



JOELMA APARECIDA RABELO DE PÁDUA

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Araucaria*
angustifolia (ARAUCARIACEAE) NO ESTADO
DE MINAS GERAIS**

LAVRAS – MG

2015

JOELMA APARECIDA RABELO DE PÁDUA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE
Araucaria angustifolia (ARAUCARIACEAE) NO ESTADO DE MINAS
GERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura e Genética Florestal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Dulcinéia de Carvalho

LAVRAS - MG

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pádua, Joelma Aparecida Rabelo de.

Diversidade e estrutura genética de populações naturais de
Araucaria angustifolia (Araucariaceae) no estado de Minas Gerais /
Joelma Aparecida Rabelo de Pádua. – Lavras: UFLA, 2015.

127 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientadora: Dulcinéia de Carvalho.

Bibliografia.

1. Pinheiro do Paraná. 2. Conservação Genética. 3. Serra da
Mantiqueira. 4. Marcadores Moleculares. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

JOELMA APARECIDA RABELO DE PÁDUA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE
Araucaria angustifolia (ARAUCARIACEAE) NO ESTADO DE MINAS
GERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura e Genética Florestal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 29 de junho de 2015.

Dra. Ana Carolina Maioli Campos Barbosa	UFLA
Dra. Juliana Vitória Messias Bittencourt	UTFPR
Dr. Luciano Medina Macedo	UTFPR
Dr. Murilo Malveira Brandão	UNIMONTES
Dra. Rosângela Alves Tristão Borém	UFLA

Dra. Dulcinéia de Carvalho
Orientadora

LAVRAS - MG

2015

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar, agradeço a DEUS por ter me dado a vida e a sabedoria necessária para chegar até aqui e ter colocado em meu caminho pessoas especiais que fizeram toda a diferença em minha caminhada.

Agradeço aos meus pais Pádua e Cida (*in memoriam*) pelos ensinamentos, valores éticos, honestidade. Os dois sempre me mostrando que o caminho certo a seguir pode ser o mais difícil e árduo, mas ainda continua sendo o certo. Meu pai sempre me acompanhando nos trabalhos de campo desde a graduação, dedicando seu tempo, seu esforço, sempre ao meu lado me aconselhando, dando apoio, “comprando” minhas ideias por mais difíceis que fossem, foram seis anos distantes fisicamente, mas nunca ausentes na vida um do outro, meu pai é meu herói, não existe palavra para expressar minha gratidão e meu amor.

Agradeço ao Dimas, pelo companheirismo, amor, carinho, pelas horas compartilhadas no laboratório, sempre ao meu lado, me ajudando nas extrações, me estimulando a sempre fazer o melhor, me apoiando em tudo, lhe amo e lhe sou grata eternamente.

Agradeço a minha orientadora Dulcinéia de Carvalho, por ter me aceitado em sua equipe em 2009, já se passaram seis anos, de muito aprendizado e amizade. Obrigada pela oportunidade, nesse período aprendi muito e me senti realizada por fazer o que amo.

Agradeço a Juliana Bittencourt e Luciano Medina pelo apoio no andamento das análises e acolhimento em Ponta Grossa, vocês são muito especiais, minha eterna gratidão.

Aos colegas de laboratório agradeço pela convivência, aprendi muito com vocês.

Ao amigo Murilo, minha eterna amizade e gratidão, amigo de todas as horas mesmo em Moc sempre prestativo e pronto a tirar minhas dúvidas, e me “ouvir” mesmo que por e-mail, amigo para a vida toda...

Às amigas queridas Ivete, Gabriela e Vivette muito obrigada pela amizade, momentos de risos, momentos de aflição, momentos de alegria compartilhados com amigas especiais.

Ao meu amigo querido Diego, que mesmo em algum lugar do Brasil estava presente, me fazendo rir absurdamente, horas intermináveis de bate-papo ao celular, você é especial demais.

Aos professores, em especial a Rosângela Borém e Ana Carolina, meu agradecimento pelo incentivo, confiança, amizade e ensinamentos.

Aos funcionários do DCF, obrigada pela convivência e auxílio nas atividades do dia a dia, destaque para a Chica, minha amiga, mãe, confidente, ouvinte, conselheira, você é especial e é parte de minha vida!

As minhas meninas Natália, Ana e Paula (ordem de chegada ao laboratório) obrigada por abraçarem minha causa pelas Araucarias, vocês me proporcionaram momentos maravilhosos, felizes e impagáveis, obrigada pela paciência, carinho e ensinamentos.

Aos amigos que me ajudaram no decorrer do projeto Araucaria, Selma Ribeiro (ICMbio Itamonte), Anderson, Carlinho, José Carlos, Ezequiel, José Pedro, Álvaro Pinheiro, Secretaria de Meio Ambiente de Extrema (MG), Lamartine, Tales Marcio (DCA), Elenir, sem a ajuda de vocês não seria possível realizar este projeto.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais pelo apoio. À CAPES, pela concessão da bolsa. Ao CNPq pelo financiamento do projeto.

“A gratidão é a memória do coração”: tenho em minha mente e coração todos os amigos, conhecidos que de alguma forma me ajudaram, admiraram

tiveram curiosidade em saber sobre o projeto Araucaria, saibam que são lembrados e sou agradecida pelas dicas, reconhecimento, ajuda, curiosidade. Tudo o que faço, faço com o coração, faço porque acredito, faço porque amo. Espero continuar trilhando meu caminho fazendo o que amo e cercada pelos que amo.

Obrigada, obrigada e obrigada!

RESUMO

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze é uma gimnosperma endêmica do Brasil de ampla ocorrência nas paisagens da Região Sul e de ocorrência limitada na Região Sudeste. Popularmente conhecida como pinheiro brasileiro, possui uma arquitetura peculiar, beleza e tamanho dos adultos fazendo das matas com *Araucaria* um ecossistema único. A parte Sul de Minas Gerais é parte do limite Norte de distribuição da espécie e informações genéticas de suas populações são importantes para a sua conservação, pois essas áreas podem conter genes adaptativos restritos a estes locais e que devem ser conservados em face da elevada destruição e fragmentação destas áreas. A espécie é considerada como ameaçada de extinção na Lista Oficial do IBAMA (Ministério do Meio Ambiente, 2008) e, em Minas Gerais foi classificada como vulnerável a extinção (COPAM 085/97). Este estudo teve o objetivo de quantificar os níveis de diversidade e a estrutura genética em populações remanescentes de *Araucaria angustifolia* localizadas na Serra da Mantiqueira, Sul do estado de Minas Gerais utilizando marcadores microssatélites (SSR). Os estudos da diversidade genética e estrutura genética foram realizados em 450 indivíduos distribuídos em nove populações de *A. angustifolia*. Oito primers SSR foram utilizados gerando um total de 65 alelos. Os dados genéticos apontam que as áreas remanescentes ainda retêm uma alta diversidade genética ($H_e = 0,77$). A AMOVA indicou que a maioria da diversidade genética (90%) ocorre dentro das populações. Não houve correlação significativa entre distância genética e geográfica ($r = 0,08939$ $p = 0,6749$). Não foi detectada endogamia ($f = -0,09$). A análise Bayesiana indicou que a diversidade genética foi distribuída em dois grupos genéticos ($k = 2$). Foi identificado gargalo genético em oito das populações amostradas. Barreiras de fluxo gênico foram detectadas, provavelmente, resultante do relevo acidentado da região. Observou-se estruturação genética em quatro das populações amostradas. A alta diversidade genética retida nas populações indica que ainda existe variabilidade genética na *A. angustifolia* nas áreas amostradas, entretanto, essa variabilidade será mantida se houver plantios ou condução da regeneração.

Palavras-chave: SSR. Pinheiro do Paraná. Conservação genética. Serra da Mantiqueira. Marcadores Moleculares.

ABSTRACT

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze is an endemic gymnosperm from Brazil, which is widespread in Southern landscapes, and restricted in the Southeast. It is popularly known as Brazilian pine, with a peculiar architecture, beauty and size of adult trees; making forests with *Araucaria* a unique ecosystem. The Southern Minas Gerais is part of the north boundary of the distribution of this tree species in Brazil, and genetic information related to its population is important for conservation, because these areas may contain adaptive genes restricted to these locations; which should be preserved due to high destruction and fragmentation of these ecosystems. This tree species is considered endangered on the Official List of IBAMA (Ministry of Environment, 2008), and it has been classified as vulnerable to extinction in Minas Gerais (COPAM 085/97). In this study, we aimed to quantify levels of diversity and genetic structure of remaining population of *Araucaria angustifolia* located in the Serra da Mantiqueira, Southern Minas Gerais, using microsatellite markers (SSR). Studies about genetic diversity and structure were performed on 450 individuals distributed in 9 different populations of *A. angustifolia*. Eight SSR primers were used to generate 65 alleles. The genetic data point out that the remaining areas retain a high genetic diversity so far ($H_e = 0.77$). The analysis of molecular variance indicated that the majority of genetic diversity, about 90%, occurs within populations. There was no significant correlation between genetic and geographic distances ($r = 0.08939$ $p = 0.6749$). The inbreeding was not detected ($f = -0.09$). The Bayesian analysis indicated that the genetic diversity was distributed in two genetic groups ($k = 2$). The genetic bottleneck was identified in eight of sampled populations. Gene flow barriers were detected, probably due to presence of mountains. The genetic structuring was found in four of sampled populations. The high genetic diversity retained in populations indicates that still existing genetic variability of *A. angustifolia* in sampled areas, therefore, this variability will be maintained if there is planting or regeneration management.

Key-words: SSR. Parana Pine. Conservation genetics. Mantiqueira Mountain Range. Molecular Markers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Indivíduo de <i>Araucaria angustifolia</i> monoico.....	20
Figura 2	<i>Araucaria angustifolia</i> – Indivíduo adulto (A), acículas (B) e casca (C).....	21
Figura 3	Estróbilos masculinos imaturos (A), estróbilos masculinos maduros (B) de <i>Araucaria angustifolia</i>	21
Figura 4	Estróbilos femininos de <i>Araucaria angustifolia</i>	22
Figura 5	Brácteas escamiformes estéreis de <i>Araucaria angustifolia</i> – “falhas”.....	23
Figura 6	Eixo central ou “sabugo” de <i>Araucaria angustifolia</i>	23
Figura 7	Pinhão ou diásporo (A), pinhão inserido ao eixo central da pinha (B) de <i>Araucaria angustifolia</i>	24
Figura 8	Abrangência APA Mantiqueira.	34
Figura 9	Abrangência APA Fernão Dias.....	35
Figura 10	Localização das populações amostradas de <i>Araucaria angustifolia</i> . MG, Imagem: ARCGIS v.10.1. EX (Extrema), GO (Gonçalves), DM (Delfim Moreira), PQ (Passa Quatro), IT (Itamonte), AL (Alagoa), AI (Aiuruoca), BO (Bocaina de Minas) e LI (Liberdade).....	49
Figura 11	Dendrograma do agrupamento entre pares de populações de <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze, localizadas no estado de Minas Gerais: DM (Delfim Moreira), PQ (Passa Quatro), IT (Itamonte), AL (Alagoa), AI (Aiuruoca), LI (Liberdade), BO (Bocaina de Minas), EX (Extrema), de acordo com as distâncias Genéticas de Nei (1978).....	71
Figura 12	Análise das coordenadas principais das populações de <i>A. angustifolia</i>	73

- Figura 13 Valores dos agrupamentos genéticos (K) e log da probabilidade média (LnP(D) obtidos pela análise Bayesiana74
- Figura 14 Imagem gerada pelo ARCGIS v.10.1. Representando a triangulação de *Delaunay* (linhas laranja).....76
- Figura 15 Correlogramas do coeficiente de coancestria (*Kinship*), por classes de distância, para indivíduos de *Araucaria angustifolia* nas populações naturais amostradas na Serra da Mantiqueira Minas Gerais. Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Local e tamanho amostral utilizados para o estudo de diversidade genética de <i>Araucaria angustifolia</i>	48
Tabela 2	Combinações Multiplex para Primers SSR de <i>Araucaria angustifolia</i> usadas neste estudo	528
Tabela 3	Parâmetros genéticos para loci microssatélites considerando o conjunto das populações de <i>Araucaria angustifolia</i>	61
Tabela 4	Parâmetros genéticos para as populações de <i>Araucaria angustifolia</i>	62
Tabela 5	Probabilidades exatas (Teste Exato de Fisher, 2000) dos desvios das proporções de Hardy Weinberg em loci microssatélites nas populações de <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze	59
Tabela 6	Dados dos estudos realizados com a espécie <i>Araucaria angustifolia</i>	64
Tabela 7	Número de alelos por loco dos principais estudos realizados com a espécie <i>A. angustifolia</i>	66
Tabela 8	Estatística F (WEIR; COCKERHAN, 1984) para oito loci microssatélites de <i>Araucaria angustifolia</i>	68
Tabela 9	Matriz de divergência genética (Nei, 1978) após correção de alelos nulos (abaixo da diagonal) e distância geográfica (Km) entre os pares de populações de <i>Araucaria angustifolia</i> (acima da diagonal)	69
Tabela 10	Quantificação de divergência genética entre populações de <i>Araucaria angustifolia</i>	69

Tabela 11	Análise de variância molecular (AMOVA) em populações de <i>Araucaria. angustifolia</i>	73
Tabela 12	Caracterização da estrutura espacial de <i>Araucaria angustifolia</i> em nove populações, incluindo para cada população o coeficiente de <i>kinship</i> (<i>Fij</i>) para primeira classe de distância, B_{log} , estatística <i>Sp</i> e valor de significância (<i>P</i>).....	84
Tabela 13	Análise de Bottleneck realizada para as populações de <i>Araucaria angustifolia</i>	86
Tabela 14	Migrantes identificados pela análise de máxima verossimilhança a partir dos oito locos microssatélites de <i>Araucaria angustifolia</i>	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	18
	2.1 Objetivo geral.....	18
	2.2 Objetivos específicos.....	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
	3.1 <i>Araucaria angustifolia</i> Bert. (O.) Kuntze.....	19
	3.2 Descrição da espécie.....	19
	3.2.1 Ocorrência da espécie.....	25
	3.2.2 Utilização.....	25
	3.2.3 Exploração.....	28
	3.3 Unidades de Conservação.....	30
	3.3.1 Área de Proteção Ambiental da Serra da Mantiqueira.....	31
	3.3.2 Área de Proteção Ambiental Fernão Dias.....	34
	3.4 Diversidade e Estrutura Genética.....	35
	3.5 Estrutura Genética Espacial.....	39
	3.6 Marcadores Microssatélites (SSR).....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
	4.1 Caracterização das Populações e Coleta de Material.....	47
	4.2 Extração do DNA e PCR-SSR.....	50

4.3	Análises Estatísticas.....	49
4.3.1	Detecção de Alelos Nulos	49
4.3.2	Diversidade Genética	54
4.3.3	Estrutura Genética	55
4.3.4	Estrutura Genética Espacial.....	57
4.3.5	Aderência ao Equilíbrio de Mutação e Deriva	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Detecção de Alelos Nulos.....	59
5.2	Índices de Diversidade Genética	60
5.3	Estrutura Genética	68
5.4	Estrutura Genética Espacial.....	77
5.5	Aderência ao Equilíbrio de Mutação e Deriva	85
6	CONCLUSÕES.....	88
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS	90
	REFERÊNCIAS	93
	ANEXOS.....	109

1 INTRODUÇÃO

Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze é uma gimnosperma endêmica da América do Sul, no Brasil é conhecida como pinheiro brasileiro e sua arquitetura peculiar, beleza e tamanho dos adultos fazem das matas com *A. angustifolia* um ecossistema único (DILLENBURG et al., 2009). A espécie ocorre em pequenas populações no extremo nordeste da Argentina, na província de Misiones (COZZO, 1980), no leste do Paraguai há uma única população natural na Reserva Nacional del Pinalito, localizada no Sul do Departamento del Alto Paraná, a Sudoeste de Foz do Iguaçu (REITZ; KLEIN, 1966). No Brasil, a espécie possui ampla ocorrência nas paisagens da Região Sul e limitada na Região Sudeste sendo presente em regiões com elevada altitude e que possuem estações do ano bem definidas.

A espécie dominou a paisagem no Sul do Brasil provavelmente desde a última glaciação até o final do século passado (CARVALHO, 1994), quando a intensa exploração predatória, levou-a próxima à extinção. Por isso, desde a década de 1970 a espécie encontra-se na lista oficial da FAO das espécies arbóreas sul-americanas em risco de extinção (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION, 1996). Na lista publicada no Diário Oficial de 24 de setembro de 2008, a espécie é classificada como espécie da flora brasileira ameaçada de extinção, em Minas Gerais de acordo com a deliberação COPAM 085/97, encontra-se classificada como vulnerável à extinção e na lista da flora do estado do Rio Grande do Sul como vulnerável (ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA-RS). Na lista da IUCN, está classificada como criticamente ameaçada (THE IUCN..., 2014).

Sua intensa exploração, baseada unicamente no extrativismo, praticamente dizimou a espécie, estima-se que de sua área original de 200 mil Km² restam aproximadamente 6 mil Km² ($\pm 2,5\%$) (KOCH; CORRÊA, 2002).

As áreas remanescentes de *A. angustifolia* constituem refúgios e, devido às alterações climáticas previstas, a espécie poderia estar confinada a áreas progressivamente menores (BACKES, 2009). Portanto, medidas para a conservação genética da espécie devem ser prioritárias, antes que sua variabilidade genética remanescente esteja comprometida. Se é que isto já não ocorreu.

Na Região Sudeste, a espécie ocorre de modo esparsa na Serra da Mantiqueira em Minas Gerais e em fragmentos dispersos nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Essas áreas constituem populações relíquias e a sua conservação é de grande importância, pois elas podem conter genes que conferem adaptabilidade para ambientes específicos, como os de maiores altitudes (>2.000 m) e menores latitudes. Na Serra da Mantiqueira, observa-se que as populações remanescentes encontram-se isoladas e em ambientes fragmentados.

A espécie foi objeto de estudos genéticos em vários estados, como São Paulo (MANTOVANI et al., 2006; PATREZE; TSAI, 2010; SEBBENN et al., 2003, 2004; SOUSA; HATTERMER, 2003; SOUSA; HATTEMER; ROBINSON, 2002), Rio de Janeiro (SOUSA et al., 2004; STEFENON et al., 2003, 2004, 2007, 2008; STEFENON; GAILING; FINKELDEY, 2008a), Paraná (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007, 2008, 2009; SHIMIZU; JAEGER; SPOCHAKI, 2000) e Santa Catarina (AULER et al., 2002; FERREIRA, 2012; MEDRI et al., 2003; SANT'ANNA et al., 2013; SCHLÖGL; SOUZA; NODARI, 2007; SCHMIDT et al., 2007; STEFENON et al., 2003, 2004, 2007, MEDINA-MACEDO et al., 2015). Embora, a espécie tenha sido analisada com objetivo de conservação genética em várias áreas de sua ocorrência, somente uma população em Minas Gerais foi estudada para esta finalidade (HAMPP et al., 2000).

A distribuição norte limítrofe da espécie é no estado de Minas Gerais e conhecer os níveis de diversidade e a estrutura genética dessas populações é importante para a formulação de medidas de conservação da espécie. Os limites de ocorrência de uma espécie podem conter genes únicos que devem ser estudados visando à manipulação das populações em programas de melhoramento florestal para que benefícios econômicos (madeira e pinhões) e ecológicos não sejam perdidos.

Diante disso, para se conhecer parte da diversidade e estrutura genética da espécie *A. angustifolia* no estado de Minas Gerais, foram selecionadas nove localidades com ocorrência natural da espécie na região da Serra da Mantiqueira para a realização deste estudo. Espera-se que populações remanescentes de *Araucaria angustifolia* localizadas na Serra da Mantiqueira possuam alta diversidade genética.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Quantificar os níveis de diversidade e a estrutura genética em populações remanescentes de *Araucaria angustifolia* localizadas na Serra da Mantiqueira, sul do estado de Minas Gerais.

2.2 Objetivos específicos

- a) detectar a presença de alelos nulos em nove populações naturais de *Araucaria angustifolia* ;
- b) quantificar os índices de diversidade genética de nove populações naturais de *Araucaria angustifolia*;
- c) verificar a distribuição da diversidade genética entre nove populações naturais de *Araucaria angustifolia*;
- d) estimar os índices de endogamia;
- e) verificar a existência de correlação entre distâncias geográficas e genética em populações de *A. angustifolia*;
- f) mensurar a divergência e similaridade genética entre populações de *A. angustifolia*;
- g) analisar a estrutura genética populacional com base em modelo de agrupamento Bayesiano;
- h) detectar a descontinuidade genética entre as populações de *A. angustifolia*;
- i) estudar a distribuição genética espacial dos indivíduos de *A. angustifolia*;

- j) testar se as populações se encontram em equilíbrio de mutação e deriva o que pode indicar gargalo genético.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Araucaria angustifolia* Bert. (O.) Kuntze

A espécie *Araucaria angustifolia*, juntamente com algumas espécies de *Podocarpus*, compõe o restrito número de gimnospermas nativas do Brasil (RIZZINI, 1997). Seu nome genérico deriva de Arauco, uma região do Chile, seu nome específico é uma palavra latina significando “folha estreita” (CARVALHO, 2003). Pertencente à ordem Coniferae, classe Coniferopsida, família Araucariaceae, a espécie *Araucaria angustifolia* se ramifica em oito variedades: elegans, sancti josephi, caiova, indehiscens, nigra, striata, semi-alba e alba (CARVALHO, 1994).

3.2 Descrição da espécie

A família Araucariaceae fazia parte da flora terrestre desde o período Triássico, se expandiu e se diversificou durante o Jurássico e no Cretáceo inferior (142 a 100 milhões de anos atrás) e, manteve-se como componente significativo na vegetação da Gondwana até a última parte do Cenozoico. Desde então, vários gêneros desta família foram se extinguindo. O gênero *Araucaria* é representado por cerca de 20 espécies, de ocorrência restrita ao hemisfério sul, a maioria com ocorrência na Oceania (HAINES; PRAKASH; NIKLES, 1984; KERSHAW; WAGSTAFF, 2001).

