se deve a seleção, pelo pressuposto da neutralidade dos marcadores, restando efeitos gargalos e/ou expansões populacionais recentes, em concordância com o encontrado pelo formato da rede de haplótipos (Figura 12).

Estudando outras coníferas, Yang et al. (2016) não encontraram desvios da neutralidade para *Pinus bungeana*, enquanto Cun e Wang (2016) encontraram que *Tsuga forrestii* e *T. chinensis* também sofreram expansões recentes, porém em ambos os casos, os autores não exploram esses resultados de maneira detalhada.

Para a araucária, Klabunde (2012) também encontrou valores negativos de D, porém apenas no Sul do Brasil, a única região com forte registro de ocorrência dos grupos Jê do Sul (Noelli, 2000), em concordância com o presente estudo.

Os maiores valores encontrados para o F_s (positivos, porém não diferentes de zero, $p > 0,05$) ocorreram nas populações C e G, estas apontadas como possíveis pontos de refúgio para a espécie (ver item 2.2.2.). O valor positivo encontrado na população N também ocorre em um possível refúgio (SCG; Behling, 1997), porém parte da diversidade encontrada, a qual influencia no cálculo do F_s , está associada a uma região SSR, e as ocupações dos grupos Jê do Sul próximas à essa região só começam cerca de 1400 anos A.P.

Os resultados de desvios da neutralidade, para a população como um todo e para cada população, indicam uma expansão populacional recente a partir de pouca variação deixada devido ao último glacial, em concordância com os estudos palinológicos.

7.3.5. Conjunto dos dados genéticos

Outros estudos de coníferas que não possuem um uso alimentício, podem servir como uma base neutra de expansão, por possuírem um ciclo de vida semelhante e pelo seu uso potencial não envolver uma necessidade humana básica. No geral, não foram encontrados padrões semelhantes aos da *Araucaria angustifolia* nos demais estudos

levantados. O que conteve maior semelhança foi o estudo da *A. araucana* (Marchelli et al., 2010), espécie que também com fortes indícios de uso por grupos humanos no passado.

Os índices encontrados no presente estudo, principalmente de uma diversidade genética relativamente baixa, sugere que a araucária sofreu um forte evento gargalo no passado, podendo ser associado ao UGM, o qual reduziu drasticamente o seu tamanho populacional e a confinou em áreas restritas, e provavelmente em um único refúgio. A partir desse, a expansão foi recente e acelerada, apresentando desvios da neutralidade. O tempo decorrente não possibilitou o acúmulo de divergências entre as populações, e/ou o fluxo gênico foi muito extenso, gerando uma baixa divergência entre as populações ($F_{ST} = 4\%$) e as classificando em apenas um grande grupo ($k = 1$).

Todas as informações genéticas, analisadas em conjunto, se fortalecem e apontam na mesma direção, estando de acordo com as outras evidências ecológicas, antropológicas e palinológicas de dispersão auxiliada pelos grupos humanos, não havendo eventuais contradições entre si.

7.4. MOVIMENTAÇÃO PELA GENÉTICA

Excluindo-se o H1 e conectando visualmente populações que possuem haplótipos comuns ou derivados (e. g. H7 gerou o H12), é possível ter uma certa ideia visual de movimentação genética (Figura 14). Ressalta-se que essa forma de análise é visual, fragilizada pela amostragem, e que os conectores de haplótipos não derivados podem atuar em ambos sentidos (ida e volta). Porém, existem os seguintes padrões: muitos dos conectores estão ligados à suposta região de refúgio, grande parte dos conectores N-S são curtos, próximos à região apontada como refúgio, enquanto os conectores L-O são longos, e um dos pontos extremos da ligação partem da região apontada como refúgio, mesmo havendo populações intermediárias e diferentes possibilidades. Existe certa semelhança visual entre os movimentos dos agrupamentos Jê do Sul ao longo do tempo com essa movimentação genética.