A espécie *Araucaria angustifolia* é uma conífera, predominantemente dioica, podendo ser encontrados raros indivíduos monoicos (Figura 1).



Figura 1 Indivíduo de *Araucaria angustifolia* monoico

Fonte: DANNER et al. (2013).

Há predominância de indivíduos masculinos tanto em áreas de ocorrência natural, como em plantios (BANDEL; GURGEL, 1967). A espécie é perenifólia e sua polinização é anemocórica e ocorre entre os meses de setembro a outubro (MATTOS, 2011). O período longo da liberação do pólen pode ser uma adaptação para aumentar o sucesso da polinização, pois o vento promove uma dispersão difusa do pólen com altas taxas de perda (VIEIRA; IOB, 2009). A altura das árvores pode variar de 10 a 35 m e DAP (diâmetro à altura do peito) de 50 a 120 cm (adultas). Seu tronco é retilíneo e cilíndrico (Figura 2 A) e se ramifica em pseudo-verticílios; as acículas são simples, alternas, espiraladas e coriáceas (Figura 2 B). Possui casca grossa resistente, áspera e rugosa (Figura 2 C).



Figura 2 *Araucaria angustifolia* – Indivíduo adulto (A), acículas (B) e casca (C)

Os estróbilos masculinos, androstróbilos (popularmente conhecidos por mingotes), são cilíndricos, medem de 10 a 22 cm de comprimento e de 2 a 5 cm de diâmetro, formados por escamas férteis. Quando imaturos têm cor verde (Figura 3 A), quando maduros apresentam cor acastanhada (Figura 3 B). A época da maturação dos estróbilos masculinos ocorre entre 28 de setembro a 15 de outubro (MATTOS, 2011). Porém, este período pode ser alterado por diferenças em latitude, temperatura, podendo amadurecer mais cedo ou terem este período mais prolongado.



Figura 3 Estróbilos masculinos imaturos (A), estróbilos masculinos maduros (B) de *Araucaria angustifolia*

Os estróbilos femininos, ginostrobilos (conhecidos popularmente como pinhas), apresentam forma arredondada (CARVALHO, 1994). No início da formação é difícil de serem visualizados, pois ficam protegidos pelas folhas terminais dos ramos. Quando maduros, apresentam em média de 48,57 cm de diâmetro com máximo de 61 cm (VERNALHA et al., 1972) (Figura 4). O ciclo reprodutivo da *Araucaria angustifolia* compreende um período que vai da formação do carpelo primordial à maturação da pinha, durando cerca de quatro anos (BITTENCOURT et al., 2005).



Figura 4 Estróbilos femininos de *Araucaria angustifolia*

O ginostrobilo ou pinha é constituído pelos seguintes elementos (MATTOS, 2011):

- a) Falhas ou brácteas escamiformes estéreis (Figura 5): têm a forma de uma cunha, cuja base está presa ao eixo da pinha. Em seu conjunto, “calçam” os pinhões ainda na pinha. O número médio de “falhas” por pinha é de 820.



Figura 5 Brácteas escamiformes estéreis de *Araucaria angustifolia* – “falhas”

- b) Pinhão chocho: são pinhões atrofiados, não possuem endosperma por não ter ocorrido a fecundação do óvulo.
- c) Eixo central ou “sabugo”: é constituído de tecido rígido-carnoso e sua superfície contém uma substância glutinosa com 69% de umidade, pequena quantidade de resina e material fibroso (Figura 6). Tem forma oval-oblonga e a superfície é faveolada, cujas cicatrizes, onde se inserem os pinhões ou “falhas”, dispõem-se em espiral.



Figura 6 Eixo central ou “sabugo” de *Araucaria angustifolia*

- d) Pinhão: chamado diásporo ou pinhão (Figura 7 A). Prende-se ao eixo central da pinha pela base, enquanto que o conjunto das suas extremidades e as falhas formam a superfície da pinha (Figura 7 B).



Figura 7 Pinhão ou diásporo (A), pinhão inserido ao eixo central da pinha (B) de *Araucaria angustifolia*

A classificação da *A. angustifolia* quanto à categoria sucessional é variável, sendo que Backes (1988), Klein (1960) e Reitz e Klein (1966) a classificam como pioneira e estritamente heliófita, Imaguire (1979) como secundária longeva, mas com características de espécies pioneiras, e Rambo (1960) como clímax. Dillenburg (2009) cita que a disparidade na classificação pode ser entendida à medida que se compreende que cada espécie se comporta de uma forma diferente em relação ao processo de sucessão, podendo variar muito dependendo do ambiente ao qual ela está inserida.

A. angustifolia é considerada uma boa indicadora climática e permite reconstrução detalhada da história climática em sua área de ocorrência (BEHLING, 1995a, 1995b). Dados paleoecológicos das regiões com florestas com *Araucaria* são uma importante contribuição para o entendimento dos

ecossistemas, sua estabilidade e respostas a mudanças climáticas (BEHLING, 1997).

3.2.1 Ocorrência da espécie

A distribuição geográfica de *A. angustifolia* ocorre no quadrilátero formado pelos paralelos 19°15' e 31°30'S e pelos meridianos 41°30' e 54°30'W e a isoterma 18 °C. No interior desse quadrilátero, a área ocupada originalmente pela espécie era de 200.000 km² (AUBREVILLE, 1954; BACKES, 2009; DUTRA; STRANZ, 2003; LINDMANN, 1906; TEIXEIRA; COURA-NETO, 1986; VALVERDE, 1957). Os limites de ocorrência se estabeleciam pela Serra Geral e Serra do Mar a Leste, e pelo rio Paraná a Oeste. Estimativas indicam que a espécie cobria principalmente os estados do Paraná (40% de sua superfície), Santa Catarina (31%) e Rio Grande do Sul (25%) e como manchas esparsas no sul de São Paulo (3%), internando-se até o Sul de Minas Gerais (1%) e em áreas de altitudes elevadas do Rio de Janeiro e Espírito Santo (GUERRA et al., 2002; KOCH; CORRÊA, 2002). Nas áreas de ocorrência, as altitudes variam de 1500 m na Serra da Mantiqueira (22°S) até 200 m no extremo sul (31°30' S) (BACKES, 2009).

3.2.2 Utilização

O pinhão é consumido como alimento desde o período Paleolítico, é rico em gorduras, mas pode ajudar na perda de peso por conter o ácido pinoleico que age desencadeando a liberação de dois hormônios supressores de fome, colecistoquinina e glucagon. Contribui também para o sistema cardiovascular, pois é fonte de gorduras monoinsaturadas, associadas a níveis baixos de

colesterol e menor risco de ataques cardíacos. São também ricos em vitaminas E, K, cobre, ferro e manganês que ajudam na manutenção do sistema cardiovascular. Os antioxidantes e o cobre presentes no pinhão retardam o processo de envelhecimento, ajudando a remover os radicais livres. Os pinhões contêm luteína, antioxidante importante na prevenção de doenças oculares, como a degeneração macular e catarata e possuem também vitamina A sob forma de betacaroteno. O pinhão também contém proteínas e magnésio que contribuem para melhorar os sintomas de fadiga, tensão muscular e cólicas.

Além de todos os benefícios para a saúde, o pinhão é uma fonte de renda extra aos produtores rurais. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2014), em Minas Gerais, foi observada uma safra maior no ano de 2001 (655 toneladas), seguida de uma queda constante até o ano de 2006, no qual foi obtida a menor produção (195 ton.) na série histórica analisada, com recuperação leve da produção até 2009 (304 ton.). Minas Gerais caracteriza-se por ter a menor produção de pinhão dentre os estados produtores, devido a sua reduzida área de Floresta Ombrófila Mista. É possível verificar que o preço médio do pinhão foi aumentando de 2001 a 2009 ao nível nacional e também nos estados de forma geral. Minas Gerais foi o estado que mais apresentou variações em seus preços no período analisado. Em 2002, o estado apresentou o menor preço por quilo de todos os anos e entre todos os estados, chegando a custar R\$ 0,51 /Kg. Já em 2008, o preço médio encontrado em Minas Gerais foi um dos maiores do país, R\$ 1,42/Kg. Um dos problemas enfrentados é em relação às margens de lucro, pois a parte mais expressiva fica com o intermediário. Estes pagam ao produtor em média R\$ 0,60/Kg e vendem ao varejista por R\$ 1,60/Kg (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014). O baixo preço do produto pago ao produtor rural estimula que esse colete o máximo possível de pinhões.

A produção da semente ocorre durante os meses mais frios do ano, por isso os pinhões se tornam um importante recurso para a fauna, que pode ser classificada como predadora e dispersora. Entre os predadores, destacam-se o *Spermologus rufus* (bicudo) que permanece dentro da semente se alimentando do endosperma e embrião (BARRETO; ANJOS, 2002) e a *Cydia araucaria* (Broca-do-pinhão) que coloca seus ovos nas pinhas e as lagartas perfuram os pinhões que se tornam inviáveis para germinação e consumo. Entre as aves, os principais predadores são *Amazona pretrei* (papagaio charão) e a *Cyanocorax caeruleus* (gralha azul), na região Sudeste, a *Cyanocorax cristatellus* (gralha do campo), porém os mesmos agem como dispersores por coletar as sementes diretamente das pinhas, auxiliando a dispersão barocórica e ao voarem perdem as sementes contribuindo para a dispersão para áreas distantes. Entre os mamíferos que atuam na predação estão os macacos, veados, quatis, capivaras, javalis, ouriços, pacas, esquilos e outros pequenos roedores que são responsáveis por alta taxa de predação. O esquilo e a cotia atuam como dispersores enterrando as sementes e as transportando para locais distantes (>25 m) (BORDINGNON; MONTEIRO-FILHO, 2000). O consumo do pinhão tem relação com a reserva nutritiva necessária para o ciclo reprodutivo das espécies. A predação influencia os padrões de germinação e recrutamento de novos indivíduos da espécie.

A espécie também sustenta relações ecológicas fundamentais permitindo que espécies tolerantes à sombra possam crescer e se desenvolver (AULER et al., 2002), tais como diversas as espécies de epífitas vasculares exclusivas, (WILBERGER et al., 2009), fungos e líquens.

A madeira é leve e sem falhas e reúne uma variedade de aplicações como na construção de casas, forros, soalhos e vigas. Vastas áreas de pinheirais foram cultivadas exclusivamente para a confecção de caixas e palitos de fósforo. A madeira foi utilizada em mastros de embarcações como também para a

fabricação de papel (ASSOCIAÇÃO DE PRESERVAÇÃO DO MEIO AMBIENTE E DA VIDA, 2015).

3.2.3 Exploração

Estima-se que da área original da *A. angustifolia* que era de 200 mil Km², restam aproximadamente 6 mil Km² (KOCH; CORRÊA, 2002).

O momento decisivo para o início da devastação das florestas de *A. angustifolia* no Sul do Brasil foi o final de século XIX, com o início da construção da ferrovia São Paulo - Rio Grande que resultou na Guerra do Contestado. Em 1900, o governo brasileiro contratou a *holding* Brazil Railway Company para construir a estrada de ferro. A empresa Southern Brazil Lumber and Colonization integrava a *holding* e foi responsável por instalar serrarias a partir de 1911 entre os estados do Paraná e Santa Catarina, na região dos campos gerais no Paraná e na divisa com o estado de São Paulo. No intuito de suprir a capacidade produtiva das serrarias, a Lumber comprou fazendas, as quais eram cobertas de florestas de *A. angustifolia*. Essas fazendas eram habitadas por posseiros e pequenos agricultores que viviam há anos na região explorando a *Ilex paraguariensis* (erva mate). A construção da ferrovia favoreceu um processo de especulação de terras e disputas políticas entre coronéis e posseiros pobres pelo acesso à terra, o que resultou a Guerra do Contestado que ocorreu de 1912 a 1916.

Foi dada a cessão gratuita das terras laterais à ferrovia com extensão de 18 km, nove de cada lado, até o limite máximo de 15 km em cada direção. Nesse contexto, a empresa Brazil Railway Company iniciou o desenvolvimento dos serviços de colonização das terras ao longo da estrada de ferro, e a exploração dos grandes pinhais existentes na região que atravessavam a zona contestada por Santa Catarina e Paraná (THOMÉ, 1983).

Além da *A. angustifolia*, também se explorava comercialmente a imbuia, o cedro e a canela, em escala menor. Em relatório de abril de 1917, consta que a produção total (em toras) da serraria de Três Barras nos cinco primeiros anos de funcionamento foi de pouco mais de 107 milhões de pés cúbicos (ou 249.000 m³), o que significou a devastação de 2.484 alqueires (6.011 ha), rendendo uma média de 41,4 m³ por ha. (BISHOP, 1974).

A maior parte da madeira explorada era de *A. angustifolia*, que além de ser a árvore mais abundante na mata era também a mais valorizada no mercado. Em valores monetários, o lucro líquido das vendas de madeira do ano de 1919 alcançou 1.995 contos de réis.

A partir daí, a construção de novas ferrovias, a crescente migração, tanto de europeus, quanto dos descendentes destes das colônias mais antigas do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, promoveram um avanço crescente em direção às florestas nativas de araucária em todo o planalto sul-brasileiro. Ao mesmo tempo, proliferaram serrarias, principalmente a partir da I Guerra Mundial, passando a ser um fator de grandes oportunidades de negócio frente à crescente demanda por madeira em outras regiões do país e no exterior. Todo esse processo esgotou as florestas de araucária por volta da década de 1970, quando a indústria madeireira passou a realizar plantios de espécies exóticas de rápido crescimento para garantir a continuidade da atividade. (CARVALHO, 2006).

Não há registro bibliográfico sobre o corte da *A. angustifolia* na região da Serra da Mantiqueira, entretanto os moradores da região relatam que a exploração se deu para a venda da madeira para serrarias e para a Companhia Siderúrgica Nacional (CSN) em Volta Redonda (RJ), onde a madeira alimentava os fornos.

Em 1976, com a Instrução Normativa IBAMA DC 020/1976 (ANEXO A), todo o licenciamento de pinheiros plantados ou não, ficou suspenso nos

meses de abril, maio e junho devido à queda das sementes. No caso de licenciamento para corte de pinheiros nativos, para cada indivíduo abatido, 15 mudas da mesma espécie deveriam ser repostas. Em 2001, a Resolução Conama nº 278 de 24 de maio de 2001 (ANEXO B) proibiu o corte e a exploração de espécies ameaçadas de extinção da flora da mata Atlântica. A espécie é protegida por lei e outro aspecto que ajuda em sua proteção é o fato de 72 unidades de conservação federais e estaduais estarem localizadas na área de distribuição da espécie no Brasil, com um total de 885.858,23 ha de áreas protegidas (INDRUSIAK; MONTEIRO, 2009). As localidades onde foi coletado o material vegetal para a realização deste estudo estão inseridas em duas Áreas de Proteção Ambiental (APA), uma federal e outra estadual. Estas áreas são importantes para a conservação *in situ* da espécie.

3.3 Unidades de Conservação

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA), Unidades de Conservação (UC) são espaços territoriais, incluindo seus recursos ambientais, com características naturais relevantes, que têm a função de assegurar a representatividade de amostras significativas e ecologicamente viáveis das diferentes populações, *habitats* e ecossistemas do território nacional e das águas jurisdicionais, preservando o patrimônio biológico existente. As UC de uso sustentável asseguram às populações tradicionais o uso sustentável dos recursos naturais de forma racional e ainda propiciam às comunidades do entorno o desenvolvimento de atividades econômicas sustentáveis.

Estas áreas estão sujeitas a normas e regras especiais. São legalmente criadas pelos governos federal, estaduais e municipais, após a realização de estudos técnicos dos espaços propostos e, quando necessário, consulta à população.

De acordo com a lei nº 9.985/2000 (Sistema Nacional de Unidades de Conservação – SNUC) (BRASIL, 2000), as unidades de conservação são divididas em dois grupos:

1º - Unidades de Proteção Integral: o principal objetivo dessas unidades é a proteção, por isso as regras e normas são mais restritivas, permitindo apenas o uso indireto dos recursos naturais; ou seja, aquele que não envolve consumo, coleta ou danos aos recursos naturais. As categorias de proteção integral são: estação ecológica, reserva biológica, parque, monumento natural e refúgio de vida silvestre.

2º - Unidades de Uso Sustentável: são áreas que visam conciliar a conservação da natureza com o uso sustentável dos recursos naturais. Nesse grupo, atividades que envolvem coleta e uso dos recursos naturais são permitidas, mas desde que praticadas de uma forma que a perenidade dos recursos ambientais renováveis e dos processos ecológicos esteja assegurada. As categorias de uso sustentável são: área de relevante interesse ecológico, floresta nacional, reserva de fauna, reserva de desenvolvimento sustentável, reserva extrativista, área de proteção ambiental (APA) e reserva particular do patrimônio natural (RPPN).

As coletas de material biológico (acículas e sementes) para a realização deste estudo foram realizadas em nove municípios localizados na Serra da Mantiqueira sendo oito pertencentes à APA, da Serra da Mantiqueira e dois, à APA Estadual Fernão Dias – Unidades de Uso Sustentável.

3.3.1 Área de Proteção Ambiental da Serra da Mantiqueira

Em Minas Gerais, a espécie possui ampla distribuição na área de abrangência da Área de Proteção Ambiental da Serra da Mantiqueira, considerada a oitava área insubstituível do mundo (LE SAOUT et al., 2013).

Área de Proteção Ambiental (APA) é uma área extensa, com grau de ocupação humana com atributos bióticos, abióticos, estéticos ou culturais especialmente importantes à qualidade de vida e ao bem das populações humanas. O objetivo básico é de proteger a diversidade biológica, disciplinar o processo de ocupação e assegurar a sustentabilidade do uso dos recursos naturais. Pesquisa e visitação são estabelecidas pelo órgão gestor.

A Serra da Mantiqueira é uma das maiores e mais importantes cadeias montanhosas do sudeste brasileiro e abrange parte dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Apresenta extrema importância ecológica, integrando o bioma Mata Atlântica, com formações mistas de campos, florestas e enclaves de matas de *A. angustifolia*. Possui uma grande diversidade de ecossistemas, como consequência de sua topografia que apresenta desníveis de mais de 2.000 m, pois suas altitudes variam entre 700 m, a cota mais baixa, e 2.798,39 m em seu ponto culminante, na Pedra da Mina, divisa dos estados de Minas Gerais e São Paulo. Nela são encontrados campos de altitude, diferentes tipos de florestas, matas de araucária e pequenas áreas brejosas, que abrigam um grande número de espécies endêmicas, além de várias espécies de animais e vegetais em extinção, como a onça parda e outros felinos, o lobo guará, a lontra, o papagaio do peito roxo, dentre outros.

A Área de Proteção Ambiental da Serra da Mantiqueira - APASM foi criada em 1985 pelo Decreto Federal nº. 91.304 (ANEXO C), abrangendo uma área de 437.627,29 ha, distribuídos entre os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Sob a denominação de APA da Serra da Mantiqueira, fica declarada área de proteção ambiental, a região situada nos municípios de Aiuruoca, Alagoa, Baependi, Bocaina de Minas, Delfim Moreira, Itanhandu, Itamonte, Liberdade, Marmelópolis, Passa Quatro, Passa Vinte, Piranguçu, Pouso Alto, Santa Rita do Jacutinga, Virgínia e Wenceslau Brás, no estado de Minas Gerais; Campos do Jordão, Cruzeiro, Lavrinha, Pindamonhangaba, Piquete, Santo Antônio do Pinhal e Queluz, no estado de São Paulo e Resende no Estado do Rio de Janeiro (Figura 8). Localizada estrategicamente numa das maiores e mais

importantes cadeias montanhosas do Leste Sul Americano e, ao mesmo tempo, entre importantes eixos de desenvolvimento do País, tem como principais objetivos proteger e preservar parte dessa cadeia, bem como a flora endêmica e andina, os remanescentes das florestas de *A. angustifolia*, a continuidade da cobertura vegetal do espigão central e das manchas de vegetação primitiva e a vida selvagem, principalmente as espécies ameaçadas de extinção. Possui alta riqueza de espécies animais e vegetais raras e endêmicas, e por isso é apontada em consenso como área prioritária para a conservação da biodiversidade na categoria de maior importância. A ocupação humana na região abrangida pela APASM, apesar de sua riqueza cultural, historicamente pressionou os recursos naturais. As consequências negativas são o mau uso do solo e a ocupação desordenada o que resulta na degradação e na fragmentação de habitats bem como na contaminação dos recursos hídricos, sendo que nesta região estão importantes nascentes que formam as bacias dos rios Grande e Paraíba do Sul. Por seu potencial natural, a região da APASM é procurada tanto para a implantação de florestas homogêneas para exploração comercial, como para instalação de loteamentos irregulares e implantação de projetos de turismo, entre outras atividades privadas, além de sofrer com pressões antrópicas de fogo, parcelamento de solo e uso inadequado de Áreas de Preservação Permanente (APP). Desta forma, visando somar esforços no sentido de articular os diferentes interesses na região, foi criado em 2004 o Conselho Consultivo da APA – CONAPAM, com o principal objetivo de estimular e coordenar a gestão participativa dessa unidade de conservação que parece ser um importante caminho para sua gestão. São grandes os desafios para se gerir ambientalmente um território tão extenso e com tantos interesses conflitantes, em especial se tratando do Bioma Mata Atlântica. Por isso, torna-se necessária a aplicação de políticas públicas que contemplem as especificidades sociais, econômicas e ambientais da região, o que requer atenção das diferentes esferas de decisão e a participação da comunidade nos processos de planejamento e de gestão dessa unidade de conservação (Texto fornecido pela Equipe da APA da Serra da Mantiqueira, modificado).

É importante destacar que a APA Serra da Mantiqueira abrange em sua extensão outras Unidades de conservação: Parque Nacional do Itatiaia, Parque Estadual de Campos do Jordão, Parque Estadual da Serra do Papagaio, Floresta

Nacional de Passa Quatro e um grande número de Reservas Particulares do Patrimônio Natural, formando um mosaico de Unidades de Conservação.

Diante de toda a diversidade contida na área, torna-se imprescindível a pesquisa com a finalidade de conservação e preservação, ainda mais importante após a publicação do artigo de Le Saout et al. (2013), publicado na revista Science, considerando a APA Serra da Mantiqueira a oitava área insubstituível do planeta, juntamente com o Parque Nacional do Itatiaia.



Figura 8 Abrangência da APA Mantiqueira.

Fonte: PRÓ-FUNDAÇÃO MANTIQUEIRA (2014).

3.3.2 Área de Proteção Ambiental Fernão Dias

A APA Fernão Dias foi criada com a finalidade de compensação ambiental da obra de duplicação da Rodovia Fernão Dias em 1997 (Decreto Estadual nº 38.925 de 17 de julho de 1997) (ANEXO D). Existente há 15 anos,

ela abrange oito municípios do Sul de Minas Gerais (mais de 180 mil hectares) (Figura 9) e tem como focos principais a conservação dos recursos hídricos das bacias dos rios Piracicaba/Jaguari, Sapucaí; o manejo adequado do solo; o ordenamento do turismo; a proteção dos remanescentes de Mata Atlântica e a promoção de Educação Ambiental em todos os municípios da APA.

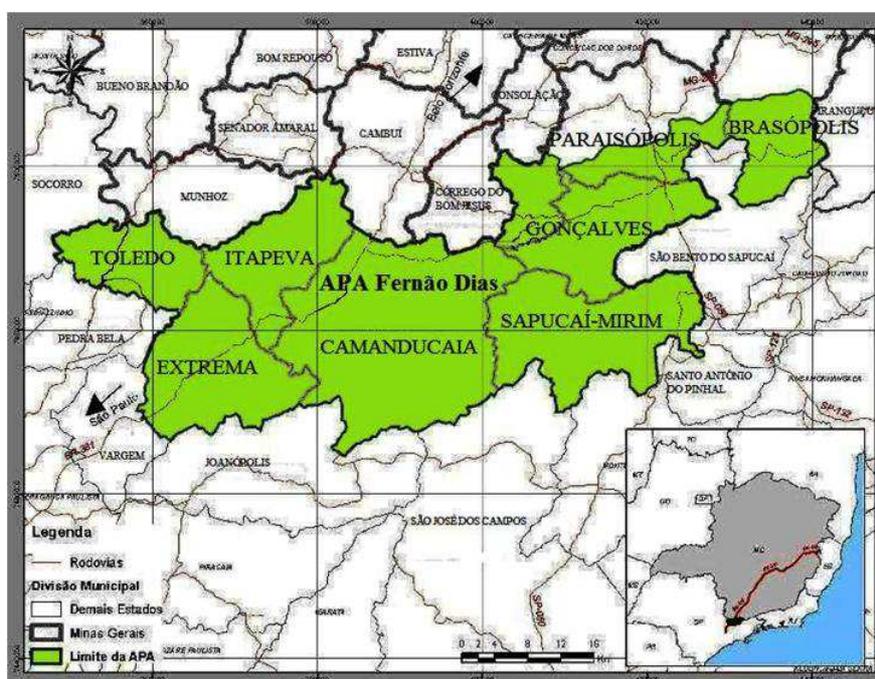


Figura 9 Abrangência APA Fernão Dias

Fonte: ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL FERNÃO DIAS (2014).

3.4 Diversidade e Estrutura Genética

Uma condição fundamental para que haja evolução é a existência de diversidade genética. A seleção natural atua entre as variantes dentro das

populações em relação à adaptação ao ambiente, proporcionando variabilidade entre populações e, por fim, variabilidade entre espécies (TORGGLER; CONTEL; TORGGLER, 1995). A diversidade genética de uma espécie ou de uma população deve-se aos efeitos combinados de sua história genealógica e processos evolutivos (COMES; KADEREIT, 1998).

A conservação de espécies tem por base a manutenção dos níveis naturais de variabilidade genética nas populações (YEEH; KANG; CHUNG, 1996), portanto, conhecer os níveis e distribuição da variação genética é fundamental para se estabelecer práticas conservacionistas efetivas e eficientes.

Em espécies arbóreas, a preservação da diversidade genética é essencial para a sobrevivência das populações às intempéries do meio e faz-se cada vez mais necessária, considerando-se a ocorrência de mudanças climáticas globais. Devido à sua grande longevidade e ao potencial para elevadas taxas de fluxo de pólen, as árvores devem possuir altos níveis de diversidade genética dentro das populações para que possam persistir a períodos de alterações ambientais (HAMRICK, 1983).

Entende-se como estrutura genética a distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações. A estrutura genética de uma espécie é definida como a medida dos padrões de variação dada pela diversidade genética da população, a variação nos níveis de diversidade em diferentes populações e a extensão e variação da correlação ou distância genética entre populações (BROWN, 1978). Desta forma, a estrutura genética é a distribuição não casual de alelos ou genótipos no tempo e no espaço, sendo desprezados outros fatores que possam afetar as frequências alélicas e genotípicas, como a organização do genoma e os processos meióticos.

A estrutura genética é desenvolvida e mantida devido às interações de um complexo conjunto de fatores evolutivos, como variação no conjunto gênico, organização dessa variação em genótipos, distribuição espacial dos genótipos,

sistema de reprodução que controla a união de gametas para a formação das progênies, dispersão das progênies, seleção, deriva, mutação, eventos casuais e processos de crescimento, mortalidade e reposição de indivíduos que darão origem às populações futuras (ALVAREZ-BUYLLA; GARAY, 1994; HAMRICK, 1983; HAMRICK; GODT, 1989; LOVELESS; HAMRICK, 1984). A diferenciação entre populações geralmente deve-se à seleção e deriva genética, sendo o fluxo gênico um fator contrário a essas forças (HAMRICK; GODT, 1989).

O conhecimento do nível e da distribuição da variabilidade genética dentro de uma espécie pode propiciar uma melhor compreensão de sua história ecológica e evolutiva (HAMRICK; GODT, 1996). A estrutura genética também foi conceituada por Weir (1990) como o modo pelo qual a diversidade genética é partilhada dentro e entre as populações, sendo de particular interesse para a conservação dos recursos genéticos e fundamental para o manejo racional dos recursos de populações naturais, pois fornece a matéria-prima para mudanças evolutivas futuras e níveis diferentes de variação em diferentes populações podem fornecer evidência de eventos evolutivos no passado.

Em plantas, devido à sua mobilidade limitada, a estrutura genética pode estar associada à distribuição espacial e temporal dos genótipos (BROWN, 1978; LOVELESS; HAMRICK, 1984). Dessa forma, as espécies podem apresentar estruturação como resultado da heterogeneidade ambiental e da pressão seletiva diferencial.

No que diz respeito ao tamanho populacional, quanto maior o tamanho populacional maior a diversidade genética dentro da população e, conseqüentemente, menor a diferenciação entre as populações. Desta forma a alta diferenciação entre as populações e a baixa diversidade genética populacional podem ser observadas em espécies com baixa densidade de indivíduos, de autofecundação e ou propagação vegetativa com limitada

dispersão de pólen e sementes (LOVELESS; HAMRICK, 1984; ZANETTI; CAVALLI, 2003). A redução no tamanho populacional tem como fator preocupante a alta susceptibilidade à deriva genética, e conseqüentemente, a redução da diversidade. Além da deriva genética, pequenas populações podem estar mais sujeitas à endogamia, decorrente da maior probabilidade de autofecundação e cruzamentos entre indivíduos aparentados (KAGEYAMA; GANDARA, 1998; KELLER; WALLER, 2002).

A descrição da variabilidade genética nas populações é uma ferramenta importante na genética de populações por possibilitar o estudo dos mecanismos de manutenção dessa variabilidade (NEI, 1977). O incremento nos níveis de diversidade é dado pela ocorrência de mutações, que geralmente ocorrem em taxas muito baixas, restringindo-se a uma perspectiva de longo prazo (ALLENDORF; LUIKART, 2012). Já a redução nos níveis de diversidade ocorre em ritmo mais acelerado devido a fatores como deriva genética, endogamia, seleção natural (NEI, 1977).

Desta forma, a mensuração dos níveis de diversidade genética é de grande relevância na identificação de espécies e populações prioritárias para a conservação, e avaliações dos níveis de diversidade genética têm sido empregadas como ferramentas para subsidiar a adoção de estratégias de manejo e de conservação genética em inúmeros estudos (BARBOSA et al., 2010; BATISTINI et al., 2009; GAJERA et al., 2010).

São muitos os métodos utilizados para avaliar a estrutura genética de populações e verificar o grau de variabilidade existente em uma dada espécie. Com o avanço em melhorias nas técnicas de biologia molecular, é possível observar polimorfismo diretamente na sequência gênica de organismos, ampliando novas perspectivas para pesquisa em conservação (ZUCCHI et al., 2003). Dentre elas destaca-se a técnica de microssatélites (SSR).

3.5 Estrutura Genética Espacial

O padrão espacial de indivíduos de uma população é caracterizado pela forma como estes indivíduos estão distribuídos na área. Em estudos genéticos, a autocorrelação espacial pode ser utilizada tanto para estimar o grau de isolamento de populações a partir das frequências gênicas ou fenotípicas em cada população, como em nível intrapopulacional, na qual esta técnica é utilizada para auxiliar na detecção de agrupamentos de indivíduos aparentados (GANDARA, 1996). O conhecimento da estrutura genética espacial é importante para se estabelecer estratégias de amostragem em populações naturais para conservação genética, formando assim amostras significativas. Estudos na estrutura populacional de espécies arbóreas têm demonstrado que a distribuição de alelos e genótipos não é aleatória dentro das populações. Tal estrutura pode ser determinada pela dispersão de pólen e sementes, *habitat* de distribuição e seleção micro ambiental (HAMRICK, 1983). Futuyma (1992) cita que se em uma população existem limitações físicas que não permitem cruzamentos aleatórios, deverá haver maior probabilidade de cruzamentos entre indivíduos próximos, levando à redução dos heterozigotos e formação dos grupos, estruturando a população.

O fato de ocorrer estrutura genética espacial positiva, ou seja, indivíduos aparentados próximos dentro das populações, pode ser um indicativo de cruzamento endogâmico (SEBBENN, 1997). Porém, padrões genéticos não aleatórios podem existir sem distribuição espacial agregada dos indivíduos. Por outro lado, uma população pode apresentar distribuição espacial agregada sem qualquer acompanhamento de estrutura genética (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Segundo Heywood (1991) isso pode ocorrer devido ao fato de que os padrões espaciais e genéticos resultam, comumente, da heterogeneidade ambiental e de pressões de seleção.

A estrutura genética espacial dentro de populações de plantas é primariamente determinada pelos efeitos da limitada dispersão de pólen e sementes, isolamento em pequenas manchas, mortalidade diferencial e seleção para micro-habitats (MORAES; KAGEYAMA; SEBBENN, 2005). Em escalas maiores a estrutura genética é afetada por fatores históricos e isolamento pela distância.

A estrutura espacial dos genótipos pode ser estimada pela autocorrelação espacial como também ser analisada a partir de estimativas de coeficientes de parentesco ou coeficientes de coancestralidade, baseados na probabilidade de identidade dos alelos em dois genes homólogos amostrados da mesma maneira.

Segundo Ritland (1996), as estimativas de coancestria são definidas como probabilidade de identidade por descendência entre alelos. A partir de dados de marcadores genéticos estima-se uma “coancestria relativa” que pode ser definida como a razão de diferenças de probabilidades de identidade por estado (ROUSSET, 2002). O índice I de Moran tem sido utilizado amplamente no estudo da distribuição espacial dos genótipos, mas muitos autores têm empregado os coeficientes de coancestralidade para analisar a estrutura genética espacial de espécies arbóreas (LOISELLE et al., 1995; MYAMOTO; KURAMOTO; YAMADA, 2001). Estes coeficientes, além de informarem sobre a presença ou não de estruturação, indicam o grau de parentesco entre os indivíduos.

É importante conhecer a estrutura genética de plantas que serão incluídas em programas de manejo ou conservação genética. Este conhecimento torna-se importante também na implantação de estratégias amostrais em populações naturais para, no final, obter-se amostra que represente a diversidade populacional. Pode-se também, com essas informações, minimizar os impactos causados pelo manejo sustentável na diversidade genética de espécies florestais.

3.6 Marcadores Microssatélites (SSR)

Os marcadores moleculares surgiram devido à necessidade da detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA. Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Milach (1998) descreve que marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Existem marcadores bioquímicos (Proteína) e marcadores de DNA. Há uma grande variedade de marcadores de DNA, entre eles, o microssatélite ou sequências repetitivas simples (SSR) é o mais adequado para estudos genéticos (ASHLEY, 2010; CHASE; KESSELI; BAWA, 1996).

Os marcadores microssatélites, também chamados de SSRs (*Single Tandem Repeats*) ou STRs (*Short Tandem Repeats*) são formados por sequências de uma a seis bases de comprimento repetidas em série (JACOB et al., 1991) e estão entre as sequências mais variáveis de DNA no genoma dos eucariotos. A análise de locos microssatélites é realizada por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando-se iniciadores (*Primers*) complementares (18 a 25 bases) às regiões que os flanqueiam.

Com base no seu motivo de repetição, podem ser classificados como perfeitos – a sucessão das unidades de repetição não é interrompida - imperfeitos – a sequência de repetições está dividida por um ou mais nucleótidos - e compostos - quando são constituídos por motivos de repetição diferentes (WEBER et al., 1990).

O conteúdo genético informativo de um marcador microssatélite é, geralmente, bastante alto, por se tratar de sequência de alta taxa evolutiva. Mesmo em comparações de germoplasma com estreita base genética, geralmente detecta-se um alto número de alelos em um loco SSR. Diante dos diversos tipos

de marcadores disponíveis, eles são diferenciados pela tecnologia utilizada, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade e, principalmente, na habilidade do parâmetro que se quer detectar, seja ela por diferenças entre indivíduos, estrutura genética de populações, filogenia ou filogeografia.

Entre as vantagens apresentadas pelos marcadores microssatélites pode-se citar a codominância, que permite detectar os dois tipos de alelos que um indivíduo diploide pode apresentar (homozigotos e heterozigotos); o alto polimorfismo baseado na variação do número dos elementos repetidos, provavelmente devido aos erros de DNA polimerase durante o processo de replicação e reparo da molécula de DNA; são abundantes, cobrem extensivamente o genoma, possuem natureza multialélica; necessitam de pequenas quantidades de DNA para análise, e são de fácil detecção por PCR (reação em cadeia da polimerase).

A fácil detecção via PCR possibilita sua utilização em estudos forenses e análises moleculares não invasivas (SCHLOTTERER, 2004), uma vez que permite a amplificação em amostras de reduzida quantidade ou qualidade de DNA, mesmo o DNA altamente degradado (JARNE; LAGODA, 1996; TABERLET; WAITS; LUIKART, 1999; WASER; STROBECK, 1998).

Mutações nas regiões flangeadoras podem ocorrer e estas são responsáveis pela ocorrência de alelos nulos, isto é, alelos que não são amplificados na reação de PCR (JARNE; LAGODA, 1996). Em consequência, indivíduos heterozigotos podem ser identificados como homozigotos. Outro problema que pode ocorrer é a homoplasia, ou seja, a existência de alelos idênticos como resultado de processos mutacionais convergentes e não ancestralidade comum. A ocorrência da homoplasia reduz o número de alelos observados por população, a proporção de heterozigotos e a diversidade genética (ESTOUP et al., 1995; JARNE; LAGODA, 1996); é esperada em todos os modelos mutacionais exceto pelo IAM (Infinite Allele Model) de Kimura e

Crow (1964). A ocorrência de homoplasia foi detectada em taxa mais elevada entre espécies do que entre populações da mesma espécie e é rara a detecção dentro de populações. Todavia, a presença de alelos nulos e homoplasia não constituem um problema, uma vez que a grande variabilidade encontrada nos microssatélites compensa, geralmente, a ocorrência (ESTOUP; JARNE; CORNUET, 2002; JARNE; LAGODA, 1996).

Vários estudos com *Araucaria angustifolia* foram realizados usando marcador microssatélite com objetivos diversos, como os realizados por Bittencourt e Sebbenn (2007, 2008, 2009), Danner et al. (2013, 2013a), Medina-Macedo et al. (2015), Patreze e Tsai (2010), Salgueiro et al. (2005), Sant'anna et al. (2013), Schmidt et al. (2007), Stefenon et al. (2007, 2008) e Stefenon, Gailing e Finkeldey (2008a). Os trabalhos pioneiros para a utilização de microssatélites foram realizados por Salgueiro et al. (2005) e Schmidt et al. (2007), sendo otimizado um total de 37 *primers* microssatélites.

Salgueiro et al. (2005) utilizaram nDNA (DNA nuclear) de 60 indivíduos de três populações diferentes (RJ, SP, PR) de *Araucaria angustifolia* para desenvolver oito *primers* (ANEXO E), sendo encontrados três a 11 alelos por locus. Os oito loci foram testados para desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação em *A. angustifolia*. Observou-se desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos locos Ag62 ($P = 0,025$) e CRCAc1 ($P < 5/10$). Após a correção de Bonferroni, apenas o loco CRCAc1 apresentou desvio significativo. Nos indivíduos de populações do PR e RS, nenhum desvio significativo do Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação foi observado. Na população RJ, o loco Ag62 ($P = 0,004$) e CRCAc1 ($P < 5/10$) apresentaram desvio de Hardy-Weinberg significativo. Nesta população, o teste exato de Fisher para desvio de ligação foram inferiores a 5% para os seguintes pares de loci: AG20 AG56 ($P = 0,031$), AG56 \times Ag62 ($P = 0,044$), Ag62 \times CRCAc1 ($P = 0,046$), Ag62 \times CRCAc2 ($P = 0,041$) e AG94 \times CRCAc2 ($P = 0,035$). Dado

que com a correção de Bonferroni, a taxa de erro correspondendo a um período experimental de limiar de 5% foi reduzida para 2%. Além disso, quando o teste exato de Fisher foi calculado para todas as populações, não foi encontrado desequilíbrio de ligação significativo.

Schmidt et al. (2007) desenvolveram 29 pares de *primers* (ANEXO F) todos altamente polimórficos, com média de 8,1 alelos por locus com valores médios de heterozigosidade esperada e observada de 0,72 e 0,63 respectivamente. Seis loci (Aang09, Aang12, Aang17, Aang18, Aang35 e Aang44) apresentaram desvio ao equilíbrio de Hardy-Weinberg após correção para vários testes (método de Bonferroni, $P < 0,0017$). Além disso, desequilíbrio de ligação significativo foi encontrado para quatro (Aang02 / Aang03, Aang04 / Aang09, Aang04 / Aang43 e Aang03 / Aang44) das 406 comparações de pares. No entanto, o desvio de equilíbrio pode ser devido à amostragem limitada (DNA extraído de um único indivíduo). Portanto, os altos níveis de polimorfismo presentes nos *primers* caracterizados para *A. angustifolia* são utilizados para estudos de genética de suas populações.

Os *primers* SSR para *Araucaria angustifolia* desenvolvidos e caracterizados por Salgueiro et al. (2005) e Schmidt et al. (2007) foram de grande importância para a realização de vários estudos com a espécie, com objetivos relacionados à estrutura genética (STEFENON et al., 2007), dispersão de sementes e pólen (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007, 2008; SANT'ANA et al., 2013), fluxo gênico (STEFENON et al., 2007a), efeitos genéticos da fragmentação florestal (BITTENCOURT; SEBBENN, 2009), diversidade genética intratopulacional (PATREZE; TSAI, 2010), impacto da monoícia (DANNER et al., 2013), segregação mendeliana em loci SSR (DANNER et al., 2013a) e a diversidade genética detectada por meio do fluxo de pólen (MEDINA-MACEDO et al., 2015).

Vários trabalhos foram realizados com a espécie utilizando outros tipos de marcadores como as isoenzimas (SHIMIZU; JAEGER; SPOCHAKI, 2000), que quantificaram a variabilidade genética de população remanescente no Parque Nacional do Iguaçu (PR). Auler et al. (2002) analisaram a estrutura e diversidade por meio de variação não adaptativa de populações naturais em Santa Catarina. Sousa, Hattemer e Robinson (2002) avaliaram a herança e relações isoenzimática das variantes da espécie (PR, SC, SP). Sousa e Hattermer (2003) investigaram a dispersão de pólen e fluxo gênico em populações naturais (PR, SC, SP). Sousa et al. (2004) quantificaram a variação e a estrutura genética em populações naturais (PR, SC, SP), Sousa et al. (2005) analisaram a correlação do sistema de cruzamento em populações naturais (PR, SC, SP); Mantovani et al. (2006) quantificaram a estrutura genética interna e a taxa de cruzamento (SP), Ferreira et al. (2012) realizaram análises genéticas em florestas plantadas e naturais em Santa Catarina.

Os marcadores de DNA polimórfico amplificado ao acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA*- RAPD) foram utilizados por Mazza e Bittencourt (2000) para modificações no método padrão CTAB de extração de DNA a partir de acículas de árvores adultas (PR). Medri et al. (2003) analisaram os efeitos do manejo na diversidade genética em uma população em Santa Catarina e concluíram que o manejo levou a uma redução da variabilidade genética da população remanescente.

Stefenon et al. (2003) utilizando Polimorfismo de Tamanho de Fragmento Amplificado (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - AFLP), analisaram a eficiência informativa dos marcadores AFLP investigando a diversidade genética intrapopulacional de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista do Estado de Santa Catarina concluíram que a técnica AFLP foi eficiente na análise de diversidade genética de populações naturais de *Araucaria angustifolia*.

Stefenon et al. (2004) desenvolveram um protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPD para a análise da diversidade genética de populações naturais da espécie (SC, SP) e demonstraram ao final a eficiência do marcador como ferramenta para estudos genéticos.

Usando a técnica de sequenciamento, Hampp et al. (2000) investigaram sequências de DNA para identificar melhores procedências de *A. angustifolia* para reflorestamento em áreas de pastagem na região de ocorrência da espécie. Para isso, analisaram a distinção de sementes (SC, PR, SP, RJ, MG). Ao final identificaram um fragmento de 2 Kpb de comprimento e a frequência desse fragmento ocorre em paralelo com o número, duração e intensidade de geadas. Mesmo não sendo uma sequência típica de microssatélites, este fragmento pode ser utilizado como marcador para triagem de ecótipos da *Araucaria angustifolia*.