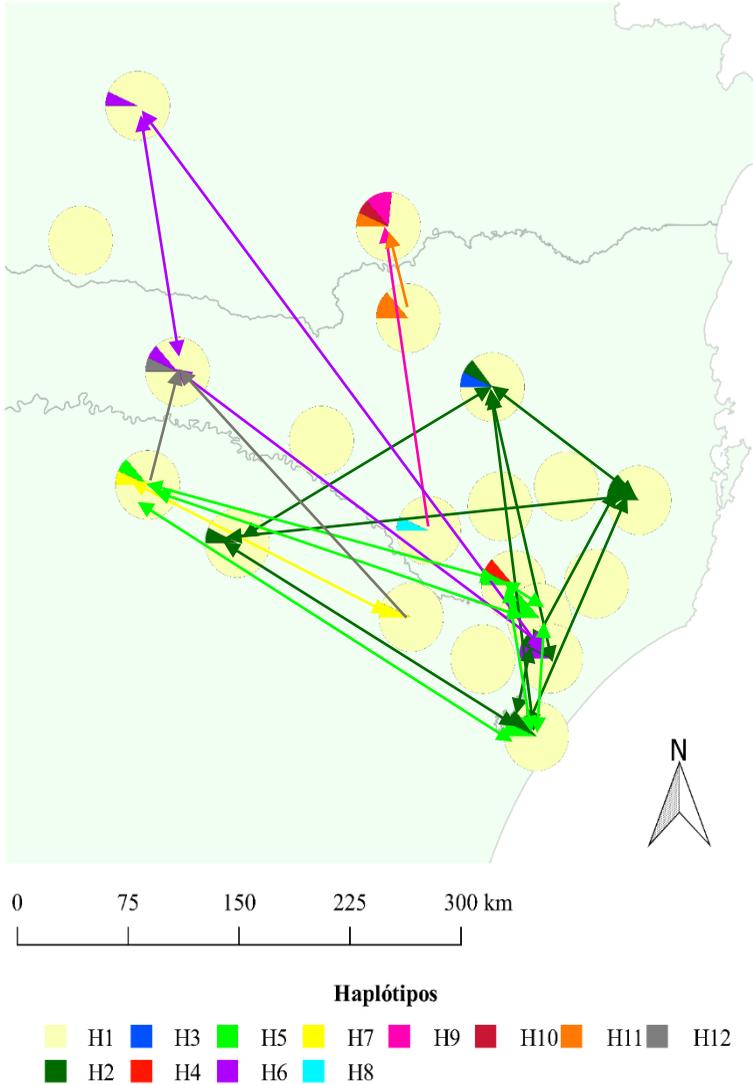


Figura 14. Setas ligando haplótipos comuns de *Araucaria angustifolia* entre as populações (exceto H1), indicando possíveis movimentações de dispersão da espécie. Fonte: desenvolvido pelo autor.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que *Araucaria angustifolia* teve sua dispersão auxiliada por grupos humanos (da tradição linguística Jê do Sul), responsáveis provavelmente pela maior parcela da distribuição máxima da espécie em eventos de dispersão mais distantes. Isso não exclui o efeito da dispersão da fauna em outras escalas. Esta espécie sofreu uma expansão recente e rápida, a partir de uma única região de refúgio, presente na região de serra no Sudeste do estado de Santa Catarina e Nordeste do Rio Grande do Sul, em concordância com dados palinológicos e de modelagem climática. Além disso, existe uma correlação temporal entre a expansão humana e da araucária, a qual não conseguiria atingir a sua área de distribuição máxima sem o auxílio humano, que movimentava sementes por longas distâncias.

Assim, os principais resultados deste trabalho reforçam a perspectiva de que as paisagens com araucária são paisagens culturais.

9. PERSPECTIVAS E IMPLICAÇÕES PARA O USO E A CONSERVAÇÃO

Como perspectivas, estudos semelhantes a este, com outras espécies simpátricas da *A. angustifolia*, preferencialmente gimnospermas, com tempos de geração semelhantes e sem fazer parte da alimentação base de humanos (e. g. *Podocarpus lambertii*) podem servir como um bom modelo nulo de dispersão sem interferência humana.

Os resultados encontrados no presente estudo fornecem subsídios que podem auxiliar no uso e na conservação da espécie.

A avaliação genética estabeleceu que a amostra não está em equilíbrio da neutralidade, e parte da riqueza haplotípica poderá ser “naturalmente” perdida pelos efeitos da deriva no passar das gerações (equilíbrio mutação-deriva genética), principalmente os haplótipos de cópia única, que surgiram devido a um evento de expansão extrema. Portanto, o valor de riqueza provindo desses haplótipos não precisa ser o foco de esforços de conservação.

Outro aspecto relevante foi que as populações são muito semelhantes entre si no nível genético do cpDNA, sendo que apenas 4% da variação é encontrada entre populações. Para a conservação, do ponto de vista desses marcadores genéticos, o local de escolha de populações possui pouco peso, já que não existiu uma população com constituição genética diferenciada.

Os elevados índices de fixação em outro estudo realizado para populações da espécie em Santa Catarina (Reis et al., 2012) também deve ser levado em conta nos esforços de conservação. Uma das implicações do presente estudo é que esse índice elevado pode ter sido decorrente do efeito fundador da dispersão recente e rápida da espécie, reforçado pela ideia de que esse índice é reduzido nas gerações seguintes, com um fluxo gênico e sistema de cruzamento efetivo (e. g. Ferreira et al., 2012). Porém, ainda não se pode descartar o efeito do desmatamento e a redução populacional recente, que pode ter influenciado nesse índice. Inclusive, um dos efeitos pode ter sido o favorecimento da germinação de sementes próximas à uma planta matriz.

Esses resultados demonstram que outros aspectos podem ser considerados mais interessantes do que a genética para escolha de áreas para a conservação. Como exemplo, esse trabalho identificou que a expansão da espécie, para a área estudada, se deu a partir de uma única região de refúgio, e muito provavelmente nas regiões de vales próximos à serras como sugerido por Behling (1995) e Barros et al. (2015), principalmente a Serra Geral. Áreas de refúgio são de interesse para a

conservação, já que possuem características locais que facilitam a sobrevivência em condições adversas (Keppel et al., 2012). No caso da araucária, essa região de refúgio forneceu um microclima mais úmido, e é uma área relevante para a conservação da espécie frente às novas mudanças climáticas. Ainda, essas regiões montanhosas já foram sugeridas como áreas prioritárias e de extrema importância para a conservação considerando outros aspectos, como fatores abióticos e a biodiversidade de fauna e flora existentes (Conservation International do Brasil, 2000).

Levando em conta todos os aspectos genéticos apresentados até aqui, a principal recomendação seria de esforços que atuassem na direção do aumento populacional da espécie. Isso pode ser atingido com a manutenção de indivíduos já existentes em áreas privadas, com o plantio para a produção de recursos, prática cultural realizada pelos grupos da tradição linguística Jê do Sul por longo tempo, ou com o uso da espécie em sistemas agroflorestais, que permitam a intervenção humana. No nível genético, propriedades privadas conseguem manter os mesmos parâmetros de riqueza e de diversidade existentes em unidades de conservação (Zechini, 2012; Zechini et al., em preparo).

Os benefícios genéticos de plantios de araucária seriam de aumentar o tamanho populacional da espécie, atuando na direção oposta da sua grande redução populacional no passado, que foi um dos principais critérios para classificá-la como criticamente em perigo de extinção (Thomas, 2013). O aumento populacional ainda facilita o fluxo gênico entre populações, aumentando a conectividade, auxiliando na redução do índice de fixação e reduzindo os efeitos negativos da deriva genética.