As informações obtidas dos trabalhos citados são importantes para o conhecimento dos aspectos genéticos da espécie. Dados sobre a estrutura, diversidade, fluxo de pólen e índices de endogamia da espécie foram obtidos principalmente para populações de *A. angustifolia* de ocorrência na região Sul do país. Os resultados apontam para alta diversidade genética para indivíduos adultos e altos índices de endogamia nas progênies. As informações resultantes desses trabalhos, juntamente com dados ecológicos da espécie deveriam servir de base para a elaboração da legislação ambiental para a conservação e gestão da espécie. Entretanto, infelizmente a legislação vigente não considera trabalhos científicos realizados com a espécie, gerando uma lacuna de informação extremamente importante para a sua conservação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização das Populações e Coleta de Material

As populações amostradas de *Araucaria angustifolia* encontram-se no domínio Atlântico (AB'SABER, 2003; VELOSO; RANGEL FILHO; LIMA, 1991). Em geral, seu entorno é composto por Floresta Ombrófila Mista, inseridas em uma matriz antropizada, com áreas destinadas ao cultivo de monoculturas ou pastagem. De acordo com a classificação de Koeppen o clima na região é subtropical, mesotérmico, úmido, com estação seca e média pluviométrica anual de 2.000 mm.

Para o estudo de diversidade genética, acículas de *A. angustifolia* foram coletadas em nove localidades no estado de Minas Gerais (Tabela 1, Figura 10). As amostras foram coletadas aleatoriamente por caminhamento, respeitando uma distância mínima de 100 m para evitar coleta de indivíduos aparentados. Foram coletadas acículas de 50 indivíduos por localidade, pois segundo Carlini-Garcia, Vencovsky e Coelho (2001), este número é o mínimo recomendado para a amostragem da população para a espécie. As amostras foram acondicionadas em saco plástico, contendo sílica gel para desidratação do tecido. Ao término das coletas, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas, do Departamento de Ciências Florestais, da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais onde foram armazenados a uma temperatura de -20 °C até o momento da extração do DNA.

A amostragem se diferenciou dos trabalhos já realizados com a espécie pela particularidade da sua ocorrência nestes locais. Nas áreas amostradas é pouco frequente encontrar fragmentos com indivíduos de *Araucaria angustifolia*, pois estes encontram-se distribuídos de forma esparsa, dificultando a coleta de outra forma.

Tabela 1 Local e tamanho amostral utilizados para o estudo de diversidade genética de *Araucaria angustifolia*

Local	Códigos	N	Coordenadas (S/W)		Alt. (m)
Aiuruoca	AI	50	21°58'33" S	44°36'10" W	989
Alagoa	AL	50	22°10'14" S	44°38'31" W	1132
Bocaina de Minas	BO	50	22°10'04" S	44°23'42" W	1210
Delfim Moreira	DM	50	22°30'32" S	45°16'48" W	1200
Extrema	EX	50	22°51'18" S	46°19'04" W	973
Gonçalves	GO	50	22°39'32" S	45°51'21" W	1350
Itamonte	IT	50	22°17'02" S	44°52'12" W	933
Liberdade	LI	50	22°01'44" S	44°19'12" W	1152
Passa Quatro	PQ	50	22°23'24" S	45°58'01" W	938
Total		450			

N = Tamanho amostral.

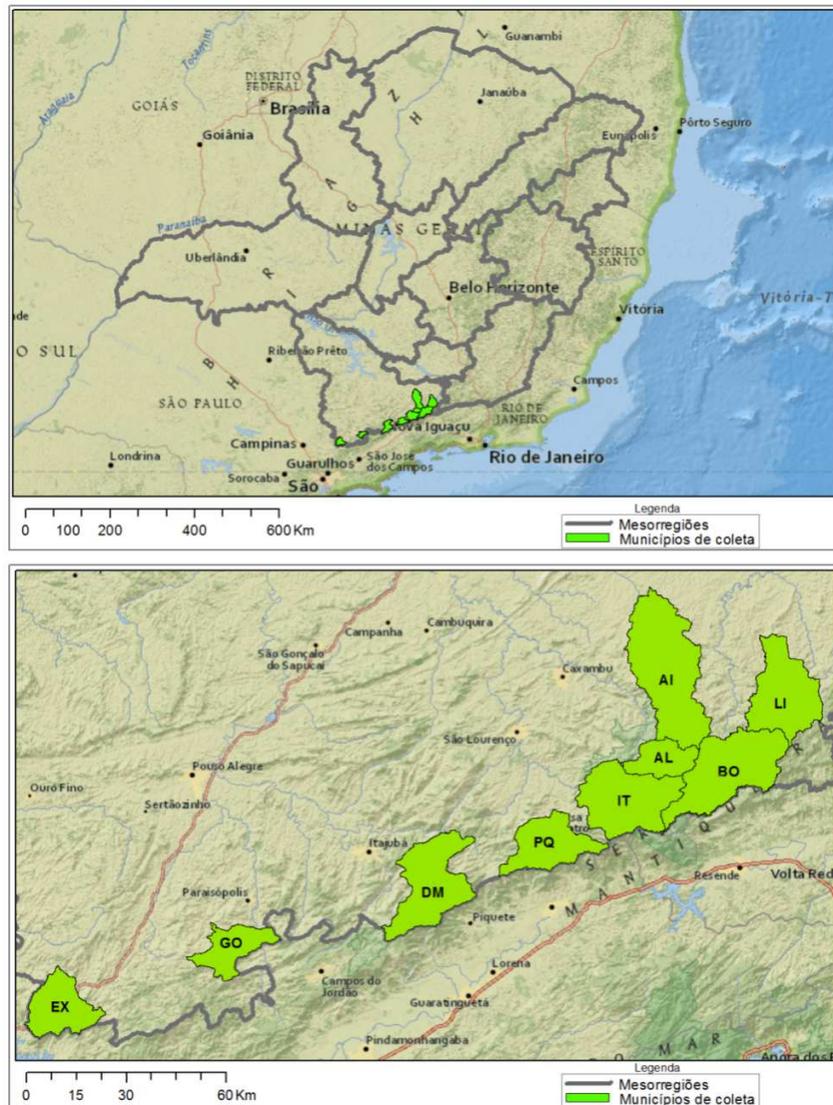


Figura 10 Localização das populações amostradas de *Araucaria angustifolia*. MG, Imagem: ARCGIS v.10.1. EX (Extrema), GO (Gonçalves), DM (Delfim Moreira), PQ (Passa Quatro), IT (Itamonte), AL (Alagoa), AI (Aiuruoca), BO (Bocaina de Minas) e LI (Liberdade)

4.2 Extração do DNA e PCR-SSR

A extração de DNA genômico dos indivíduos coletados de *A. angustifolia* foi realizada pelo método descrito em Mazza e Bittencourt (2000). Após a extração, o DNA foi solubilizado em TE (Tris 1mM; EDTA 1mM) e armazenado à -20 °C até o momento da reação de PCR-SSR. O DNA concentrado foi diluído em água esterilizada Milli-Q a uma concentração final de 10 ng/mL para os testes com marcadores microssatélites. Dos 20 pares de marcadores microssatélites disponíveis para *A. angustifolia*, oito foram selecionados para amplificação em três sistemas multiplex (Tabela 2).

A amplificação dos fragmentos de DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-SSR) foi realizada no Laboratório de Bioengenharia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Ponta Grossa, utilizando o Qiagen Multiplex PCR Master Mix num volume final de 10 µL, que continha 5 µL de PCR Master Mix (2x), 1 µL de pares de *primers* (2 mM de cada *primer*) 2 µL de DNA genômico (10 ng/µL), e 1 µL de solução-Q e água Milli-Q.

O programa de PCR utilizado no termociclador envolveu: (1) um passo inicial de desnaturação do DNA e de ativação da Taq polimerase em 95 °C durante 15 minutos; (2) 35 ciclos de amplificação em três fases (94 °C durante 30 s, temperatura de anelamento por 90 s e extensão a 72 °C durante 60 s); e (3) uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Após a amplificação, 10 µL de água Milli-Q autoclavada foram adicionados a cada amostra e estas refrigeradas a 4 °C até a genotipagem.

Para genotipagem foi utilizada uma solução de volume final de 10 µL contendo 2 µL da solução dos fragmentos amplificados de cada amostra, 0,125 µL de padrão sequenciador LIZ GS 600 e o volume restante com Hi-Di formamida. O polimorfismo foi detectado pela rotulagem de pares de *primers* SSR marcados com corantes fluorescentes nas combinações triplex ou duplex,

seguido por electroforese capilar para detectar fragmentos no sequenciador automático ABI 3500xL GeneticAnalyzer (AppliedBiosystems) no Departamento de Bioquímica da UFPR – Campus de Curitiba. O tamanho dos fragmentos amplificados (alelos) foi determinado utilizando o *software* GeneMapper v.4.1 (AppliedBiosystems) e os valores relativos ao tamanho dos alelos foram exportados para planilha de Excel para as análises estatísticas.

Tabela 2 Combinações Multiplex para *Primers* SSR de *Araucaria angustifolia* usadas neste estudo

<i>Primer</i>	<i>Dye</i>	<i>Multiplex</i>	<i>Temp. de anelamento °C</i>	<i>Elementos repetidos</i>	<i>Fragmentos (pb)</i>	<i>Autor</i>	<i>Araucaria</i>	<i>Acesso GenBank</i>
Ag 45	Fam	I	57.8°C	(GT) ₄	160 – 162	Salgueiro et al., (2005)	<i>A. angustifolia</i>	AJ749966
AS 190	Ned	I	57.8°C	(AT) ₈ (GT) ₁₂	195 – 201	Robertson et al., (2004)	<i>A. subulata</i>	AY426083
CRCAC1	Fam	I	57.8°C	(GA) ₁₉	170 – 282	Scott et al., (2003)	<i>A. cunninghamii</i>	AF522871
Ag 20	Fam	II	59.3 °C	(GA) ₁₂	231 – 249	Salgueiro et al., (2005)	<i>A. angustifolia</i>	AJ749964
Ag 56	Ned	II	59.3 °C	(TC) ₁₁	140 – 152	Salgueiro et al., (2005)	<i>A. angustifolia</i>	AJ749967
Aang 14	Fam	III	56.5 °C	(GA) ₂₇	200 – 224	Schmidt et al., (2007)	<i>A. angustifolia</i>	AY865583
Aang 28	Hex	III	56.5 °C	(CT) ₁₁	148 – 160	Schmidt et al., (2007)	<i>A. angustifolia</i>	AY865592
CRCAC2	Ned	III	57.8°C	(GA) ₂₃	170 – 210	Scott et al., (2003)	<i>A. cunninghamii</i>	AF522871

4.3 Análises Estatísticas

Para cada população, foi realizado o teste de desequilíbrio de ligação para verificar se os loci usados nas análises são amostrados de forma independente do genoma. O teste foi realizado pelo *software* FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2002), aplicando-se a correção de Bonferroni com múltiplas permutações (RICE, 1989).

4.3.1 Detecção de Alelos Nulos

Os microssatélites são marcadores de DNA codominantes, amplamente utilizados em biologia da conservação, ecologia e filogenia por serem altamente polimórficos, terem alta reprodutividade e simplicidade do uso da PCR, porém frequentemente são detectados alelos nulos, *stutter* (repetições mais curtas ou mais longas que o verdadeiro alelo - locos adicionais) e *dropout* (são alelos que aparecem bastante afastados da série principal). A presença de alelos nulos, *stutters* e *dropout* podem levar a desvios nas proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg devido ao excesso de homozigotos. Para detectar possíveis erros na genotipagem, foi utilizado o *software* Micro Checker Versão 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004), a significância foi obtida por 1.000 permutações e intervalo de confiança a 95% com 10.000 reamostragens. A frequência de alelos nulos em cada locus foi ajustada usando o estimador Oosterhout que considera as amostras não amplificadas como DNA degradado, erro humano, etc.; a frequência dos alelos nulos é estimada a partir do cálculo prévio das frequências alélicas de todos os loci visíveis. A frequência dos alelos nulos também foi calculada pelo método de Dempster, Laird e Rubin (1977), utilizando o *software* FreeNA (CHAPUIS; ESTOUP, 2007).

4.3.2 Diversidade Genética

Para caracterizar a diversidade genética, foram estimados para cada locus e para cada população: a riqueza alélica ou número médio de alelos (K), o número de alelo efetivo por locus (A_e), a heterozigosidade observada (H_o) e a heterozigosidade esperada (H_e) segundo expectativas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando-se o *software* GDA (LEWIS; AZYKIN, 2002). A aderência das frequências genótípicas às proporções esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testada por meio do teste exato (GUO; THOMPSON, 1992) com o *software* GenAlEx (PEAKALL; SMOUSE, 2012) para cada população, a combinação das probabilidades foi realizada pelo método de Fisher (2000). As estimativas do índice de fixação médio dentro de populações (\bar{f}), do índice de fixação total para o conjunto das populações (\bar{F}) e da divergência entre populações ($\bar{\theta}_P$) com intervalo de confiança a 95% foram obtidas por 10.000 reamostragens utilizando-se o *software* GDA (LEWIS; AZYKIN, 2002). A diferenciação genética foi estimada pela estatística F_{ST} clássica de Wright (NEI, 1977) e pela estatística G_{ST} de Hedrick (HEDRICK, 2005) utilizando-se o *software* GDA_NT (DEGEN, 2006). A estimativa de diferenciação genética também foi realizada usando o método de estimativas de alelos nulos (ENA) (10.000 permutações) implementado pelo programa FreeNA (CHAPUIS; ESTOUP, 2007), que corrige a presença de alelos nulos. A estimativa de fluxo gênico (N_m) e a frequência alélica foram obtidas com o *software* GenAlEx (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

4.3.3 Estrutura Genética

Foi estimada a distância de Nei (DN) (NEI, 1978). A DN foi estimada entre pares de população utilizando o *software* GenAIEx (PEAKALL; SMOUSE, 2012). O *software* FreeNA (CHAPUIS; ESTOUP, 2007) foi utilizado na correção estimativa de alelos nulos (ENA) (10.000 permutações) descrita pelos autores para DN, as estimativas são corrigidas para alelos nulos pelo algoritmo de Dempster, Laird e Rubin (1977). A matriz de distância genética (DN) utilizada para construção de um dendrograma foi construída de acordo com o método UPGMA (método da média não ponderada) com o *software* NTSYS-pc 2.0 (ROHLF, 2001). As estimativas de divergência populacional foram quantificadas pela estimativa do $\tilde{\theta}_p$, também foi calculada uma análoga a esta, denominada R_{ST} , pelo *software* GenAIEx (PEAKALL; SMOUSE, 2012). Adicionalmente foi estimado o G_{ST} , segundo método de Hedrick (2005), utilizando o programa GDA_NT (DEGEN, 2006) e o F_{ST} de Wrigth (NEI, 1977). A análise das coordenadas principais (PCoA) (SMITH, 2002) foi realizada utilizando o *software* GENALEX (PEAKALL; SMOUSE, 2012) com base nos valores de R_{ST} , calculados para os dados originais de frequências alélicas e genotípicas. No intuito de testar a hipótese de isolamento por distância, foi aplicado o teste de Mantel (SLATKIN, 1995), comparando matriz de distância genética entre pares de população e matriz de distância geográfica utilizando o *software* NTSYS-pc 2.0 (ROHLF, 2001).

A variação genética dos indivíduos dentro e entre populações foi avaliada por análise de variância molecular (AMOVA) utilizando o *software* GENALEX (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

A análise da estrutura genética populacional foi realizada com base em modelo de agrupamento Bayesiano, utilizando o *software* STRUCTURE 2.2 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), sendo os indivíduos agrupados de acordo com seus genótipos em K populações variando de 1 a 10. Cada execução foi realizada quatro vezes de forma independente para cada valor de K. O parâmetro assumido foi o “admixture” com *burn-in* 100.000 repetições para 50.000 interações. A análise foi feita de acordo com Earl e Von Holdt (2012). O número de agrupamentos foi determinado de acordo com o STRUCTURE HARVEST (EARL; VON HOLDT, 2012). Para indicar a presença de descontinuidade genética no espaço geográfico foi utilizado o *software* Barrier v.2.2 (MANNI; GUERARD; HEYER, 2004). As populações são conectadas pelo método de triangulação de Delaunay, identificadas pelo algoritmo de Monmonier (MANNI; GUERARD; HEYER, 2004) a partir das coordenadas geográficas obtidas pelo Sistema de Posicionamento Global (GPS) e das distâncias genéticas (F_{ST}). Com as coordenadas geográficas de cada população, é construído um mapa, aplicando o método de triangulação de Delaunay para conectá-las em uma rede, formada por um conjunto de três pontos (ABC), sendo ligados somente se um círculo que passe sobre elas não inclua nenhuma outra população. Segundo o método proposto por Legendre e Legendre (1998), a descontinuidade dos dados multivariados foi obtida pela divisão das distâncias genéticas de cada ligação ABC da rede pela distância geográfica. A descontinuidade é delimitada pelos valores mais elevados encontrados ao longo da rede de Delaunay (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998; MANEL et al., 2003). As barreiras são identificadas a partir do algoritmo de Monmonier (MANNI; GUERARD; HEYER, 2004).

4.3.4 Estrutura Genética Espacial

Como proposto por Loiselle et al. (1995), estimou-se o coeficiente de coancestria multiloco (F_{ij}) entre plantas para diferentes classes de distância. A análise foi realizada com o auxílio do *software* SPAGeDi versão 1.2 (HARDY; VEKEMANS, 2002). O coeficiente de coancestria estima a probabilidade de identidade dos alelos em dois genes homólogos amostrados da mesma maneira (GONÇALVES et al., 2010), neste caso assume-se a ausência de endogamia, ou seja, o coeficiente de endogamia foi considerado igual a zero. Por meio da reamostragem *Jackknife*, o erro padrão da média das estimativas foi obtido, sendo utilizado na construção de intervalos de confiança a 95% de probabilidade para o coeficiente médio de coancestria, estimado para as classes de distância, conforme Hardy e Vekemans (2002). Em cada classe de distância foram realizadas 1.000 permutações, para testar se ocorre a estruturação genética espacial. A extensão da estrutura genética espacial nas populações estudadas foi estimada pela estatística S_p que permite a comparação da magnitude da estrutura genética espacial entre populações diferentes (VEKEMANS; HARDY, 2004). A magnitude foi calculada pela fórmula $S_p = -\text{blog}(1 - F_{ij}(1))$, em que blog é a inclinação da curva de regressão do coeficiente de coancestria e $F_{ij}(1)$ é a média do coeficiente de coancestria da primeira classe de distância (F_{ij}).

4.3.5 Aderência ao Equilíbrio de Mutação e Deriva

Para testar se as populações estão em Equilíbrio entre Mutação e Deriva, que pode indicar gargalo genético, foi utilizado o *software* Bottleneck 2.1.2 (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999). A metodologia descrita por Cournet e Luikart (1996) baseia-se no princípio de que populações que experimentam uma recente redução em seu tamanho efetivo populacional apresentam uma redução

do número de alelos e diversidade genética (H_e) ou esperada pelas proporções de EHW. Nesse caso o número de alelos é reduzido mais rapidamente do que a heterozigosidade (H_e) o que faz com que H_e se torne maior do que a heterozigosidade esperada sob Equilíbrio entre Mutação e Deriva (H_{eq}) uma vez que H_{eq} é calculada a partir do número de alelos (COURNET; LUIKART, 1996; PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999).

O teste para verificar se as populações de *A. angustifolia* passaram por uma redução recente na diversidade genética foi conduzido usando três modelos de mutação: Modelo de Alelos Infinitos (IAM), que supõe que cada mutação cria um novo alelo; Modelo Simples de Mutação (SMM), em que a cada mutação ocorre o ganho ou a perda de uma repetição e o Modelo de Passos de Mutação (TPM) que é intermediário aos modelos anteriores sendo adequado para a maioria dos conjuntos de dados microssatélites (DI RIENZO et al., 1994). A significância foi obtida por meio do teste de Wilcoxon por ser robusto para amostras com pequeno número de locos polimórficos (< 20) (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999).

As taxas de migração foram estimadas utilizando o programa GeneClass 2 v.2 (PIRY; LUIKART; CORNUET, 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado do teste de desequilíbrio de ligação mostrou que não houve desequilíbrio significativo, após a correção de Bonferroni ($p < 0,001$). Portanto, os oito loci utilizados foram usados para todas as análises genéticas.

5.1 Detecção de Alelos Nulos

O teste para detecção de alelos nulos não indicou a presença de *stutters* e *dropout*, no entanto, mostrou a presença de alelos nulos para os loci Ag45 e AG56. A frequência estimada de alelos nulos para o locus Ag45 variou de 21,6% nas populações amostradas em IT e 28% em AL e para o locus Ag56 foi de 24,4% em DM, 8% em IT e 10% em LI. Portanto, alelos nulos foram observados no locus AG45 em duas das nove populações (IT e AL) e no locus AG56 em três populações (DM, IT e LI).

A presença de alelos nulos em marcadores microssatélites é frequente, pois podem surgir por falhas na amplificação ou quando uma sequência de mutação altera uma ou ambas as regiões flangeadoras (CALLEN et al., 1993). A presença de alelos nulos acima de 25% pode alterar os resultados de várias estimativas como o número de alelos, heterozigosidade, o índice de endogamia (DEWOOD; NASON; HIPKINS, 2006) e a distância genética (CHAPUIS; ESTOUP, 2007).