Para a coleta de sementes para os plantios, mesmo com as populações apresentando uma baixa divergência genética entre si ($\approx 5\%$) para marcadores neutros (presente estudo, Auler et al., 2002), é interessante que ela ocorra em áreas próximas ao local que será realizado o plantio, já que cada região pode ter adquirido características adaptativas específicas. Se forem tomados os devidos cuidados na coleta e escolha de sementes, é possível ainda maximizar a variabilidade genética da espécie, ou selecioná-la para avançarmos no processo de domesticação da araucária.

Do ponto de vista prático, o paradigma atual ainda é de afastar o ser humano do uso da araucária. O presente estudo trouxe um exemplo de que a forte dependência do uso da espécie, principalmente para a alimentação de maneira direta (pinhão) ou indireta (atrair fauna para caça), resultou na sua expansão. As práticas realizadas pelos grupos

humanos no passado foram a construção de uma paisagem cultural e, possivelmente, domesticada que, de maneira consciente ou inconsciente, resultaram no plantio de araucárias e um aumento na sua população, com os usos de alimentação, atrair fauna ou demarcar territórios. Isso demonstra que o uso de uma espécie pode ser extremamente benéfica para ambas as partes, evidências as quais já existiam em grande volume na literatura especializada, e ser uma estratégia complementar para a conservação. Entretanto, ressalta-se que o uso da espécie precisa ser na direção de aumentar/manter a sua população.

As áreas de proteção integral do SNUC não seriam as mais adequadas para a araucária, tendo em vista que a espécie apresenta dificuldades de regeneração em florestas secundárias em estágio avançado de sucessão e sem a intervenção humana (ver Paludo et al., 2016a), e que ela se favoreceu no passado graças à intervenção humana. Porém, essas unidades potencialmente servem como estratégia de conservação para outras espécies, fatores abióticos e/ou outros tipos de interações não levados em conta.

Uma excelente alternativa seriam incentivos às áreas de uso sustentável do SNUC, mas principalmente aos produtores que, de alguma forma, auxiliam na manutenção e aumento de populações de araucária. Esses incentivos poderiam ser estudos específicos de como realizar o manejo da araucária, criando um “pacote tecnológico” para a espécie, incentivos fiscais, ou inclusive de legalmente facilitar o seu uso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPLIED BIOSYSTEMS. 2002. **BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol**.
- AULER N. M. F., REIS, M. S., GUERRA M. P., NODARI R. O. 2002. The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: I. Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptive variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 25(3):329-338.
- AVISE J. C. 2000. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge: Harvard University Press, 447 p.
- AVISE J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, 36:3-15.
- AVISE J. C., ARNOLD J., BALL M., BERMINGHAM E., LAMBT T., NEIGEL J. E., REEB C. A., SAUNDERS N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 18:489-522.
- BANDELT H., FORSTER P., RÖHL A. 1999. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, 16(1):37-48.
- BARROS M. J. F., SILVA-ARIAS G. A., FREGONEZI J. N., TURCHETTO-ZOLET A. C., IGANCI J. R. V., DINIZ-FILHO J. A., FREITAS L. B. 2015. Environmental drivers of diversity in Subtropical Highland Grasslands. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**. 17:360-368.
- BEHLING H. 1995. Investigations into the Late Pleistocene and Holocene history of vegetation and climate in Santa Catarina (S Brazil). **Vegetation History and Archaeobotany**, 4:127-152.
- BEHLING H. 1997. Late Quaternary vegetation, climate and fire history of the Araucaria forest and campos region from Serra Campos Gerais, Paraná State (South Brazil). **Review of Palaeobotany and Palynology**, 97:109-121.

BEHLING H., BAUERMANN S. G., NEVES P. C. P. 2001. Holocene environmental changes in the São Francisco de Paula region, southern Brazil. **Journal of South American Earth Sciences**, 14:631-639.

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

BEHLING H., PILLAR V.D., BAUERMANN S.G. 2005. Late Quaternary grassland (Campos), gallery forest, fire and climate dynamics, studied by pollen, charcoal and multivariate analysis of the São Francisco de Assis core in western Rio Grande do Sul (southern Brazil). **Review of Palaeobotany and Palynology**, 133:235-248.

BITENCOURT A. L. V., KRAUSPENHAR P. M. 2006. Possible prehistoric anthropogenic effect on *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze expansion during the late Holocene. **Revista Brasileira de Paleontologia**, 9(1):109-116.

BITTENCOURT J. V. M., 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.

BITTENCOURT J. V. M., SEBBENN A. M. 2008. Pollen movement within a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. **Conservation Genetics**, 9:855-868.

BRASIL. **Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000.**

BRASIL. **Lei nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006.**

CARVALHO P. E. R. 2003. **Espécies arbóreas brasileiras. Volume 1.** Embrapa Florestas: Colombo.

CINGET B., GÉRARDI S., BEAULIEU J., BOUSQUET J. 2015. Less pollen-mediated gene flow for more signatures of glacial lineages:

congruent evidence from balsam fir cpDNA and mtDNA for multiple refugia in eastern and central North America. **PLoS ONE**, 10(4).

CLARK P. U., DYKE A. S., SHAKUN J. D., CARLSON A. E., CLARK J., WOHLFARTH B., MITROVICA J. X., HOSTETLER S. W., MCCABE A. M. 2009. The Last Glacial Maximum. **Science**, 325:710-714.

CLEMENT C. R. 1989. A center of crop genetic diversity in Western Amazonia. **BioScience**, 39(9):624-631.

CLEMENT C. R. 1999. 1492 and the loss of Amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. **Economic Botany**, 53(2):188-202.

CLEMENT C. R. 2010. Origin and domestication of native Amazonian crops. **Diversity**, 2:72-106.

CLEMENT C. R. 2014. Landscape domestication and archaeology. In: SMITH C. (ed.) **Encyclopedia of Global Archaeology**. 2014. Springer: New York, p.4388-4394.

CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 51, 5 de dezembro de 2014.**

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 278, de 24 de maio de 2001.**

CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL. 2000. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da mata atlântica e campos sulinos**. Brasília: MMA/SBF.

CORANDER J., SIRÉN J., ARJAS E. 2008. Bayesian Spatial Modelling of Genetic Population Structure. **Computational Statistics**, 23:111-129.

COSTA N. C. F. da. 2014. Estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo de pólen em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em pequenas populações remanescentes em paisagem de campo e plantios florestais. **Dissertação de Mestrado**, Universidade do Estado de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, 75 p.

CRISTOFOLINI C. 2013. Dinâmica da diversidade genética de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em paisagem de campo no estado de Santa Catarina. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 93 p.

CUN Y., WANG X. 2016. Phylogeography and evolution of three closely related species of *Tsuga* (hemlock) from subtropical eastern Asia: further insights into speciation of conifers. **Journal of Biogeography**, 42:315-327.

DEMESURE B., SODZI N., 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.

DOYLE J. J., DOYLE J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12(1):13-15.

DUARTE L. S., DOS-SANTOS M. M. G., HARTZ S. M., PILLAR V. D. 2006. Role of nurse plants in *Araucaria* Forest expansion over grassland in south Brazil. **Austral Ecology**, 31:520-528.

EXCOFFIER L., H.E. L. LISCHER H. E. L. 2010 Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, 10:564-567.

FERREIRA D. K., NAZARENO A. G., MANTOVANI A., BITTENCOURT R., SEBBENNN A. M., REIS M. S. 2012. Genetic analysis of 50-year old Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) plantations: implications for conservation planning. **Conservation Genetics**, 13(2):435-442.

FU Y. X. 1997 Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, 147:915-925.

FUTUYMA D. J. 2009. **Biologia Evolutiva**. 3ª ed. Ribeirão Preto: Funpec. 830 p.

GAMACHE I., JARAMILLO-CORREA J. P., PAYETTE S., BOUSQUET J. 2003. Diverging patterns of mitochondrial and nuclear DNA diversity in subarctic black spruce: imprint of a founder effect associated with postglacial colonization. **Molecular Ecology**, 12:891-901.

GAUDEL M. GARDNER M. F., THOMAS P., ENNOS R. A., HOLLINGSWORTH P. M. 2014. Evolutionary dynamics of emblematic *Araucaria* species (Araucariaceae) in New Caledonia: nuclear and chloroplast markers suggest recent diversification, introgression, and a tight link between genetics and geography within species. **Evolutionary Biology**, 14:171

GÉRARDI S., JARAMILLO-CORREA J. P., BEAULIEU J., BOUSQUET J. 2010. From glacial refugia to modern populations: new assemblages of organelle genomes generated by differential cytoplasmic gene flow in transcontinental black spruce. **Molecular Ecology**, 19:5265-5280.

GOLTE W. 1978. Die südandine und die südbrasilianische Araukarie. Ein ökologischer Vergleich. **Erdkunde**, 32:279-296.

GUGERLI F., SPERISEN C., BÜCHLER U., MAGNI F., GEBUREK T., JEANDROZ S., SENN J. 2001. Haplotype variation in a mitochondrial tandem repeat of Norway spruce (*Picea abies*) populations suggests a serious founder effect during postglacial re-colonization of the western Alps. **Molecular Ecology**, 10:1255-1263.

HARTL D. L., CLARK A. G. 2007. **Principles of population genetics**. 4th ed. Sinauer Associates: Sunderland.

HESS A. F., SCHNEIDER P. R., FINGER C. A. G. 2009. Crescimento em diâmetro de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em função da idade, em três regiões do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal** 19(1):7-22.

IBAMA. **Portaria nº 06-N, de 15 de janeiro de 1992.**

IRIARTE J., BEHLING H. 2007. The expansion of *Araucaria* forest in the southern Brazilian highlands during the last 4000 years and its

implications for the development of the Taquara/Itararé Tradition. **Environmental Archaeology**, 12(2):115-127.

JUKES T. H., CANTOR C. R. 1969. Evolution of protein molecules. In: MUNRO H. N. (ed.). **Mammalian Protein Metabolism**. New York: Academic Press, 1969, p. 21-32.

KALINOWSKI S. T. 2005. Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances? **Heredity**, 94:33-36.

KAUR D., BHATNAGAR S. P. 1984. Fertilization and formation of neo cytoplasm in *Agathis robusta*. *Phytomorphology*, 34:56-60. In: MOGENSEN H. L. 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. **American Journal of Botany**, 83(3):383-404.

KEPPEL G., VAN NIEL K. P., WARDELL-JOHNSON G. W., YATES C. J., BYRNE M., MUCINA L., SCHUT A. G. T., HOPPER S. D., FRANKLIN S. E. 2012. Refugia: identifying and understanding safe havens for biodiversity under climate change. **Global Ecology and Biogeography**, 21:393-404.

KLABUNDE G. K. 2012. Análise filogeográfica entre populações de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze em sua área de distribuição natural. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 69 p.

KUMAR S. STECHER G., TAMURA K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, 33:1870-1874.

LIBRADO P., ROZAS J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25:1451-1452.

MANTEL N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, 27(1):209-220.

MARCHELLI P., BAIER C., MENGEL C., ZIEGENHAGEN B., GALLO L. A. 2009. Biogeographic history of the threatened species *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch and implications for conservation:

a case study with organelle DNA markers. **Conservation Genetics**, 11:951-963.

MARTIN P. S., STEADMAN D. W. 1995. Prehistoric extinctions on islands and continents. In: MACPHEE R. D. E. (ed.). **Extinctions in near time: Causes, contexts and consequences**. New York: Springer Science Business Media New York, 1995, p. 17-55.