A presença de alelos nulos foi detectada nas populações localizadas em DM, IT, AL e LI, com frequência variando de 8 a 28%. Alguns estudos sugerem que a ocorrência de alelos nulos em baixa frequência ($< 25\%$) não interferem na avaliação da estrutura de populações. Segundo revisão realizada por Dakin e Avise (2004), 90% dos artigos relatam a ocorrência de loci microssatélites com alelos nulos, sendo esses loci incluídos na análise sem correção para potencial

viés. Também relatam que em 233 artigos publicados, os alelos nulos com uma frequência inferior a 20% têm um impacto mínimo nos estudos de parentesco. Kelly et al. (2011) citam que os alelos nulos com frequências inferiores ou iguais a 25% mostraram ter efeitos irrelevantes na avaliação da estrutura populacional. Já neste estudo, apenas o locus AG45 na população de AL teve frequência superior a 25% (28%). A estimativa da diferenciação genética e da distância genética, efetuada pelo método de estimativa de alelos nulos (ENA) pelo *software* FreeNA (CHAPUIS; ESTOUP, 2007), mostraram que estes alelos nulos não influenciaram os resultados obtidos, sendo que os valores com correção e sem correção não se diferenciaram (F_{st} sem ENA: 0,0170/ F_{st} usando ENA: 0,0168).

5.2 Índices de Diversidade Genética

A análise dos oito loci, no total de 450 genótipos avaliados, detectou 65 alelos e todos os loci foram polimórficos. O número de alelos por locus (K) e o número de alelos efetivos (A_e) foram os mesmos para todos os locos avaliados, com média de 8,125. O número de alelos por locus variou de dois (Ag45) a 15 (CRC2) com média de oito alelos por locus. A heterozigosidade observada variou de 0,31 (Ag45) a 0,98 (Ag20) e a heterozigosidade esperada (H_e) variou de 0,46 (AG45) a 0,90 (CRC2) com média de 0,77 (Tabela 3). O índice de fixação total foi negativo (- 0,067).

Tabela 3 Parâmetros genéticos para loci microssatélites considerando o conjunto das populações de *Araucaria angustifolia*

Loco	N	K	H _e	H _o	F
Ag45	431	2	0,46	0,31	0,336
CRCAC1	430	4	0,67	0,87	-0,302
AS190	431	7	0,80	0,91	-0,127
Ag20	410	10	0,85	0,98	-0,150
Ag56	401	7	0,79	0,73	0,074
Ag14	435	13	0,84	0,96	-0,143
Ag28	434	7	0,83	0,92	-0,111
CRCAC2	435	15	0,90	0,89	0,018
Média	426	8,125	0,77	0,82	-0,067

N= número de indivíduos amostrados, K = número de alelos, H_e= diversidade genética, H_o= heterozigosidade observada, F: índice de fixação total.

Nas populações avaliadas, o número médio de alelos por locus (K) variou de 6,25 (LI) a 7,13 (PQ, IT). Os valores de diversidade genética foram próximos nas populações amostradas com H_e médio de 0,77 (Tabela 4). O coeficiente de endogamia foi negativo (-0,09) indicando ausência nos desvios de panmixia, confirmado pela proximidade dos valores de H_e e H_o. Para a média das populações, o índice de fixação (f) para os loci foi diferente de zero (Tabela 3). Os maiores índices de fixação para o conjunto de populações foram obtidos pelos loci AG45 e Ag56, o valor médio entre locus para foi de -0,067, sugerindo a ausência de endogamia.

Tabela 4 Parâmetros genéticos para as populações de *Araucaria angustifolia*

População	N	Aex	Ae	He	Ho	f
DM	45	0,020	6,75	0,73	0,80	-0,09
PQ	46	-	7,13	0,76	0,84	-0,09
IT	45	0,020	7,13	0,76	0,81	-0,06
AL	44	0,014/0,016	6,75	0,77	0,84	-0,09
AI	49	-	6,63	0,73	0,77	-0,05
LI	50	-	6,25	0,73	0,83	-0,13
BO	49	0,010	6,63	0,76	0,81	-0,06
GO	49	-	6,5	0,77	0,81	-0,05
EX	47	-	6,38	0,75	0,86	-0,15
Média	47		6,68	0,76	0,82	-0,09

N= número de indivíduos amostrados, Ar = alelos exclusivos, Ae= número efetivo de alelos por locus, H_e= diversidade genética, H_o= heterozigossidade observada, f: índice de fixação.

A frequência dos alelos apresentou ampla variação entre as populações. A presença de alelos exclusivos e de baixa frequência foi observada nas populações DM (0,020), IT (0,020), AL (0,014 e 0,016) e BO (0,010) (ANEXO G). Foram detectados 5,3% de alelos com frequência inferior a 5%, considerados raros; 60,4% de alelos intermediários ($5 < \% < 25$) e 34,3% de alelos comuns ($\% > 25$).

A probabilidade do método de Fisher (2000) indicou que os oito loci apresentam desvios significativos das proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 Probabilidades exatas (Teste Exato de Fisher (2000)) dos desvios das proporções de Hardy Weinberg em loci microsatélites nas populações de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze

	Ag45	CRCAC1	AS190	Ag20	Ag56	Ag14	Ag28	CRCAC2
DM	0,150ns	0,000***	0,004**	0,000***	0,000***	0,066ns	0,041*	0,000***
PQ	0,006**	0,000***	0,016*	0,000***	0,004**	0,001**	0,004**	0,000***
IT	0,002**	0,007**	0,076ns	0,000***	0,107ns	0,000***	0,000***	0,000***
AL	0,000***	0,000***	0,000***	0,000***	0,028*	0,000***	0,000***	0,000***
AI	0,007**	0,088ns	0,000***	0,000***	0,464ns	0,000***	0,000***	0,000***
LI	0,858ns	0,000***	0,000***	0,000***	0,002**	0,000***	0,016*	0,000***
BO	0,337ns	0,007**	0,000***	0,000***	0,083ns	0,000***	0,000***	0,000***
GO	0,032*	0,000***	0,000***	0,000***	0,358ns	0,000***	0,000***	0,000***
EX	0,331ns	0,000***	0,002**	0,000***	0,014*	0,001***	0,000***	0,000***

ns= não significativo, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001

O número de alelos (65) encontrado neste estudo foi alto, assim como a variação do número de alelos entre os loci, sendo de 2 (Ag45) a 15 (CRC2), com média de 8,125 alelos por locus (Tabela 3). Este resultado é próximo a valores encontrados em outros estudos realizados com a espécie. Na Tabela 6, são apresentados os dados referentes aos estudos genéticos realizados com a espécie, em florestas contínuas e fragmentadas na região Sul do país. Já este estudo foi realizado na região da Serra da Mantiqueira (MG), onde a espécie ocorre de forma esparsa. Na região, raramente são encontrados fragmentos com *A. angustifolia*, sendo mais comum a ocorrência de indivíduos isolados em uma matriz antropizada, portanto, pode-se classificar o ambiente amostrado como fragmentado.

Tabela 6 Dados dos estudos realizados com a espécie *Araucaria angustifolia*

Fonte	Marcador	Pop.	Locos	Indivíduos	A	Ae(M)	He
Shimizu et al. (2000)	Isoenzima	1	8	120		-	0,25
Auler et al. (2002)	Isoenzima	9	15	328	33	1,3/1,9(1,6)	0,11
Mantovani et al. (2006)	Isoenzima	1	16	334	26	-	0,17
Ferreira et al. (2012)	Isoenzima	1	9	278	26	-	0,11
Salgueiro et al. (2005)	SSR	3	8	60	49	3/11(7,12)	0,34
Stefenon et al. (2007)	SSR	6	5	384	73	7/21(14,6)	0,71
Bittencourt & Sebbenn (2007)	SSR	1	8	228	77	4/16(9,6)	0,59
Bittencourt & Sebbenn (2008)	SSR	1	8	298	62	3/15(7,75)	0,58
Bittencourt & Sebbenn (2009)	SSR	1	8	1.179	106	4/20(13,25)	0,58
Patreze& Tsai (2010)	SSR	1	6	105	70	5/18(11,7)	0,74
Sant'anna et al.(2013)	SSR	1	9	513	86	3/22(9,56)	0,63
Medina-Macedo et al. (2015)	SSR	2	10	869	81	4/16(8,1)	0,70
Neste estudo	SSR	9	8	450	65	2/15(8)	0,77

Pop. = número de populações estudadas; A= quantidade total de alelos; Ae(M) = variação de alelos por loco (média de alelos por loco); He= diversidade genética.

Para uma comparação mais real dos dados obtidos neste trabalho, foram selecionados os trabalhos com *A. angustifolia* que utilizaram os mesmos loci microssatélites (Tabela 7), sendo estes Ag45, CRCAC1, AS190, Ag20, Ag56, Ag14, Ag28 e CRCAC2.

Neste estudo, foram analisadas nove populações de *A. angustifolia* com um total de 450 indivíduos, utilizando oito loci microssatélites, sendo detectados 65 alelos que tiveram variação entre dois e 15 alelos por locus com média 8,12, a diversidade genética (H_e) variou de 0,46 e 0,90 com média de 0,77. Salgueiro et al. (2005), usando oito loci microssatélites em três populações (RJ, PR e SC) de *A. angustifolia*, detectaram de três a 11 alelos, com média de 7,12 alelos por locus. Os valores de alelos por locus são próximos aos obtidos neste trabalho (Tabela 6). Em relação ao H_e , Salgueiro et al. (2005) detectaram valores de 0,39; 0,17 e 0,37 para as populações amostradas em RJ, PR e SC respectivamente. Nota-se uma diferença considerável em relação aos valores encontrados neste estudo (0,85; 0,46 e 0,79) (Tabela 3). A diferença no H_e pode ser em decorrência do número de populações analisadas e também pelo fato de Salgueiro et al. (2005) terem utilizado a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, diferente do estudo deste trabalho em que se utilizou o sequenciador automático.

Bittencourt e Sebbenn (2007) utilizaram oito loci microssatélites para a análise de paternidade e investigação do modelo de dispersão de pólen e semente, para isso, avaliaram 228 indivíduos adultos de *A. angustifolia* e detectaram 77 alelos, variando de quatro a 16 (média 9,6) alelos por locus. O número de alelos observado foi próximo ao encontrado neste trabalho (Tabela 6). Os valores de diversidade genética considerando os mesmos locos, exceto AG20, corroboraram com os resultados deste trabalho, porém os valores estimados aqui foram maiores quando comparados à média dos valores encontrados por Bittencourt e Sebbenn (2007) (Tabela 7). Bittencourt e Sebbenn

(2008) usando oito loci detectaram 62 loci em 298 indivíduos adultos e detectaram um número de alelos semelhante ao aqui obtido (Tabela 6). Os valores de diversidade genética obtidos neste trabalho foram mais elevados do que os valores encontrados por Sant'anna et al. (2013) que utilizaram nove loci para analisar 513 indivíduos e detectaram 86 alelos. O número de alelos por locus e o valor de H_e foram semelhantes aos encontrados neste trabalho, exceto para o loco Ag20, que foi inferior. Considerando o valor médio de H_e (0,63), este valor foi menor quando comparado ao aqui obtido (0,77). Medina-Macedo et al. (2015) utilizaram oito loci microsatélites na análise de 295 indivíduos de *A. angustifolia*, e o número de alelos obtido foi diferente no loco Ag 45 (6), comparado ao encontrado neste estudo (2) (Tabela 7). Os valores de H_e foram próximos aos obtidos por Medina-Macedo et al. (2015), exceto para o loco Ag20 cujo valor foi menor, entretanto, na média, o valor de H_e (0,70) para o conjunto de locos avaliados foi semelhante ao obtido neste estudo (0,77).

Tabela 7 Número de alelos por loco dos principais estudos realizados com a espécie *A. angustifolia*

	Ag45	CRC1	AS190	Ag20	Ag56	Ag14	Ag28	CRC2
Atual trabalho	2	4	7	10	7	13	7	15
Salgueiro et al. (2005)	3	----	----	8	6	----	----	----
Stefenon et al. (2007)	7	----	----	18	----	----	----	14
Bitencourt e Sebbenn (2007)	4	5	----	8	8	----	----	16
Bitencourt e Sebbenn (2008)	3	5	----	7	6	----	----	10
Patreze e Tsai (2010)	----	----	----	----	9	15	----	----
Sant'ana et al. (2013)	3	3	----	8	6	----	----	12
Medina-Macedo et al. (2015)	6	7	9	10	8	8	6	----

Os resultados obtidos aqui neste trabalho indicam que as populações de *A. angustifolia* estudadas possuem uma diversidade genética alta quando se comparada aos estudos citados. Entretanto, é difícil comparar resultados de parâmetros genéticos entre populações de uma mesma espécie, pois as avaliações são realizadas com o número de indivíduos amostrados e loci diferentes. Deve-se considerar também que, o fato dos marcadores serem produzidos por empresas diferentes e os dados serem analisados em diferentes equipamentos, contribuem para a obtenção de dados divergentes (MEDINA-MACEDO et al., 2015). A diversidade genética (H_e) estimada para as nove populações analisadas é considerada alta para as espécies arbóreas (0,76).

Detectou-se desvio significativo das expectativas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (Tabela 5) nos oitos loci microssatélites utilizados neste estudo, porém, não foi detectada a deficiência de heterozigotos. Não foi observado desequilíbrio de ligação significativo, após a correção Bonferroni, sendo que a proporção de alelos nulos ocorreu em baixa taxa não interferindo nos resultados. Os desvios do EHW podem ser resultados da análise para testar a aderência ao Equilíbrio de mutação e deriva, os quais indicaram que oito das nove populações passaram por uma redução recente no tamanho populacional, de acordo com o modelo TPM que é o mais indicado para analisar conjunto de dados de microssatélite (Tabela 13). Os resultados indicam a presença de gargalo genético nas populações, o que pode estar levando a um declínio genético dessas populações. Provavelmente na próxima geração ocorrerá uma diminuição da diversidade genética, pois os efeitos da endogamia somente são observados após algum distúrbio e o declínio da diversidade genética ocorre lentamente ao longo de gerações sucessivas (AGUILAR et al., 2008; KRAMER et al., 2008).

5.3 Estrutura Genética

A divergência genética entre as populações utilizando o G_{ST} de Hedrick (2005) apresentou maior valor (0,12) quando comparada com o valor encontrado para θ_p (0,019) (WEIR; COCKERHAM, 1984). A divergência utilizando a estatística F_{ST} foi de 0,017, não sendo afetada pela correção ENA (Tabela 8).

Tabela 8 Estatística F (WEIR; COCKERHAN, 1984) para oito loci microssatélites de *Araucaria angustifolia*

Loci	θ_p	$G_{ST(Hedrick)}$
Ag45	0,045	0,094
CRC1	0,011	0,051
AS190	0,010	0,089
Ag20	0,021	0,169
Ag56	0,019	0,129
Ag14	0,014	0,122
Ag28	0,009	0,097
CRC2	0,019	0,234
Média	0,019	0,123

θ_p : divergência genética entre populações; $G_{ST(Hedrick)}$: divergência entre as populações.

A divergência genética total foi de 0,17, sendo a menor observada entre as populações LI e AI (0,001) e a maior entre AL e DM (0,103) (Tabela 9).

Tabela 9 Matriz de divergência genética (Nei, 1978) após correção de alelos nulos (abaixo da diagonal) e distância geográfica (Km) entre os pares de populações de *Araucaria angustifolia* (acima da diagonal)

	DM	PQ	IT	AL	AI	LI	BO	GO	EX
DM	-	35,05	47,66	75,73	90,65	113,10	98,51	61,47	113,05
PQ	0,045	-	14,00	41,18	58,27	78,37	63,50	96,45	148,10
IT	0,052	0,018	-	28,08	44,28	65,59	25,47	108,40	160,22
AL	0,103	0,091	0,041	-	21,42	37,39	25,47	136,46	188,29
AI	0,086	0,073	0,033	0,025	-	30,04	31,98	149,28	200,91
LI	0,100	0,086	0,036	0,046	0,001	-	20,18	173,80	225,63
BO	0,079	0,051	0,036	0,025	0,050	0,052	-	159,92	211,58
GO	0,084	0,051	0,053	0,034	0,078	0,083	0,013	-	51,83
EX	0,091	0,015	0,035	0,055	0,038	0,048	0,035	0,042	-

A divergência genética entre as populações foi quantificada por quatro métodos (Tabela 10). Os resultados diferiram estatisticamente de zero.

Tabela 10 Quantificação de divergência genética entre populações de *Araucaria angustifolia*

Método	Resultado
θ_p	0,019
$F_{ST(Wright)}$	0,017
$G_{ST(Hedrick)}$	0,123
R_{ST}	0,099

Quando se considera o valor de θ_p de 0,019, isso indica que 1,9% da diversidade genética encontra-se entre as populações. A estimativa F_{ST} de 0,017

ficou bem próxima à anterior indicando que 1,7% da diversidade encontram-se distribuídas entre as populações. Os valores das estimativas G_{ST} e R_{ST} foram próximos. Entre as quatro estimativas a mais indicada é o G_{ST} de Hedrick, sua superioridade se deve ao método que considera a frequência dos alelos (raros) e os diferentes tipos de alelos presentes nas populações, além de ser mais apropriada quando o número de loci utilizados é inferior a 20, o que é o caso deste estudo. Assim a estimativa de divergência genética entre as nove populações de *A. angustifolia* foi de 0,123, ou seja, 12% da diversidade genética estão distribuídas entre as populações. Auler et al. (2002) utilizando marcadores isoenzimáticos obtiveram valores de divergência genética para *A. angustifolia* de G_{ST} de 0,056 e F_{ST} de 0,044, uma divergência baixa que foi confirmada pelas estimativas de distâncias genéticas, o mesmo autor comenta que existe uma grande variação na estrutura populacional de gimnospermas. O valor de 5,6% é muito próximo aos 6,8%, uma média de G_{ST} para coníferas polinizadas pelo vento com base em marcadores isoenzimáticos de acordo com Hamrick e Godt 1989.

Bittencourt e Sebbenn (2009), utilizando oito loci microssatélites, encontraram G_{ST} de 0,164 na avaliação de indivíduos adultos em ambiente contínuo, fragmentado e grupo de árvores isoladas na paisagem, indicando que 16,4% da diversidade genética estavam distribuídos entre as populações. Quando o grupo de árvores foi excluído da análise, o valor de G_{ST} foi reduzido para 0,098 indicando a alta contribuição do grupo para a diferenciação entre populações. Quando a análise foi realizada individualmente para os grupos, essa contribuição ficou mais clara, com maior divergência detectada no grupo de árvores, G_{ST} de 0,258; para florestas fragmentadas, o G_{ST} foi de 0,031 e para a população contínua, o G_{ST} foi de 0,026. Os resultados obtidos para o estudo citado anteriormente mostraram uma variabilidade genética maior dentro do que entre as populações, o que representa o comportamento natural das espécies

arbóreas. Os resultados aqui obtidos também mostraram esse comportamento, o valor obtido de 0,123 sugere que tenha ocorrido altos níveis de fluxo gênico histórico entre as populações, possivelmente mesmo antes da exploração da espécie ocorrida nas décadas de 70 e 80, uma vez que a estimativa de fluxo gênico histórico foi de 12. O resultado de divergência genética dentro das populações analisadas está de acordo com os valores relatados para as espécies perenes, polinizadas pelo vento em estágio sucessional final, que apresentam maior diversidade genética dentro das populações (HAMRICK; GODT, 1996).

O dendrograma gerado pelo método UPGMA, com base nas distâncias genéticas entre as populações, mostrou um distanciamento da população DM com as demais (Figura 11) e a formação de dois grupos. O primeiro formado pelas populações de PQ, IT e EX, AI e LI (subgrupo) e o segundo formado por AL, BO e GO com maior similaridade entre as populações de BO e GO.

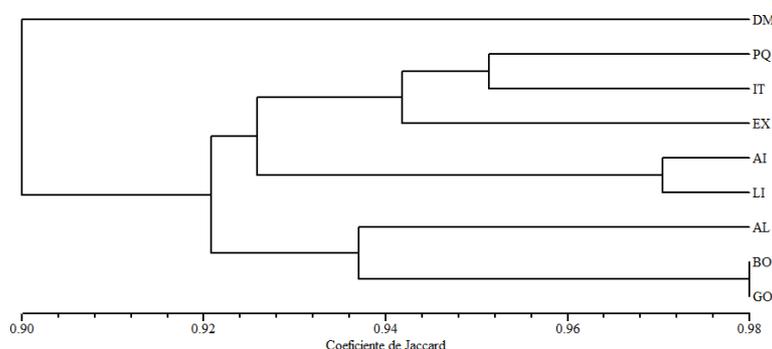


Figura 11 Dendrograma do agrupamento entre pares de populações de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, localizadas no estado de Minas Gerais: DM (Delfim Moreira), PQ (Passa Quatro), IT (Itamonte), AL (Alagoa), AI (Aiuruoca), LI (Liberdade), BO (Bocaina de Minas), EX (Extrema), de acordo com as distâncias Genéticas de Nei (1978)

No dendrograma acima (Figura 11), observa-se a formação de dois grupos principais, sendo um grupo representado pela população de DM e o outro formado pelas demais populações. O grupo formado pelas demais populações é subdividido em três subgrupos de acordo com a similaridade genética. A população EX apresentou similaridade com as populações de PQ e IT, mesmo estando localizada a 154 km de distância das mesmas. As populações com maior similaridade, BO e GO, encontram-se distanciadas de 160 km. Esse resultado corrobora com o valor obtido pelo teste de Mantel, indicando a ausência de correlação entre as distâncias genética e geográfica ($r = 0.08939$ $p = 0.6749$). Esses resultados sugerem que as populações não estão estruturadas em um padrão de isolamento por distância, proposto por Wrigth (1943). A similaridade genética entre as populações de BO e GO, evidenciada pelo dendrograma, também reforça a não estruturação das populações. A análise das coordenadas principais explicou 62,99% (eixo 1) e 34,27% (eixo 2) da diferenciação genética entre as populações de *A. angustifolia* (Figura 12). Estes valores corroboram com o resultado do dendrograma, indicando o isolamento da população DM (Figura 11). A diferenciação da população de DM em relação às demais é pouco explicada pelo isolamento, pois há fluxo entre as mesmas, essa diferenciação pode estar ocorrendo devido a características locais que diferenciam essa população. A distância genética da população de DM em relação às demais também se confirma pelos altos valores de diferenciação genética com as demais populações estudadas (Tabela 9).