MATTOS P. P., SANTOS A. T., RIVERA H., OLIVEIRA Y. M. M., ROSOT M. A. D., GARRASTAZU M. C. 2007. Crescimento de *Araucaria angustifolia* na Reserva Florestal Embrapa/Epagri, Caçador, SC. **Pesquisa Floresta Brasileira**, 55:107-114.

MATTOS J. R. de. 1994. **O pinheiro brasileiro. Volume 1** (2^a ed.). Lages: Artes Gráficas Princesa, 225 p.

MEDINA-MACEDO L., SEBBENNN A. M., LACERDA A. E. B., RIBEIRO J. Z., SOCCOL C. R., BITTENCOURT J. V. M. 2015. High levels of genetic diversity through pollen flow of the coniferous *Araucaria angustifolia*: a landscape level study in Southern Brazil. **Tree Genetics and Genomes**, 11:814.

MENG L., CHEN G., LI Z., YANG Y., WANG Z., WANG L. Refugial isolation and range expansions drive the genetic structure of *Oxyria sinensis* (Polygonaceae) in the Himalaya-Hengduan Mountains. 2015. **Nature**, 5:10396.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Portaria n° 443, de 17 de dezembro de 2014**.

MOGENSEN H. L. 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. **American Journal of Botany**, 83(3):383-404.

MYERS N., MITTERMEIER R.A., MITTERMEIER C.G., FONSECA G.A.B., KENT J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403(1)853-858.

NEI M. 1987. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press.

NOELLI F. S. 2000. A ocupação humana na região Sul do Brasil: arqueologia, debates e perspectivas 1872-2000. **Revista USP**, 44:218-269.

ORNELAS J. F., RUIZ-SÁNCHEZ E. R., SOSA V. 2010. Phylogeography of *Podocarpus matudae* (Podocarpaceae): pre-Quaternary relicts in northern Mesoamerican cloud forests. **Journal of Biogeography**, 37:2384-2396.

OWENS J. N., CATALANO G. L., MORRIS S. J., AITKEN-CHRISTIE J. 1995. The reproductive biology of kauri (*Agathis australis*). II. Male gametes, fertilization, and cytoplasmic inheritance. **International Journal of Plant Sciences**, 156(4):404-416.

PAISE G., VIEIRA E. M. 2005. Produção de frutos e distribuição espacial de angiospermas com frutos zoocóricos em uma Floresta Ombrófila Mista no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Botânica**, 28:615-625.

PALUDO G. F., LAUTERJUNG M. B., MANTOVANI A., REIS M. S. 2016a. Inferring population trends of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) using a transition matrix model in an old-growth forest. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, 78(2):137-143.

PALUDO G. F., DUARTE R. I., BERNARDI A. P., MANTOVANI A., REIS M. S. 2016b. The size of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze entering into reproductive stages as a basis for seed management projects. **Revista Árvore (Online)**, 40:695-705.

PETIT R. J., AGUINAGALDE I., BEAULIEU J., BITTKAU C., BREWER S., CHEDDADI R., ENNOS R., FINESCHI S., GRIVET D., LASCOUX M., MOHANTY A., MÜLLER-STARCK G., DEMESURE-MUSCH B., PALME A., MARTÍN J. P., RENDELL S., VENDRAMIN G. G. 2003. Glacial Refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. **Science**, 300(6):1563-1565.

PONS O., PETIT R. J. 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity I. Haploid locus. **Theoretical and Applied Genetics**, 90:462-470.

QGIS Development Team. 2016. **QGIS Geographic Information System**. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://www.qgis.org/>

QUIROGA M. P., PACHECO S., MALIZIA L. R., PREMOLI A. C. 2012. Shrinking forests under warming: evidence of *Podocarpus parlatorei* (pino del cerro) from the subtropical Andes. **Journal of Heredity**, 103(5):682-691.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2014. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria.

RAMÍREZ-SORIANO A., RAMOS-ONSINS S. E., ROZAS J., CALAFELL F., NAVARRO A. 2008. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. **Genetics**, 179:555-567.

REIS M. S. dos, MANTOVANI A., SILVA J. Z. da, MARIOT A., BITTENCOURT R., NAZARENO A. G., FERREIRA D. K., STEINER F., MONTAGNA T., SILVA A. L. S. da, FERNANDES C. D., ALTRAK G., FIGUEREDO L. G. U. 2012. Distribuição da diversidade genética e conservação de espécies arbóreas em remanescentes florestais de Santa Catarina. In: VIBRANS A. C., SEVEGNANI L., GASPER A. L. de, LINGNER D. V. (eds.) 2012. **Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina. Volume 1. Diversidade e conservação dos remanescentes florestais**. Edifurb: Blumenau, p.143-169.

REIS M. S. dos, LADIO A., PERONI N. 2014. Landscapes with Araucaria in South America: evidence for a cultural dimension. **Ecology and Society**, 19(2):43.

REITZ R., KLEIN R. M. 1996. Araucariaceae. In: Reitz, R. (ed.). **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1966.

RIBEIRO M. C., METZGER J. P., MARTENSEN A. C., PONZONI J., 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.

ROOSEVELT A. C. 2013. The Amazon and the Anthropocene: 13,000 years of human influence in a tropical rainforest. **Anthropocene**, 4:69-82.

ROUSSET F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. **Genetics**, 145(4):1219-1298.

SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 74:5463-5467.

SCHLÖGL P. S., SOUZA A. P. de, NODARI R. O. 2007. PCR-RFLP analysis of non-coding regions of cpDNA in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Genetics and Molecular Biology**, 30(2):423-427.

SCHÜSSLER G. 2014. Conservação pelo uso da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze: análise de aspectos produtivos do pinhão e de interações com a fauna em diferentes fitorregiões do sul do Brasil. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 318 p.

SINCLAIR W. T., MORMAN J. D., ENNOS A. 1999. The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe: evidence from mitochondrial DNA variation. **Molecular Ecology**, 8:83-85.

SOKAL R. R., ROHLF F. J. 1995. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 3rd ed. W. H. Freeman and Company: New York.

SOUZA V. A., SEBBENNN A. M., HATTEMER H. H. ZIEHE M. 2005. Correlated mating in populations of a dioecious brazilian conifer, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Forest genetics**, 12(2):107-119.

SOUZA A. F., FORGIARINI C., LONGI S. J., BRENAC D. A. 2008. Regeneration patterns of a long-lived dominant conifer and the effects of logging in southern South America. **Acta Oecologica**, 34:221-232.

STEFENON V. M., GAILING O., FINKELDEY R. 2007. Genetic structure of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) populations in Brazil:

implications for the in situ conservation of genetic resources. **Plant Biology**, 9:516-525.

STOTHARD P. 2000. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. **Biotechniques** 28:1102-1104.

TAJIMA F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. **Genetics**, 105: 437-460.

THOMAS P. 2013. *Araucaria angustifolia*. In: **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2015.1. <www.iucnredlist.org>. Download em 17 de Junho de 2015.

VIBRANS A. C. L., SEVEGNANI L., UHLMANN A., SCHORN L. A., SOBRAL M. G., GASPER A. L., LINGNER D. V., BROGNI E., KLEMZ G., GODOY M. B., VERDI M. 2011. Structure of mixed ombrophyllous forests with *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) under external stress in Southern Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v.59, p.1371-1387.

VIBRANS A. C., MCROBERTS R. E., LINGNER D. V., NICOLETTI A. L., MOSER P. 2012. Extensão original e atual da cobertura florestal de Santa Catarina. In: VIBRANS A. C., SEVEGNANI L., GASPER A. L. de, LINGNER D. V. (eds.) 2012. **Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina. Volume 1. Diversidade e conservação dos remanescentes florestais**. Edifurb: Blumenau, p. 65-76.

WEIR B. S., COCKERHAM C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, 38(6):1358–1370.

YANG Y., WANG M., LIU Z., ZHU J., YAN M. 2016. Nucleotide polymorphism and phylogeographic history of an endangered conifer species *Pinus bungeana*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 64:89-96.

ZANON M. L. B., FINGER C. A. G. 2010. Relação de variáveis meteorológicas com o crescimento das árvores de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em povoamentos implantados. **Ciência Florestal**, 20(3):467-476.

ZAR J.H. 2010. **Biostatistical Analysis**, 5th edn. Prentice Hall: Upper Saddle River.

ZECHINI A. A. morfometria, produção, fenologia e diversidade genética: subsídios para conservação da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze e coleta sustentável do pinhão no planalto catarinense. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 193 p.

ZEDER M. A. 2006. Central questions in the domestication of plants and animals. **Evolutionary Anthropology**, 15(3):79-118.

ANEXO A – PROTOCOLO EXTRAÇÃO

- Preparar tubos com 5 ou 6 beads (as que grudam).
- Cortar bem de 3 a 4 acículas médias nos tubinhos com auxílio do funil.
- Ligar banho-maria entre 60 – 70 °C.
- Preparar na capela o CTAB 2% (solução de extração) + B-mercaptoetanol em becker avulso + peixinho. 1 ml de CTAB para 30 ul de mercapto. Calcular com base no número de amostras.
- Colocar 1 ml dessa solução por amostra.
- Macerar no Precellys 2x15 a 6000 rpm.
- Transferir para o isopor e colocar no banho-maria por 1 h, invertendo a cada 10 min. Preparar tubos para as próximas etapas enquanto isso.
- Retirar do banho-maria e remover beads com imã na capela. Adicionar 600 ul CIA 24:1 (usar Becker).
- Agitar por 5 minutos a 100 rpm no agitador, com borrachinha e papelão.
- Centrifugar, no máximo, a 12500 rpm (sem as beads!) por 7 minutos.
- Retirar sobrenadante (parte de cima) com pipeta e colocar em novo tubo de 2 ml. Jogar a tampinha e o tubo do precellys em um Becker com sabão.
- Adicionar ½ volume de Acetato de Potássio (5M) e 600 ul de CIA.
- Agitar por 3 minutos a 100 rpm.
- Deixar no freezer -20 °C por 30 minutos.
- Centrifugar a 12500 rpm por 5 minutos.
- Retirar sobrenadante e colocar em novo tubo de 2 ml.
- Adicionar 600 ul de CIA e agitar por 3 minutos a 100 rpm.
- Centrifugar a 12500 rpm por 5 minutos.
- Retirar sobrenadante e colocar em novo tubo de 2 ml.
- Adicionar 600 ul de CIA + 1 gota de CTAB 2%.
- Agitar por 3 minutos a 100 rpm e centrifugar a 12500 rpm por 5 minutos.
- Retirar sobrenadante e colocar em novo tubo de 1,5 ml.
- Adicionar 1 volume de isopropanol, inverter e deixar no -20 °C por 1 h (recomendado overnight).

- Centrifugar a 12500 rpm por 5 minutos.
- Retirar isopropanol (virando o tubo) e adicionar 500 ul de álcool 70%. Agitar por 3 minutos a 100 rpm.
- Centrifugar a 12500 rpm por 5 minutos.
- Retirar álcool 70% (virando o tubo), adicionar 500 ul de álcool 96% e Agitar por 3 minutos a 100 rpm.
- Centrifugar a 12500 rpm por 5 minutos.
- Retirar álcool 96% (virando o tubo) e deixar o tubo aberto em cima de papel toalha, de cabeça para baixo, por aproximadamente 30 minutos.
- Preparar TE (ou água ultra pura) + RNase, em proporção de 1 ml para 1 ul. Adicionar nos tubos 100 ul dessa solução.
- Deixar 1 h no banho seco à 37 °C.
- Guardar no freezer -20 °C.