Figura 12 Análise das coordenadas principais das populações de *A. angustifolia*

A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que a maior proporção de variabilidade genética ocorre dentro das populações (90%) (Tabela 11). A AMOVA revelou baixa diferenciação genética entre as populações de *A. angustifolia* amostradas. Da diversidade genética total, 10% da variação ocorreram entre as populações ($R_{ST}=0,099$, $p<0,0001$).

Tabela 11 Análise de variância molecular (AMOVA) em populações de *Araucaria. angustifolia*

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Varição%	P
Entre Populações	8	1341784,507	167723,063	10%	0,001
Dentro de Populações	441	11344952,24	25725,515	90%	0,001

GL: graus de liberdade e SQ: soma do quadrado dos desvios.

A análise da variância molecular (AMOVA – Tabela 11) indicou uma baixa divergência genética entre as populações, apesar do G_{ST} ser o modelo

conceitualmente mais indicado, o que mais se ajusta ao conjunto dos dados e o que mais se aproximou foi o $R_{st} = 0,099$. A maioria das espécies perenes e de fecundação cruzada apresenta valor de diversidade genética mais elevado dentro do que entre as populações (NYBOM; BARTISH, 2000).

A análise da estrutura genética populacional com base em modelo de agrupamento Bayesiano realizada no programa STRUCTURE revelou a existência de dois grupos genéticos distintos ($K=2$), como mostra o gráfico com os valores (Figura 13), ou seja, os genótipos de *A. angustifolia* analisados neste trabalho pertencem a dois grupos distintos.

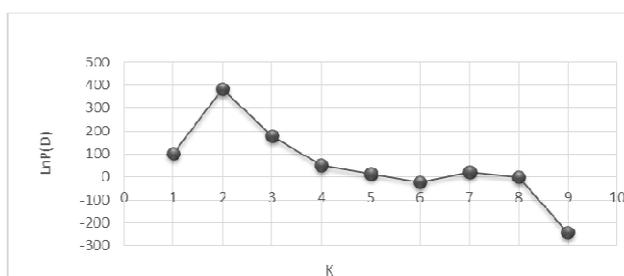


Figura 13 Valores dos agrupamentos genéticos (K) e log da probabilidade média (LnP(D)) obtidos pela análise Bayesiana

Os resultados da análise Bayesiana sugerem uma subdivisão em dois grupos genéticos, indicando que essa divisão representa a estrutura genética das populações estudadas. Foi possível identificar que a população DM é a que mais se distanciou das demais (Figura 13). As populações IT, PQ, AL, AI, LI, BO, GO e EX, que de acordo com o dendrograma apresentaram mais de 92% de similaridade genética, se agruparam em um grande grupo genético. Um fato que pôde influenciar o isolamento da população de DM, é que saindo deste município no sentido divisa dos estados de Minas e São Paulo, a ocorrência de *A. angustifolia* diminui consideravelmente, isolando esta população. Entretanto,

a análise da presença de migrantes pelo programa GeneClass2 (PIRY et al., 2004) revelou a existência de migrantes das populações de LI e AL na população de DM e migrante de DM na população de PQ, indicando a existência de fluxo gênico, provavelmente esse fluxo ocorreu antes da exploração e corte da *A. angustifolia* na região estudada. Para compreender essa diferenciação detectada na população de Delfim Moreira, são necessários estudos complementares nessa população.

A triangulação de *Delaunay*, para verificar a presença de descontinuidades genéticas na paisagem, indicou a existência de pelo menos sete barreiras (Figura 15). É importante ressaltar que as populações amostradas estão localizadas na Serra da Mantiqueira que possui topografia acidentada, apresentando altitudes variando entre 700 m e 2.798,39 m, onde é comum a presença de vales e de várias montanhas secundárias apontadas como prováveis barreiras ao fluxo gênico. Os resultados obtidos pelo programa Barrier, utilizando as diversidades Bayesiana e as coordenadas geográficas, evidenciaram a ocorrência de barreiras geográficas entre as populações estudadas, porém, as barreiras detectadas não interferem no fluxo gênico entre os indivíduos, como foi demonstrado com os resultados da análise de migrantes realizada pelo programa GeneClass2 (PIRY et al., 2004).

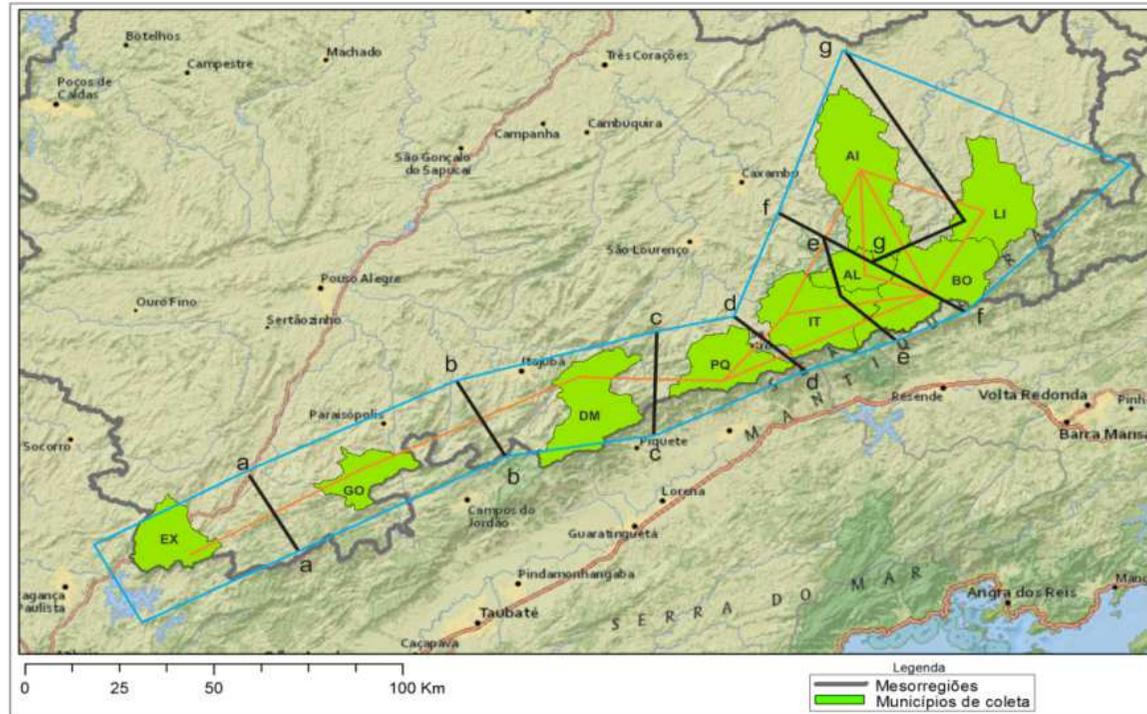


Figura 14 Imagem gerada pelo ARCGIS v.10.1. Representando a triangulação de *Delaunay* (linhas laranja)

Legenda: As linhas em preto (a, b, c, d, e, f, e g) indicam as discontinuidades genéticas para o conjunto de populações de *A. angustifolia*.

5.4 Estrutura Genética Espacial

A distribuição espacial dos genótipos dentro de cada população foi obtida por meio do coeficiente de Kinship de coancestria (HARDY, 2003) entre plantas para cada classe de distância (Figura 16). Os valores dos eixos X e Y apresentam variação de acordo com os valores de coancestria e classes de distância de cada população analisada. No anexo H é possível observar as áreas de amostragem e como os indivíduos estão distribuídos nas mesmas.

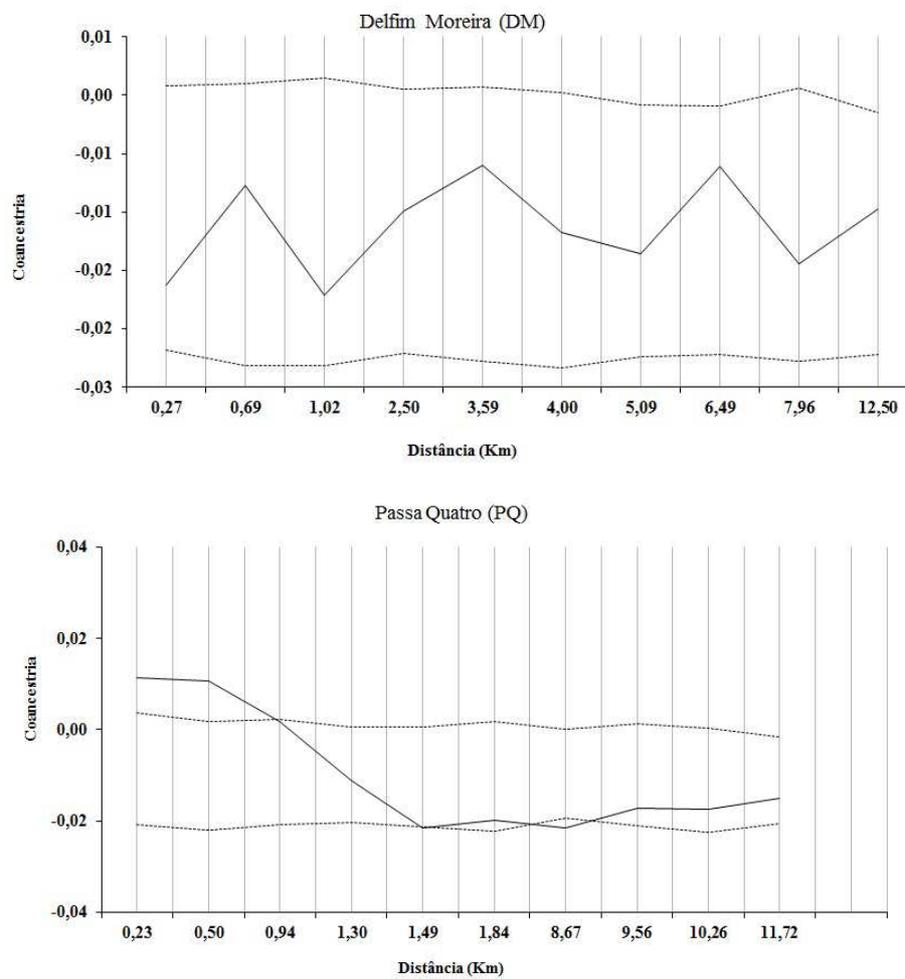


Figura 15 Correlogramas do coeficiente de coancestria (*Kinship*), por classes de distância, para indivíduos de *Araucaria angustifolia* nas populações naturais amostradas na Serra da Mantiqueira, Minas Gerais. Intervalo de confiança a 95% de probabilidade

(...continua...)

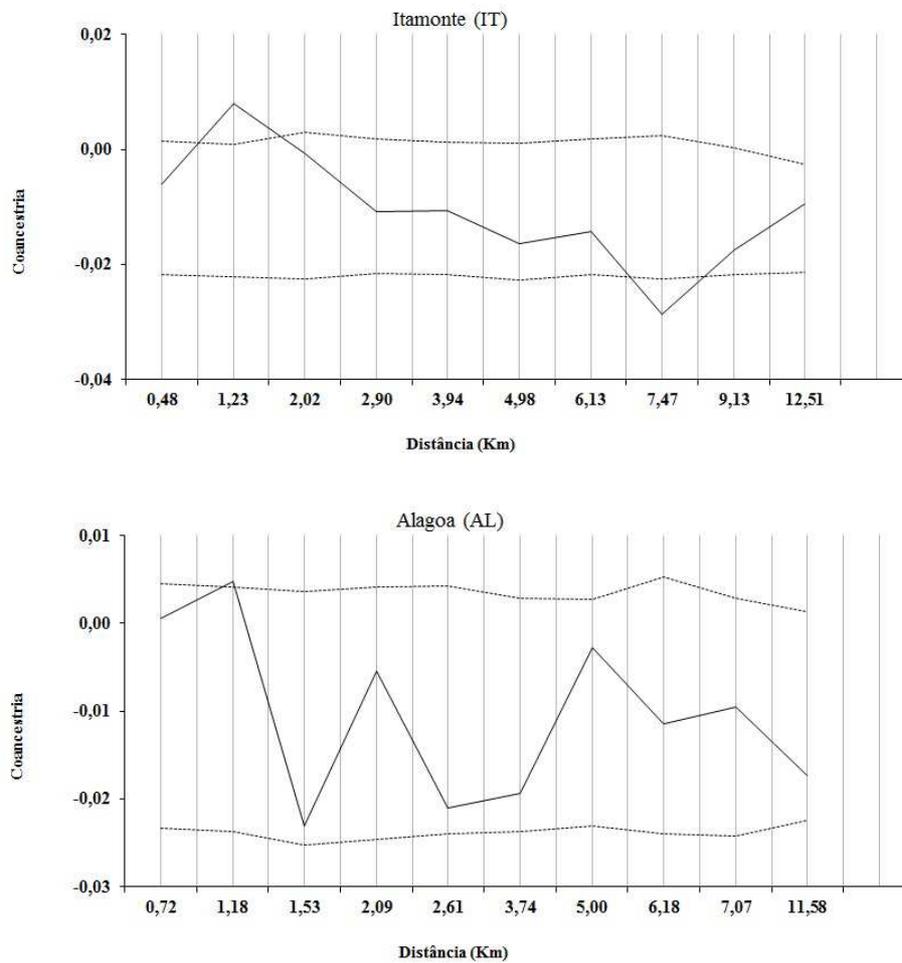


Figura 15 Correlogramas do coeficiente de coancestria (*Kinship*), por classes de distância, para indivíduos de *Araucaria angustifolia* nas populações naturais amostradas na Serra da Mantiqueira, Minas Gerais. Intervalo de confiança a 95% de probabilidade

(...continua...)

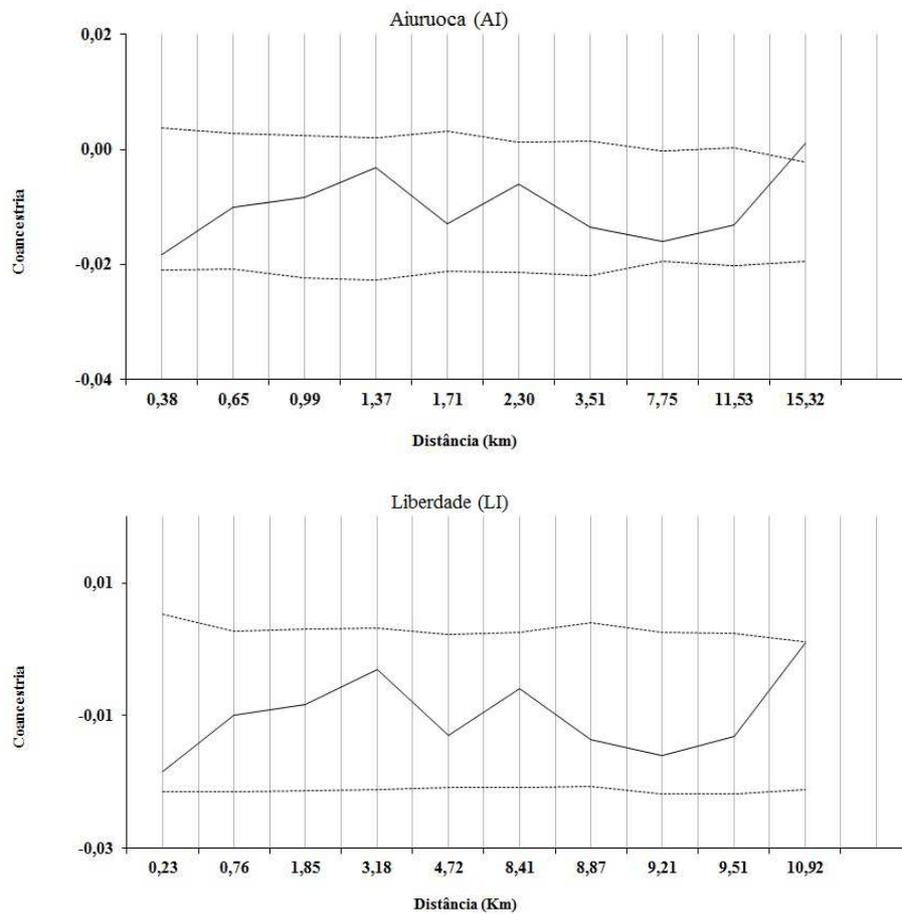


Figura 15 Correlogramas do coeficiente de coancestria (*Kinship*), por classes de distância, para indivíduos de *Araucaria angustifolia* nas populações naturais amostradas na Serra da Mantiqueira, Minas Gerais. Intervalo de confiança a 95% de probabilidade

(...continua...)

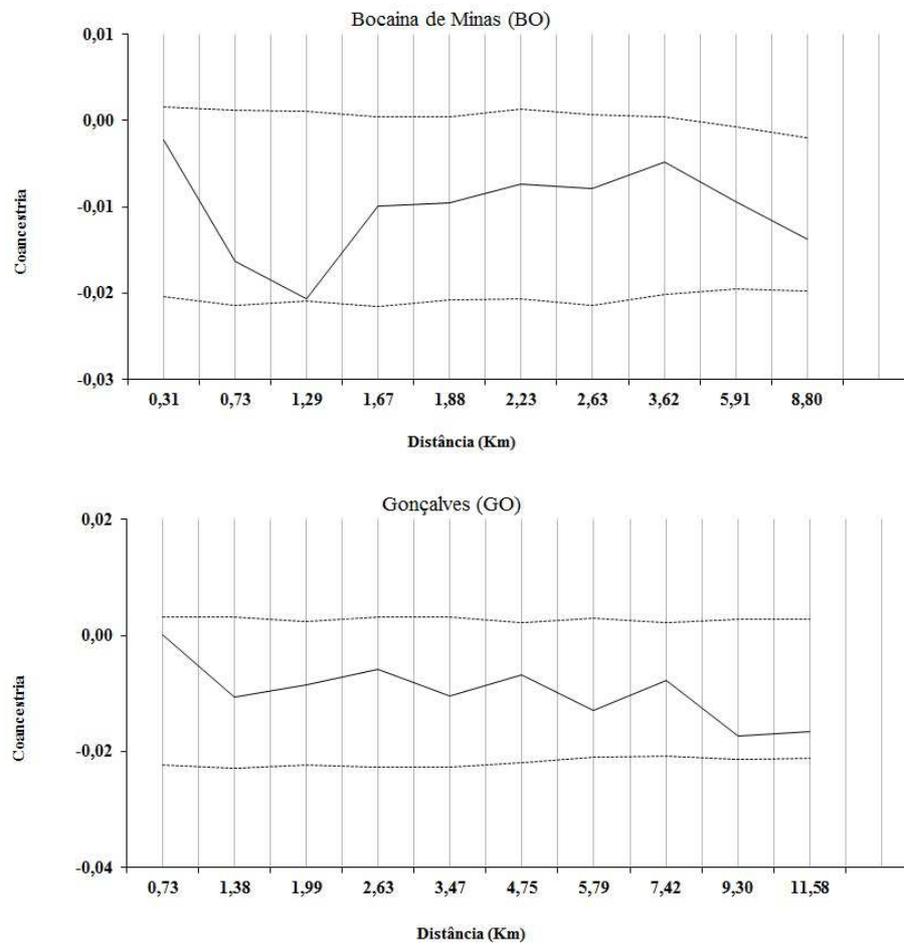
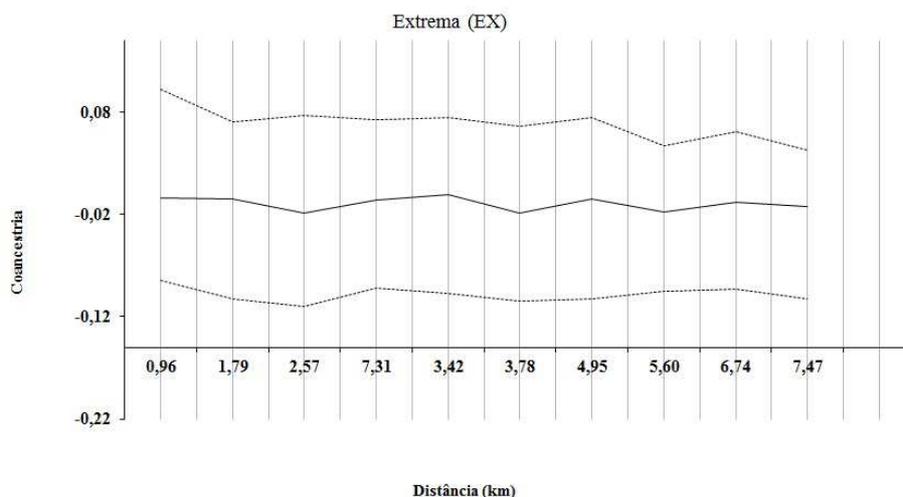


Figura 15 Correlogramas do coeficiente de coancestria (*Kinship*), por classes de distância, para indivíduos de *Araucaria angustifolia* nas populações naturais amostradas na Serra da Mantiqueira, Minas Gerais. Intervalo de confiança a 95% de probabilidade

(...continua...)

“Figura 16, conclusão”



Analisando o correlograma das populações de *Araucaria angustifolia* (Figura 16) observa-se a ausência de estruturação genética significativa nas populações DM, AI, LI, BO, GO e EX ($p > 0,05$), o que representa distribuição aleatória dos genótipos dentro destas populações, indicando que a estratégia de amostragem respeitando um distanciamento mínimo de 100 m entre indivíduos coletados foi eficiente nessas populações. Entretanto, nas demais populações, foi constatada estruturação espacial com valores significativos de coancestria ($P < 0,05$), além dos valores de S_P que foram diferentes de zero e significativos a 95% de probabilidade (Tabela 12).

Na população PQ, os coeficientes de coancestria foram significativos na primeira classe de distância (0 a 230 metros) e assumiu valores de 0,0113 ($P = 0,00$); e ainda na segunda classe de distância (230 a 500 metros) e assumiu o valor de 0,0106 ($P = 0,00$). Esses resultados indicam estruturação espacial onde

os indivíduos geograficamente mais próximos são geneticamente similares e resultado de coancestria positiva, ou seja, neste local existe uma grande probabilidade de os indivíduos localizados a uma distância inferior a 500 metros sejam aparentados.

Na população de IT, houve estruturação espacial na segunda classe de distância (1,23 km) com valor de 0,0080 ($P = 0,00$). Em IT para se amostrar indivíduos não aparentados, deve-se repetir uma distância superior a 1,23 km entre estes.

Na população AL, a estruturação espacial ocorreu na segunda classe de distância com valor de 0,0048 ($P = 0,0370$). Esse resultado indica que indivíduos distanciados a 1,18 km podem ser aparentados.

As classes de distância representadas nos correlogramas seriam uma indicação do distanciamento mínimo entre indivíduos a serem amostrados para coletas de sementes visando à obtenção de maior variabilidade genética, pontos a partir de onde a coancestria é nula (BOUVET, 2004; CLOUTIER et al., 2007; JIN; HE; LU, 2003; KELLY; HARDY; BOUVET, 2004).

A dispersão limitada de pólen e sementes é reportada como as maiores causas de estruturação genética espacial dentro de populações (LATTA et al., 1998; SMOUSE; PEAKALL, 1999). As análises indicam um padrão de estruturação variável entre as diferentes populações avaliadas, esse modelo pode ocorrer em decorrência de características locais da população, como a interferência do vento na polinização, elementos da paisagem e pelo tipo de dispersão de sementes da espécie que é principalmente barocórica e apresenta também dispersão secundária.

Na Tabela 12, são apresentados os valores da estatística S_p da estrutura genética espacial para as populações de *Araucaria angustifolia* analisadas neste estudo. Os valores de S_p são medidas de magnitude da estruturação genética dentro da primeira classe de distância. A tabela também contém os valores de

significância (P) dos testes de permutação, o coeficiente de Kinship para a primeira classe de distância (F_{ij}) e os valores da inclinação da curva de regressão do coeficiente de coancestria (B_{log}).

Tabela 12 Caracterização da estrutura espacial de *Araucaria angustifolia* em nove populações, incluindo para cada população o coeficiente de kinship (F_{ij}) para primeira classe de distância, B_{log} , estatística S_p e valor de significância (P)

Populações	F_{ij}	B_{log}	S_p	P
DM	-0,0163	0,0341	-0,03362	0,4505 ^{ns}
PQ	0,0133	-0,1550	0,1571	0,0000*
IT	-0,0060	-0,1404	0,1395	0,0030*
AL	0,0006	-0,1012	0,1012	0,1389 ^{ns}
AI	-0,0184	0,0441	-0,0433	0,4206 ^{ns}
LI	-0,0122	0,0482	-0,0477	0,3387 ^{ns}
BO	-0,0022	0,0181	-0,0180	0,4166 ^{ns}
GO	0,0001	-0,1184	0,1184	0,0669 ^{ns}
EX	-0,0042	-0,0804	0,0801	0,3487 ^{ns}

* $P < 0,05$; ^{ns} não significativo.

Os valores de S_p variaram de -0,0180 a 0,15714. A média dos valores de S_p (0,0079) para a espécie estudada foi semelhante à de espécies cuja dispersão de sementes é feita por animais (dispersão secundária de sementes de *A. angustifolia*) (0,0088) (VEKEMANS; HARDY, 2004) e próxima à de espécies com dispersão de pólen pelo vento (0,0064) (VEKEMANS; HARDY, 2004).

Como citado por VEKEMANS; HARDY (2004), é esperado que espécies de limitada dispersão de sementes apresentassem estruturação genética espacial dentro das populações, assim a relação genética seria maior entre vizinhos do que entre indivíduos distantes. Neste estudo priorizou-se a coleta de material vegetal de indivíduos adultos reprodutivos como também o sistema de

coleta adotado (100 metros de distância entre indivíduos) priorizou a não estruturação. Assim apenas três das nove populações amostradas apresentaram estruturação genética. Contudo estudos de estrutura genética espacial em microescala com amostragem de regenerantes, estudos de avaliação de níveis de dispersão de pólen e sementes podem auxiliar no melhor entendimento da estrutura genética espacial da espécie na região amostrada.

5.5 Aderência ao Equilíbrio de Mutação e Deriva

De acordo com o resultado do Modelo de Passos de Mutação (TPM), realizado pelo teste de Wilcoxon, oito das nove populações de *A. angustifolia* estudadas passaram por uma redução recente no tamanho da população (Tabela 13).

Tabela 13 Análise de Bottleneck realizada para as populações de *Araucaria angustifolia*

		Pop	DM	PQ	IT	AL	AI	LI	BO	GO	EX
TESTE DE WILCOXON	IAM	P	0,002*	0,002*	0,002*	0,002*	0,002*	0,002*	0,002*	0,004*	0,002*
	SMM	P	0,273	0,578	0,422	0,422	0,098	0,629	0,809	0,770	0,320
	TPM	P	0,002*	0,014*	0,006*	0,010*	0,191	0,020*	0,027*	0,037*	0,002*

P: Probabilidade <0,05, significativo excesso de heterozigosidade detectado pelo teste de Wilcoxon.

IAM: Modelo de alelo infinito; SMM: Modelo Siples de Mutação e TPM: Modelo de duas fases de mutação.

A análise da presença de migrantes pelo programa GeneClass2 (PIRY et al., 2004) revelou a presença de 11 indivíduos migrantes pelo teste de máxima verossimilhança entre as populações (Tabela 14) utilizando-se as informações dos oito loci microssatélites. O maior número de migrantes ocorreu em LI com quatro migrantes para DM, IT, BO. A migração ocorreu de forma unilateral apenas entre LI e IT, sendo que essas populações estão localizadas a uma distância espacial de 65,59 km. Houve troca de alelos entre as populações localizadas em maiores distâncias: LI/DM(113,10 km) e AL/DM (75,73 Km).

Tabela 14 Migrantes identificados pela análise de máxima verossimilhança a partir de oito locos microssatélites de *Araucaria angustifolia*

Migrantes	Pop. de origem	Pop. de destino	Valor de P*
LI13	LI	DM	0,007
AL21	AL	DM	0,004
LI46	LI	DM	0,006
DM19	DM	PQ	0,008
LI36	LI	IT	0,001
AL20	AL	LI	0,005
IT23	IT	LI	0,001
LI1	LI	BO	0,006
AI8	AI	BO	0,005
PQ49	PQ	BO	0,003
GO7	GO	EX	0,005

6 CONCLUSÕES

- a) Foi detectada a presença de alelos nulos nas populações de DM, IT AL, LI, porém, em baixa frequência não interferindo na avaliação da estrutura das populações.
- b) As populações de *Araucaria angustifolia* estudadas apresentaram altos níveis de diversidade ($H_e = 0,77$). A maior parte dessa diversidade genética (90%) encontra-se dentro das populações.
- c) O coeficiente de endogamia entre os indivíduos de *A. angustifolia* analisados foi negativo ($f = - 0,09$) indicando ausência no desvio de panmixia.
- d) O resultado do teste de Mantel indicou ausência de correlação entre distância genética e geográfica ($r = 0,08939$, $p = 0,6749$).
- e) A divergência genética entre as populações diferiu estatisticamente de zero ($F_{ST(Hedrick)} = 0,123$).
- f) Os resultados da análise Bayesiana sugerem uma subdivisão em dois grupos genéticos e essa subdivisão representa a estrutura genética das populações estudadas.
- g) A triangulação de Delaunay indicou a existência de pelo menos sete barreiras responsáveis pela descontinuidade genética entre as populações. As barreiras estão relacionadas ao relevo acidentado da região com presença de montanhas e vales.
- h) Os estudos de estrutura genética espacial mostram que as populações DM, AI, LI, BO e GO apresentam distribuição aleatória dos genótipos. Nas demais populações (PQ, IT, AL e EX), os indivíduos apresentam estruturação espacial, indicando parentesco.

- i) A ocorrência de gargalo genético foi detectada em oito das nove populações analisadas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS

A espécie *A. angustifolia* é classificada pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) como criticamente em perigo. Entretanto, por estar representada em várias unidades de conservação de proteção integral, por ser uma espécie com alto potencial de cultivo e também colonizadora de áreas abertas, *A. angustifolia* foi considerada “em perigo” (EN). Seu *status* foi alterado de vulnerável em decorrência de uma redução de floresta de 97% dentro de três gerações de árvores devido ao corte desde o início do século 20, com uma taxa de 80.000 ha por ano.

Plantios de *Pinus sp* e *Eucaliptus sp*, a conversão de florestas para usos como plantação de soja, milho e pecuária, além do impacto causado pela presença de animais exóticos, como o javali, causam uma perda irreversível de *habitat*.

A proteção de recursos genéticos da *A. angustifolia* é importante e depende principalmente do entendimento da diversidade e estrutura genética de suas populações remanescentes (FERREIRA et al., 2012). Vários trabalhos relacionados à conservação genética foram realizados com a espécie na região Sul do Brasil, onde a espécie ocorre de forma predominante. Alguns outros estudos contemplaram populações localizadas em Campos do Jordão (São Paulo), Extrema (Minas Gerais) e Passa Quatro (MG). Este é o primeiro estudo utilizando microssatélites para investigar a diversidade e estrutura genética de *A. angustifolia* em populações localizadas no estado de Minas Gerais.

Os resultados obtidos neste estudo indicam alta variabilidade genética para a espécie nas localidades estudadas. Os dados genéticos apontam que as áreas remanescentes ainda retêm uma alta diversidade genética ($H_e = 0,77$). Entretanto, esses resultados foram obtidos com indivíduos adultos e que sobreviveram da exploração da espécie nas décadas de 70 e 80. Isso indica que

ainda existe variabilidade genética na *A. angustifolia* nas áreas amostradas, entretanto, essa variabilidade será mantida se houver plantios ou condução da regeneração. Para verificar a dinâmica genética nessas áreas limítrofes de ocorrência da espécie, seria imprescindível que estudos das progênies fossem conduzidos. As consequências decorrentes da exploração ocorrida são manifestadas ao longo de várias gerações. Portanto, para se ter o conhecimento da manutenção da variabilidade genética da região estudada, os regenerantes devem se avaliados. Das nove populações estudadas somente foi observada a presença de regenerantes, em torno de 15 indivíduos abaixo da árvore-mãe, na localidade de Bocaina de Minas. Indivíduos jovens são inexistentes como relatado por Soares (1979), Sousa et al. (2005) e Stefenon et al. (2007), portanto, a falta de regeneração vem ocorrendo desde 1979. Outro aspecto que pode interferir na existência de regeneração natural é a característica heliófila da espécie, no início, ela necessita de sombra para se desenvolver, mas no decorrer do seu desenvolvimento, depende da luz o que pode ser dificultado quando esse regenerante se encontra em meio à floresta, sendo assim, a regeneração fica confinada a bordas de floresta e campos (STEFENON et al., 2007).

Outro fato observado durante as coletas de material biológico é o alto índice de adultos mortos. O alto índice de morte e baixa incidência ou até inexistência de regenerantes alerta para a situação da espécie como relatado pelo Professor da Universidade Federal do Paraná, Flávio Zanette, em entrevista na emissora de rádio Band News FM de Curitiba. Na entrevista, ele afirma que o fato de haver mais mortes do que “nascimentos” está levando à extinção local da espécie no estado do Paraná, fato que pode estar ocorrendo também na região da Serra da Mantiqueira. Estudos com a espécie são escassos na região, outros estudos devem ser realizados (filogeografia, fluxo de pólen, fenologia, etc.) para se ter a real situação da espécie na região na área da Serra da Mantiqueira.

De forma geral, os dados obtidos neste trabalho apontam que nas áreas amostradas, os indivíduos de *A. angustifolia* possuem ainda alta diversidade genética e que esta deve ser utilizada para a produção de mudas para futuros plantios.

REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A. N. **Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas**. São Paulo: Ateliê Editorial, 2003. 160 p.
- AGUILAR, R. et al. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 24, p. 5177–5188, Dec. 2008.
- ALLENDORF, F.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. 2. ed. New York: Willey-Blackwell, 2012. 624 p.
- ALVAREZ-BUYLLA, E. R.; GARAY, A. A. Population genetic structure of *Cecropiaobtusifolia*, a tropical pioneer species. **Evolution**, Washington, v. 48, n. 2, p. 437-453, Apr. 1994.
- ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL FERNÃO DIAS. Disponível em: <<https://siter.google.com/site/apafernaodias>>. Acesso em: 11 abr. 2014.
- ASHLEY, M. V. Plant parentage, pollination, and dispersal: howDNA microsatellites have altered the landscape. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 148-161, May 2010.
- ASSOCIAÇÃO DE PRESERVAÇÃO DO MEIO AMBIENTE E DA VIDA. Disponível em: <<http://www.Apremavi.org.br>>. Acesso em: 11 jan. 2015.
- AUBREVILLE, A. A floresta de pinho no Brasil. **Anuário Brasileiro de Economia Florestal**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 2, p. 21-36, 1954.
- AULER, N. M. F. et al. The genetics conservation of *Araucaria angustifolia*: 1 - genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptative variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 3, p. 329-338, July 2002.
- BACKES, A. Condicionamento climático e distribuição geográfica de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no Brasil. **Pesquisa Botânica**, São Paulo, n. 39, p. 5-39, 1988.

- BACKES, A. Distribuição geográfica atual da Floresta com Araucária: condicionamento climático. p. In: FONSECA, C. R. (Ed.). **Floresta com araucaria: ecologia, conservação e desenvolvimento sustentável**. Ribeirão Preto: Holos, 2009. p. 39-44.
- BANDEL, G.; GURGEL, J. T. A. Proporção do sexo em pinheiro-brasileiro *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. Silvicultura. **Revista Técnica do Serviço Florestal do Estado de São Paulo**, São Paulo, p. 209-220, 1967.
- BARBOSA, T. C. S. et al. Genetic characterization of natural population of the medicinal plant *Palicourea coriacea* (Rubiaceae) with molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 2, p. 696-704, Apr. 2010.
- BARRETO, M. R.; ANJOS N. Morfologia das diversas fases de desenvolvimento se *Spermologus rufus* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae) em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 810-816, jul./ago. 2002.
- BATISTINI, A. P. et al. Genetic diversity of natural population of *Anemopaegma arvense* (Bignoniaceae) in the Cerrado of São Paulo State, Brasil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 52-63, Jan. 2009.
- BEHLING, H. A high resolution Holocene pollen record from Lago do Pires, SE Brazil: vegetation, climate and fire history. **Journal of Paleolimnology**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 243-268, Nov. 1995a.
- BEHLING, H. Investigations into the Late Pleistocene and Holocene history of vegetation and climate in Santa Catarina (S Brazil). **Vegetation History and Archaeobotany**, Washington, v. 4, n. 3, p. 127-152, Sept. 1995b.
- BEHLING, H. Late quaternary vegetation, climate and fire history in the Araucaria forest and campos region from Serra Campos Gerais (Paraná), S Brazil. **Review of Palaeobotany and Palynology**, Amsterdam, v. 97, n. 1-2, p. 109-121, July 1997.
- BITTENCOURT, J. V. M. et al. Conservation, management and sustainable use of *Araucaria angustifolia* genetic resources in Brazil. In: VINCETI, B.; AMARAL, W.; MEILLEUR, B. (Ed.). **Challenges in managing forest genetic resource for livelihoods: examples from Argentina and Brazil**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2005. p. 133-148.

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Genetic effects of forest fragmentation in high-density *Araucaria angustifolia* populations in Southern Brazil. **Tree Genetics & Genomes**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p. 573-582, May 2009.

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, London, v. 99, n. 4, p. 580-591, Oct. 2007.

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Pollen movement and spatial genetic structure in a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. **Conservation Genetics**, Amsterdam, v. 9, n. 5, p. 855-868, Sept. 2008.

BORDIGNON, M.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. O serelepe *Sciurus ingrami* (Sciuridae: Rodentia) como dispersor do Pinheiro do Paraná *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae: Pinophyta). **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Paraná, v. 3, n. 2, p. 139-144, ago./dez. 2000.

BRASIL. Conselho Estadual de Política Ambiental. Deliberação do Copam nº 085/1997. Listas das espécies ameaçadas de extinção da flora do estado de Minas Gerais. **Diário Oficial**, Brasília, DF, 24 set. 2008.

BRASIL. Decreto Nº 42.099, de 31 de dezembro de 2002. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. **Sistema Legis**, Rio Grande do Sul, 2002.

BRASIL. Lei nº 9.985 de 18 de julho de 2000. Regulamenta o art. 225, § 1º, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 jul. 2000.

BROWN, A. H. D. Isozymes, plant populations genetics structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 52, n. 4, p. 145-157, July 1978.

CALLEN, D. F. et al. Incidence and origin of 'null' alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **The American Journal of Human Genetics**, Oxford, v. 52, n. 5, p. 922-927 May 1993.

CARLINI-GARCIA, L. A.; VENCOVSKY, R.; COELHO, A. S. G. Método bootstrap aplicado em diferentes níveis de reamostragem na estimação de parâmetros genéticos populacionais. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 4 p. 785-793, out./dez. 2001.

CARVALHO, M. M. X. de. Os fatores do desmatamento da floresta com araucária: Agropecuária, lenha e indústria madeireira. **Revista Esboço**, Florianópolis, v. 18, n. 25, p. 32-52, ago. 2011.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 1039 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira**. Brasília: Embrapa, 1994. 640 p.

CHAPUIS, M.-P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 3, p. 621-631, Mar. 2007.

CHASE, M. R.; KESSELI, R.; BAWA, K. S. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 83 n. 1, p. 51-57, Jan. 1996.

CLOUTIER, D. et al. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Garapa guianensis* Aubl. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, n.4 p. 797-809, Feb. 2007.

COMES, H. P.; KADEREIT, J. W. The effect of quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. **Trend in Plant Science**, New York, v. 3, n. 11, p. 432-438, Nov. 1998.

COURNET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of twotests for detecting recent populations bottleneck from allelefrequency data. **Genetics**, London, v. 144, n. 4, p. 2001-2014, Dec. 1996.

COZZO, D. Distribución fitogeográfica en la Argentina de *Araucaria araucana* y *A. angustifolia*. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1., 1979, Curitiba. **Proceedings...** Curitiba: FUPEF, 1980. p. 1-3.

DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, London, v. 93, n. 5, p. 504-509, Aug. 2004.

DANNER, M. A. et al. Impact of monoecy in the genetic structure of a predominately dioecious conifer species, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 299, n. 5 P 949-958, May 2013.

DANNER, M. A. et al. Mendelian segregation in eight microsatellite loci from hand- and open-pollinated progenies of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 62, n. 1-2, p. 18-25, Jan./Feb. 2013a.

DEGEN, B. **GDA_NT genetic data analysis and numerical tests**. Grosshansdorf: Institute for Forest Genetics, 2006.

DEMPSTER, A. P., LAIRD, N.M.; RUBIN, D.B. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 39, n. 1, p. 1-38, Apr. 1977.

DEWOODY, J.; NASON, J. D.; HIPKINS, V. D. Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 951-957, Dec. 2006.

DILLENBURG, L. R. et al. Aspectos ecofisiológicos da regeneração de *Araucaria angustifolia*, In: FONSECA, C. R. et al. (Ed.). **Floresta com araucária: ecologia, conservação e desenvolvimento sustentável**. Ribeirão Preto: Holos, 2009. p. 57-65.

DI RIENZO, A. et al. Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 8, p. 3166-3170, Apr. 1994.

DUTRA, T. L.; STRANZ, A. História das araucariaceae: a contribuição dos fósseis para o entendimento das adaptações modernas da família no Hemisfério Sul, com vistas a seu manejo e conservação. In: RONCHI, L. H.; COELHO, O. G. W. (Org.). **Tecnologia, diagnóstico e planejamento ambiental**. São Leopoldo: Editora da Unisinos, 2003. p. 293-351.

EARL, D. A.; VON HOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resource**, Amsterdam, v. 4, n. 2 p. 359-361, Oct. 2012.

ESTOUP, A. et al. Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 12, n. 6 p. 1074-1084, Nov. 1995.

ESTOUP, A.; JARNE, P.; CORNUET, J. M. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 9 p. 1591-1604, Sept. 2002.

FERREIRA, D. K. et al. Genetic analysis of 50-year old Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) plantations: implications for conservation planning. **Conservation Genetics**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 435-442, Apr. 2012.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 1998. 220 p.

FISHER, R. A. Statistical methods for research workers. **Classics in the History of Psychology**, Toronto, Apr. 2000. Disponível em: <<http://psychclassics.yorku.ca/Fisher/Methods/chap6.htm>>. Acesso em: 14 jan. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION. **Panel of experts and forest gene resources**. Roma: FAO, 1996. 64 p.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631 p.

GAJERA, B. B. et al. Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers. **Industrial Crops and Products**, London, v. 32, n. 3, p. 491-498, Nov. 2010.

GANDARA, F. B. **Diversidade genética, taxa de cruzamento, e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrella fissilis* Vell. (Meliáceas)**. 1996. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

GONÇALVES, A. C. et al. Conservação de *Dimorphandra mollis* Benth (FABACEAE) baseada na estrutura genética de populações naturais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 1, p. 95-101, jan./fev. 2010.

GOUDET, J. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices: version 2.9.3.2. **Bio-Soft Net**, New York, 2002. Disponível em: <<http://en.bio-soft.net/tree/FSTAT.html>>. Acesso em: 11 jan. 2014.

GUERRA, M. P. et al. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: SENAC, 2002. p. 85-101.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, Washington, v. 48, n. 2, p. 361-372, June 1992.

HAINES, R. J.; PRAKASH, N.; NIKLES, D. G. Pollination in *Araucaria* Juss. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 32, n. 6, p. 583-594, June 1984.

HAMPP, R. et al. Distinction of *Araucaria angustifolia* seeds from different locations in Brazil by a specific DNA sequence. **Trees**, Berlin, v. 14, n. 8, p. 429-434, Aug. 2000.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M. et al. **Genetics and conservation**. Menlo Park: Benjamin Cummings, 1983. p. 335-348.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L. E. (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, 1989. p. 43-63.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Conservation genetics of endemic plant species. In: AVISE, J. C.; HAMRICK, J. L. (Ed.). **Conservation genetics: case histories from nature**. New York: Chapman & Hall, 1996. p. 281-304.