Quantidades e reagentes por amostra (colocar sempre +10%):

CIA 24:1 - 2,4 ml

CTAB 2% - 1 ml

B-mercptoetanol - 30 ul

Tubos de 2 ml - 3

Tubos de 1,5 ml - 1

Acetato de potássio - aprox. 250 ul

Isopropanol – aprox. 700 ul

Álcool 70% - 500 ul

Álcool 96% - 500 ul

ANEXO B – SEQUÊNCIAS ANALISADAS

DT

AGTATATATGAATAACATATTGAGTCCACACAGAAATACACATATTGATAGATATCGATATAATCGGTTGTTCCA
 GAACCGATCTGTTCCGATCATATCAATTAGTTCACATTAACCCATAAATGAATATTTGATTGAGCTATTCCGATC
 TGGTCATAAAAAGGGCGACATCTGATCCCAATAATAGCATACACGTTCCATTTGTTGGACTTACGAAAAGAGT
 AAGATTATTTATTATTGAAATGATCAGATCACTGAACCCACGTTGGCTGTGAGAGGATCCCTTATCTCTAAAA
 ACCCATCCGTCACACTCAAAATGATCCAGCAGGGATTGTTACATCTGAGATAGAGATTTACATTTCCGATATTT
 TGTAAGACACATAACAGTTTTAGAAAGTTGTGCCTATCTGGTCTGTCCTATGCCAGCAAATATGGGATCAG
 GACCCTTTTATCGATTCTAACCCATCTAATAGCGTATGCAGTTTGTCTTTAATAATAAGCGTAAACATGGA
 TAGAAGGGGTATTTCCCTCAATATTTTTATCGTGGTTGAACCTTCTGTTCAATGGAACATATCGGATATACAA
 CAACGCCAAACTTGGGGCTGTGACAATTTCTATTAGTATCTATAACCAAACCTCTTTGGGTGGTGAATTTCA
 TTATTTTGTATAAAAAAATAAAATTTACGAACAATAACAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
 ATTAGTGAATTTTGTACTACTGTTGACAATTTTCATAGGGATTGATAAGATGATGATAGGCGGGCCCTATC
 GTCTAGTGGCCAGGACATCTCTTTCAAGAGGGCAACGGGGATTTCGACTTCCCTAGGACTTCCCTATGCTATGA
 AAGTCTTAGGATACGCATTGGGTATGCTAAAGACTTTCATTTCTGTCTGGGTGATGCCGAGTGGCTCA
 TGGGGGGGATTTGAAATCCGTTGGCAATATGCCGACGCTGGTTCAAAATCCAGCTCGACCAATATAAACATGA
 TCCATCCGTAATTTTATGCAATTTCTGACATTGGTAAAAGGTAATTAGTTATAGAACCCCGATATATCTAT
 ATCTATCTACATCTAGATATAGATGATTAGAAATATACAGAATAAGAACAAACAGTTACT

SM

GAGGATGATTCTGTCATTGAGAAATGGAATGACAGGTAAAGAAAAGTTACGGTCAACCCATAAATCTTCCTG
 CTCCTCCACTCTTCGATCGGATGCGGTAGCGGGATCGAACCCGATCTTCCCTGGCAAGAGAAATTTTAC
 CATTCAACCATACCCCGATTTGGCTGGCTTGGCATAAATATATATATATATCTTATAGCCATATATTTGATG
 AGATATATTTTATGAAATAACGAAATTTTCATGATTTTCATCATTGAAATAACCCCTCCCTGAGCATTTCATTG
 GTTCTTGGGACTGTCCGAAAGACCTTCCGAGCTATAATCCCTTCCGGGAGGGGGGAGAGAAATTTAACAA
 AAAGATCTAGAACATATCTAAGATATGAAAGAATTAAGGATACCTACTAAAAAGACTAATTCATCCATAATGA
 TACACCGGAAAATAAAAACTTTTGTCTACTTGGCAACCAACCAATTAGGAGAGGCAAGTGCGACAGTACACCA
 CTAGGAGAAATGAAATGCAATTAATGCAAAATACAGACGATTGGAAAGCAATAGTCAATGGTTGTATCTTAA
 GCTTCCAACAGATTCAATAGACTATACCATCTGATCCCTATCCGGTCAATTTATAATCAATTTGACTACGGATT
 @ATTGATCATAAAATTCATCGAGTTTAAAAACTTTTTTTTTTTCTATCCAATTTCTATTTGAGTGGGAGAGA
 AGGAAAGAGATTCTTATTTTTCCCATACATAATGAAATTTATTACAACATGTATATCTATGCATATGTAAG
 CATAGATATGACCTATGTTTATGTGATTGAATCTGCATCTATGTGCATATCATATGCATGGCTATGATCTAGCA
 TCTAGGCTCATTATTGAGCCGATGGTCAGGTATTATCAAAAAGGGTAAAAATAAAGTTGTCTCCGCCGGGAG
 AGATGGCC

CS

CTCGCTCGGCTATCTAGATCTAGATCTAGATAATAGATCTAGATAGCCAAGTATAGCTGAGCCACAAGGAAGGA
 TTCAGTTAGAAGGGTAATAGCGAAAGATCCCGCTATCCGCTGCCACCATGGGAAACGGAATTTCAATTTTTAA
 TTTTCATCCAGTTTCTCTGTTGTTAAATTAAGAGGAGTCAATGGAAAGGACAGGTTCAAAATACGATCAATCTCT
 TTCTCAAATCTGCTGACGCTGCACGAGCCCTTCTGCTATGCCACAAATGACTACGAAGAAGAAAAATCCTAG
 AACAAAATGAGAGGTTGGATAACCAACTTCGGGGGATACAAAATTCACCCGATTAATCTCGGTAGCTACACCAC
 CCACGGAGTTTAAAGAACCTAAAGGAGCATGATCATATATTCGGCGAACCGTCTTTGGCAAAGGCTGATG
 TCCTTTTTAGCTTACTCAGTTCTAAACCATTAAGGACCCCTTAATGGTTCTAACCGTGGGGACGGGAGATCCCAA
 AAACGCATTTGTTCCCTCCAAAGATGATTTCTCCAGTAGGAGAAGCATAAAGATATTTACCTAAACCCAGTAGG
 CCCTTGGGACAGCCACACTAGCTCCAAGACGTTGATCTCTAECTAGAAAAGTAAATGCTTGGCTTGGAGG
 CTCTGGGCCGATAGGCCATAGAATCTACTAGGATAAGCTGTATTGTTAAACCAAAACAAAACAAGCAGT
 AAACCAAGACAGAGAGCCCTAAACTATAGGACAAGTAAGCTTCTCCGACCATACAAACGGCGACGAG
 CCCATGCAAAAGGTTTTGTTAAGATGTGCCAGTACCACGAAGATACAAATGGAACCTAACCATACATGTCCT
 CCAATATATCTTCTAGATTGCTACGCTAACGATCCATCCCTCTCTCCAAAAGGGGACTTAAGTAAATAACCA
 AAAATAACACTTGGGTTAAGAGTTAAGTTCGTAATTTTTTTTACATCTCCACCCGGGAGCCCAAGTATCATAT
 ACACCGCCAAAATACAAAGCCTTGGACACTAGAAGAAAAGCACCAACACTGCAAGATAGATGAATACCCA
 AAATTTGGGTCATTTTGTCTTCTATCTTTCCATACATAACCAAAAATGGAAGAAATTTCTCCAAAGTTTCAGGTC
 CGATGAGTGCATGATAAACCCAAAGCCTAAAACCTGCAGAAAGAAATTAAGTGAAGTACTCCGGATACAAA
 GTATGGAAAAGTGTCCCAATTTCCACCAGGACCGACTTCCCACTTAGAGTGCTAGATGGGGAAGTAAAA
 TCAATCTTTGTCATACATAGGCTTTCCGGTACAAAATGAGCCACTTCAAAATAGTTTCTGCTCCGCCGAG
 ATACAATTAATCCGGCATGAGCCAGTGGACCCCAAGTAAT

ANEXO C – F_{ST} PAR-A-PAR ENTRE POPULAÇÕES

POP	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
A	-	0,270	0,757	0,667	0,252	0,847	0,288	0,225	0,856	0,505	0,360	0,225	0,063	0,342	0,991	0,991	0,468	0,288	0,901	0,667
B	0,005	-	0,477	0,991	0,991	0,991	0,505	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,072	0,450	0,991	0,486	0,991	0,991	0,991	0,991
C	-0,037	0,071	-	0,423	0,468	0,991	0,198	0,486	0,991	0,468	0,405	0,486	0,054	0,243	0,477	0,991	0,477	0,423	0,991	0,496
D	0,000	0,000	0,036	-	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,126	0,532	0,991	0,910	0,991	0,991	0,991	0,991
E	0,005	0,000	0,071	0,000	-	0,991	0,523	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,108	0,505	0,991	0,496	0,991	0,991	0,991	0,991
F	-0,036	0,000	-0,033	0,000	0,000	-	0,486	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,126	0,505	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991
G	0,035	0,071	0,071	-0,033	0,071	0,036	-	0,450	0,991	0,477	0,505	0,532	0,054	0,297	0,505	0,306	0,405	0,514	0,532	0,991
H	0,005	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,071	-	0,991	0,991	0,991	0,991	0,108	0,586	0,991	0,450	0,991	0,991	0,991	0,991
I	-0,036	0,000	-0,033	-0,034	0,000	-0,034	-0,033	0,000	-	0,991	0,991	0,991	0,081	0,477	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991
J	0,002	0,000	0,048	0,000	0,000	0,000	0,048	0,000	0,000	-	0,991	0,991	0,081	0,459	0,991	0,739	0,991	0,991	0,991	0,991
K	0,002	0,000	0,048	0,000	0,000	0,000	0,048	0,000	0,000	0,000	-	0,991	0,198	0,477	0,991	0,712	0,991	0,991	0,991	0,991
L	0,005	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	-	0,099	0,432	0,991	0,396	0,991	0,991	0,991	0,991
M	0,105	0,135	0,123	0,110	0,135	0,110	0,123	0,135	0,110	0,121	0,097	0,135	-	0,243	0,072	0,099	0,099	0,063	0,090	0,090
N	0,035	0,071	0,071	0,036	0,071	0,036	0,071	0,071	0,036	0,048	0,048	0,071	0,067	-	0,577	0,324	0,432	0,496	0,550	0,496
O	0,000	0,000	0,065	-0,005	0,000	-0,005	0,065	0,000	-0,005	-0,005	-0,005	0,000	0,127	0,065	-	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991
P	-0,050	0,005	-0,052	-0,001	0,005	-0,050	0,045	0,005	-0,050	0,000	0,000	0,005	0,115	0,045	0,000	-	0,775	0,450	0,991	0,847
Q	0,002	0,000	0,048	0,000	0,000	-0,047	0,048	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,121	0,048	-0,005	0,000	-	0,991	0,991	0,991
R	0,005	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,135	0,071	0,000	0,005	0,000	-	0,991	0,991
S	-0,025	0,000	-0,022	0,000	0,000	-0,047	0,024	0,000	-0,023	-0,027	0,000	0,000	0,093	0,024	-0,005	-0,031	-0,027	0,000	-	0,991
T	0,000	0,000	0,036	-0,034	0,000	0,000	-0,033	0,000	-0,034	-0,047	0,000	0,000	0,110	0,036	-0,005	-0,001	0,000	0,000	-0,023	-

Valores abaixo da diagonal principal representam o F_{ST} par-a-par entre as populações. Valores acima da diagonal principal representam o valor de p (todos n. s.).