HARDY, O. J. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterisation of isolation by distance processes using dominant genetic markers. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 12, n. 7, p. 1577-1588, July 2003.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDi 1.2: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 618-620, Dec. 2002.

HEDRICK, P. W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, Washington, v. 59, n. 8, p. 1633-1638, Aug. 2005.

HEYWOOD, J. S. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 22, p. 335-355, Nov. 1991.

IMAGUIRE N. Condições ambientais para a *Araucaria angustifolia* Bert. O. Ktze. **Dusenía**, Curitiba, v. 11, n. 3, p. 121-127, 1979.

INDRUSIAK, C.; MONTEIRO, S. A. Unidades de conservação na área de distribuição da Araucária. In: FONSECA, C. R. (Ed.). **Floresta com araucaria: ecologia, conservação e desenvolvimento sustentável**. Ribeirão Preto: Holos, 2009. p. 253-265.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home>>. Acesso em: 30 jan. 2014.

JACOB, H. J. et al. Genetic mapping of a gene causing hypertensive rat. **Cell**, Cambridge, v. 67, n. 1, p. 213-224, Oct. 1991.

JARNE, P.; LAGODA, P. Microsatellites: from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 424-429, Oct. 1996.

JIN, Y.; HE, T.; LU, B. Fine scale genetic structure in a wild soybean (*Glycine soja*) population and the implications for conservation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 159, n. 2, p. 513-519, Aug. 2003.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Circular Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 12, n. 32, p. 65-70, dez. 1998.

KELLER, L. F.; WALLER, D. M. Inbreeding effects in wild population. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 17, n. 5, p. 230-241, May 2002.

KELLY, A. C. et al. Microsatellites behaving badly: empirical evaluation of genotyping errors and subsequent impacts on population studies. **Genetic Molecular Resources**, Washington, v. 10, n. 4, p. 2534-2553, Oct. 2011.

KELLY, B. A.; HARDY, O. J.; BOUVET, J. Temporal and spatial genetic structure in *Vitellaria paradoxa* (Shea tree) in an agroforestry system in southern Mali. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 1231-1240, May 2004.

- KERSHAW, P.; WAGSTAFF, B. The southern conifer family araucariaceae: history, status, and value for paleoenvironmental reconstruction. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 32, n. 14, p. 397-414, Nov. 2001.
- KIMURA, M.; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, London, v. 49, n. 4, p. 725-738, Apr. 1964.
- KLEIN, R. M. O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Sellowia**, Itajaí, v. 12, n. 12 p. 17-44, 1960.
- KOCH, Z.; CORRÊA, M. C. **Araucária**: a floresta do Brasil meridional. Curitiba: Olhar Brasileiro, 2002. 148 p.
- KRAMER, A. T. et al. The paradox of forest fragmentation genetics. **Conservation Biology**, Boston, v. 22, n. 4, p. 878-885, Aug. 2008.
- LATTA, R. G. et al. Direct and indirect estimates of seed versus pollen movement within a population of ponderosa pine. **Evolution**, Washington, v. 52, n. 1, p. 61-67, Feb. 1998.
- LE SAOUT et al. Protected areas and effective biodiversity conservation. **Science**, New York, v. 342, n. 6160, p. 803-805, Nov. 2013.
- LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical ecology**. Amsterdam: Elsevier, 1998. 853 p.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: version 1.1 for Windows 95/NT. [S.l: s.n.], 2002. Disponível em: <<http://www.lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>>. Acesso em: 22 maio 2014.
- LINDMAN, C. A. M. **A vegetação no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universal, 1906. 356 p.
- LOISSELLE, B. A. et al. Spatial genetics structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (RUBIACEAE). **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 82, n. 11, p. 1420-1425, Nov. 1995.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, n. p. 65-95, Nov. 1984.

MANEL, S. et al. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecological and Evolution**, Washington, v. 18, n. 4, p. 189-197, Apr. 2003.

MANNI, F.; GUERARD, E.; HEYER, E. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. **Human Biology**, Detroit, v. 76, n. 2, p. 173-190, Apr. 2004.

MANNI, F.; GUÉRARD, E.; HEYER, E. **Barrier**: a software to compute geographic barriers from a distance matrix version 2.2. [S.l.: s.n.], 2004. Disponível em: <<http://www.mnhn.fr/mnhn/eco/anthropologie/software/barrier.html>>. Acesso em: 15 jun. 2010.

MANTOVANI, A. et al. Internal genetic structure and outcrossing rate in a natural population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Journal of Heredity**, Washington, v. 97, n. 5, p. 466-472, Sept. 2006.

MATTOS, J. R. **O pinheiro brasileiro**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2011. 700 p.

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

MEDINA-MACEDO, L. et al. High levels of genetic diversity through pollenflow of the coniferous *Araucaria angustifolia*: a landscapelevel study in Southern Brazil. **Tree Genetics and Genomes**, Amsterdam, v. 11, n. 53, p. 814, Feb. 2015.

MEDRI, C. et al. Effects of forest management on the genetic diversity in a population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 52, n. 5-6, p. 202-205, Apr. 2003.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores e suas características. In: MILACH, S. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S. C. K. Milach, 1998. p. 17-28.

MORAES, M. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Myracrodruon urundeu* Fr. All. sob diferentes condições antrópicas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 281-289, Mar./Apr. 2005.

MYAMOTO, M.; KURAMOTO, N.; YAMADA, H. Differences in spatial autocorrelation between four sub-populations of *Alnus trabeculosa* Hand. Mazz. (BETULACEAE). **Heredity**, London, v. 89, n. 4, p. 273-279, Oct. 2001.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Madison, v. 89, n. 3, p. 586-590, July 1978.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, London, v. 41, n. 2, p. 225-233, Oct. 1977.

NYBOM, H.; BARTISH, I. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Jena, v. 3, n. 2, p. 93-114, Feb. 2000.

PATREZE, C. M.; TSAI, S. M. Intrapopulational genetic diversity of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is different when assessed on the basis of chloroplast or nuclear markers. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 284, n. 1-2, p. 111-122, Jan. 2010.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in excel: population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, London, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, July 2012.

PIRY, S., A. et al. GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. **Journal of Heredity**, Washington, v. 95, n. 6, p. 536-539, Nov./Dec. 2004.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, Washington, v. 90, n. 4, p. 502-503, July 1999.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, London, v. 155, n. 2, p. 945-959, June 2000.

PRÓ FUNDAÇÃO MANTIQUEIRA. Disponível em: <<http://www.profundacao.mantiqueira.org>>. Acesso em: 14 abr. 2014.

RAMBO, S. J. **Die südgrenzedes brasilianis chenregen waldes**. Porto Alegre: Instituto Anchieta de Pesquisas, 1960. 41 p.

REITZ, R.; KLEIN, R. M. **Araucariaceae**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1966. 29 p.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, Washington, v. 43, n. 1, p. 223-225, Jan. 1989.

RITLAND, K. Estimators for pairwise relatedness and individuals inbreeding coefficients. **Genetics Research**, Oxford, v. 67, n. 2, p. 175-185, Apr. 1996.

RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1997. 747 p.

ROBERTSON, A. et al. Characterization of nuclear microsatellites in New Caledonia *Araucaria* species. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 62-63, Mar. 2004.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.1**. New York: Exeter Software, 2001. 38 p. Disponível em: <<http://www.exetersoftware.com/downloads/ntsystguide21.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2014.

ROUSSET, F. Inbreeding and relatedness coefficients: what do the measures? **Heredity**, London, v. 88, n. 5, p. 371-380, May 2002.

SALGUEIRO, F. et al. Characterization of nuclear microsatellite loci in South American *Araucariaceae* species. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 256-258, June 2005.

SANT'ANNA, C. S. et al. Realized pollen and seed dispersal within a continuous population of the dioecious coniferous Brazilian pine [*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze]. **Conservation Genetics**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 601-613, June 2013.

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

SCHLOTTERER, S. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? **Genetics**, London, v. 5, n. 1, p. 63-69, Jan. 2004.

SCHMIDT, A. B. et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 340-342, Mar. 2007.

SCOTT, L. J. et al. Characterization of highly conserved microsatellite loci in *Araucaria cunninghamii* and related species. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 236, n. 3-4, p. 115-123, Feb. 2003.

SEBBENN, A. M. **Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiáceas) a partir de isoenzimas**. 1997. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1997.

SEBBENN, A. M. et al. Genetic variation in provenance-progeny test of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. in São Paulo, Brazil. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 52, n. 5-6, p. 181-184, Abr. 2003.

SEBBENN, A. M. et al. Variação genética em cinco procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. no Sul do estado de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 91-99, dez. 2004.

SHIMIZU, J. Y.; JAEGER, P.; SPOCHAKI, S. A. Variabilidade genética em uma população remanescente de *Araucaria* no Parque Nacional do Iguaçu, Brasil. **Boletim Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 43, p. 18-36, jul./dez. 2000.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, London, v. 139, n. 1, p. 457-62, Jan. 1995.

SMITH, L. I. **A tutorial on principal components analysis**. [S.l.: s.n.], 2002. Trabalho Apresentado. Disponível em: <http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2014.

SMOUSE, P. E.; PEAKALL, R. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. **Heredity**, London, v. 82, n. 5, p. 561-573, May 1999.

SOARES, R. V. Considerações sobre a regeneração natural da *Araucaria angustifolia*. **Floresta**, Curitiba, v. 10, n. 2 p.12-18, out. 1979.

SOUSA, V. A et al. Variation and population structure at enzyme gene loci in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 53, n. 1, p. 12-19, Jan. 2004.

SOUSA, V. A. et al. Correlated mating in populations of a dioecious Brazilian conifer, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 12, n. 2, p. 107-119, Nov. 2005.

SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H. Pollen dispensal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 51, n. 3 p. 309-317, May/June 2003.

SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H.; ROBINSON, I. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme variant of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 51, n. 5-6, p. 191-196, Oct. 2002.

SOUZA, H. A. V.; LOVATO, M. B. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 49-56, Feb. 2010.

STEFENON, V. M. et al. Genetic structure of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) populations in Brazil: implications for the *in situ* conservation of genetic resources. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 9, n. 5, p. 516-525, Sept. 2007.

STEFENON, V. M. et al. Genética e conservação de *Araucaria angustifolia*: III. Protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPS para análise da diversidade genética em populações naturais. **Biotemas**, Florianópolis, v. 17, n. 1, p. 47-63, set. 2004.

STEFENON, V. M. et al. Padronização de protocolo AFLP e sua capacidade informativa para análise da diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 64, n.64, p. 163-171, dez. 2003.

STEFENON, V. M. et al. The role of gene flow in shaping genetic structures of the subtropical conifer species *Araucaria angustifolia*. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 10, n. 3, p. 356-364, May 2008.

STEFENON, V. M.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. Genetic structure of plantations and the conservation of genetic resources of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*). **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, n. 7, p. 2718-2725, Apr. 2008a.

STEFENON, V. M.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. The role of gene flow in shaping genetic structures of the subtropical conifer species *Araucaria angustifolia*. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 10, n. 3 p. 356-364, May 2008b.

TABERLET, P.; WAITS, L.; LUIKART, G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 14, n. 8, p. 323-327, Dez. 1999.

TEIXEIRA, M. B.; COURA-NETO, A. B. Vegetação. As regiões fitoecológicas, sua natureza, seus recursos econômicos: estudo fitogeográfico. In: MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA. **Levantamento de recursos naturais**: volume 33. Rio de Janeiro: IBGE, 1986. p. 541-632.

THE IUCN red list of threatened species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 11 jan. 2014.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas**: variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto: SBG, 1995. 186 p.

VALVERDE, O. **Planalto Meridional de Brasil**. Rio de Janeiro: Conselho Nacional de Geografia, 1957. 339 p.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 535-538, Dec. 2004.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insight from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 921-935, Apr. 2004.

VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, 1991. 124 p.

VERNALHA, M. M. et al. Considerações sobre a semente de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v. 1, p. 39-96, 1972.

VIEIRA, E. M.; IOB, G. Dispersão e predação de sementes de *Araucaria angustifolia*. In: FONSECA, C. R. et al. (Ed.). **Floresta com araucária**: ecologia, conservação de desenvolvimento sustentável. Ribeirão Preto: Holos, 2009. p. 85-95.

VIVA SAÚDE. Disponível em: <<http://revistavivasaude.uol.com.br/guia/descubra-todos-os-beneficios-do-pinhao/2709/>>. Acesso em: 15 maio 2015.

WASER, P. M.; STROBECK, C. Genetic signatures of inter population dispersal. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 13, n. 12, p. 43-44, Dec. 1998.

WEBER, J. L. et al. Dinucleotide repeat polymorphism at the DX S453, DXS454 and DXS458 loci. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 13, p. 4037, July 1990.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of populations structure. **Evolution**, Lancaster, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, Nov. 1984.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetics data**. Durham: Sunderland, 1990. 337 p.

WILBERGER, T. P. et al. Epífitos vasculares associados à araucaria angustifolia. In: FONSECA, C. R. (Ed.). **Floresta com araucaria: ecologia, conservação e desenvolvimento sustentável**. Ribeirão Preto: Holos, 2009. p. 137-147.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, London, v. 28, n. 2, p. 114-138, Mar. 1943.

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Theaceae) in Korea based on allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 37, n. 1, p. 141-146, Oct. 1996.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 413-418, Oct. 1996.

ZANETTINI, M. H. B.; CAVALLI, S. S. Variabilidade genética em função do modo de reprodução. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Ed.). **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. p. 177-187.

ZUCCHI, M. I. et al. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p. 449-458, dez. 2003.

ANEXOS

ANEXO A – Portaria Normativa

Abate do pinheiro brasileiro (Araucária Angustifolia) e a colheita do pinhão

Página 1

[Início](#) [Hospedagem](#) [Monte sua Loja Virtual](#) [Divulgue seu site nos buscadores](#) [Tenha um domínio próprio](#) [Ação Social](#) [Blog Turbo](#)

Portaria Normativa DC nº 20 .

Dispõe sobre o abate de pinheiro brasileiro e a colheita do pinhão.

O PRESIDENTE DO INSTITUTO BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO FLORESTAL, no uso das atribuições que lhe confere o artigo 25, do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº 229, de 25/04/75, do Sr. Ministro da Agricultura, e tendo em vista as disposições da Lei nº 4.771, de 15 de setembro de 1965 e do Decreto Lei nº 289, de 28 de fevereiro de 1967,

Considerando a necessidade de se proteger as sementes do pinheiro brasileiro (Araucária Angustifolia), indispensáveis para a produção de mudas e conseqüente preservação da espécie, em face da crescente escassez de pinhões,

Considerando o procedimento danoso ao aproveitamento florestal das próprias sementes, através de costumes predatórios que necessitam ser rigidamente disciplinados, e

Tendo em vista que o § 1º do artigo 1º da Portaria Normativa DC nº 10, de 20-06-75f, torna obrigatória a reposição com a mesma espécie, no caso de exploração do Pinho Brasileiro (Araucária Angustifolia),

RESOLVE:

Art. 1º - Fica terminantemente proibido o abate de pinheiros adultos (Araucária Angustifolia), portadores de pinhas, na época da queda de sementes, ou seja, nos meses de abril, maio e junho.

Art. 2º Fica igualmente proibida a colheita de pinhão, por derrubada de pinhas imaturas, antes do dia 15 de abril, data em que tem início o desprendimento das sementes.

Art. 3º Fixar a data de 15 de abril para o início da colheita, transporte e comercialização do pinhão, quer para uso em sementeiras, quer para ser usado como alimento.

Art. 4º A presente Portaria Normativa entrará em vigor na data da sua publicação, revogadas as disposições em contrário.

Brasília, 27 de setembro de 1976.

PAULO AZEVEDO BERUTTI - Presidente

Imagem

[Voltar](#)

[IBAMA LONDRINA PR](#)

[Imagem](#)

[Imagem](#)

[Voltar](#)

ANEXO B – Resolução Conama

BIOMAS – Diretrizes para o manejo

RESOLUÇÃO CONAMA nº 278 de 2001

RESOLUÇÃO CONAMA nº 278, de 24 de maio de 2001
Publicada no DOU nº 138-E, de 18 de julho de 2001, Seção 1, páginas 51-52

Correlações:

- Complementada e alterada pela Resolução CONAMA nº 300/02 (alterados os *caput* e § 2º do art. 2º)
- Regulamentada pela Resolução CONAMA nº 317/02

Dispõe sobre o corte e a exploração de espécies ameaçadas de extinção da flora da Mata Atlântica.

O CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA, no uso das competências que lhe são conferidas pela Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981, alterada pela Lei nº 8.028, de 12 de abril de 1990, regulamentada pelo Decreto nº 99.274, de 6 de junho de 1990, alterado pelo Decreto nº 2.120, de 13 de janeiro de 1997³³, e tendo em vista o disposto em seu Regimento Interno, anexo à Portaria nº 326, de 15 de dezembro de 1994³⁴, e

Considerando que o bioma Mata Atlântica é patrimônio nacional, nos termos do § 4º do art. 225 da Constituição, e que o uso de seus recursos naturais deve ser feito de forma a preservar o meio ambiente;

Considerando o que dispõe o art. 19 do Código Florestal, Lei nº 4.771, de 15 de setembro de 1965, e os arts. 2º, 7º e 12 do Decreto Federal nº 750, de 10 de fevereiro de 1993;

Considerando que é prioridade garantir a perenidade, a conservação e a recuperação de espécies nativas da Mata Atlântica;

Considerando a situação crítica atual das espécies da flora ameaçadas de extinção, agravada pela intensa fragmentação do bioma Mata Atlântica, que compromete o necessário fluxo gênico;

Considerando a inexistência de informações científicas consistentes que assegurem o adequado e sustentável manejo das espécies da flora ameaçadas de extinção, resolve:

Art. 1º Determinar ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA, a suspensão das autorizações concedidas por ato próprio ou por delegação aos demais órgãos do Sistema Nacional de Meio Ambiente-SISNAMA, para corte e exploração de espécies ameaçadas de extinção, constantes da lista oficial daquele órgão, em populações naturais no bioma Mata Atlântica, até que sejam estabelecidos critérios técnicos, cientificamente embasados, que garantam a sustentabilidade da exploração e a conservação genética das populações exploráveis.

Parágrafo único. O CONAMA apresentará, no prazo de um ano, prorrogável por igual período, proposta para a fixação de critérios técnicos e científicos para cada espécie, referidos no *caput* deste artigo.

Art. 2º A exploração eventual, sem propósito comercial direto ou indireto, de espécies da flora nativa ameaçadas de extinção, para consumo nas propriedades rurais ou posses de povos indígenas e populações tradicionais poderá ser autorizada quando não houver possibilidade de uso de outras espécies e desde que respeitadas as seguintes diretrizes:

Art. 2º A exploração eventual, sem propósito comercial direto, de espécies da flora nativa ameaçadas de extinção, para consumo nas propriedades ou posses rurais ou posses de povos indígenas e populações tradicionais, poderá ser autorizada, desde que respeitadas as seguintes diretrizes: *(nova redação dada pela Resolução CONAMA nº 300/02)*

I - retirada não superior a quinze metros cúbicos por propriedade ou posse, no período de cinco anos;

II - prioridade para o aproveitamento de exemplares de árvores mortas ou tombadas por causas naturais; e

III - retirada não superior a vinte por cento do estoque dos exemplares adultos;

³³ Decreto revogado pelo Decreto nº 3.942, de 27 de setembro de 2001.

³⁴ Portaria revogada pela Portaria MMA no 499, de 18 de dezembro de 2002.

§ 1º O requerimento para efeito de autorização para corte eventual, de que trata este artigo, deverá conter dados de altura, diâmetro à altura do peito-DAP, volume individual e total por espécie, relação das árvores selecionadas, previamente identificadas com plaquetas numeradas, e justificativa de utilização.

§ 2º A autorização terá prazo de validade de sessenta dias, podendo ser prorrogado, excepcionalmente, por mais trinta dias, mediante justificativa.

§ 2º A autorização será emitida, após vistoria técnica pelo órgão ambiental competente e terá prazo de validade de noventa dias, podendo ser prorrogada, excepcionalmente, por mais trinta dias, mediante justificativa. *(nova redação dada pela Resolução CONAMA nº 300/02)*

§ 3º A autorização será emitida após vistoria técnica do órgão ambiental responsável.

Art. 3º O IBAMA promoverá, a cada dois anos, a revisão e atualização das listas oficiais de espécies da fauna e da flora ameaçadas de extinção.

Art. 4º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 5º Revogam-se as disposições em contrário.

JOSÉ SARNEY FILHO - Presidente do Conselho
JOSÉ CARLOS CARVALHO - Secretário-Executivo

Este texto não substitui o publicado no DOU, de 18 de julho de 2001.

ANEXO C – Decreto n. 91.304**DECRETO Nº 91.304, DE 03 DE JUNHO DE 1985.**

Dispõe sobre a implantação de área de proteção ambiental nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA, no uso das atribuições que lhe confere o artigo 81, item III, da Constituição Federal e tendo em vista o que dispõe o artigo 8º da Lei nº 6.902, de 27 de abril de 1981, a Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981, e os Decretos nºs 88.351, de 1º de junho de 1983, e de 89.532, de 06 de abril de 1984,

DECRETA:

Art. 1º - Sob a denominação de APA da Serra da Mantiqueira, fica declarada área de proteção ambiental, a região situada nos municípios de Aiuruoca, Alagoa, Baependi, Bocaiana de Minas, Delfim Moreira, Itanhandu, Itamonte, Liberdade, Marmelópolis, Passa Quatro, Passa Vinte, Pirangaçu, Pouso Alto, Santa Rita do Jacutinga, Virgínia e Wenceslau Brás, no Estado de Minas Gerais; Campos do Jordão, Cruzeiro, Lavrinha, Pindamonhangaba, Piquete, Santo Antonio do Pinhal e Queluz, no Estado de São Paulo e Resende no Estado do Rio de Janeiro, com as delimitações geográficas constantes do artigo 3º, deste Decreto.

Art. 2º - A declaração de que trata o artigo anterior, além de garantir a conservação do conjunto paisagístico e da cultura regional, tem por objetivo proteger e preservar:

- a) parte de uma das maiores cadeias montanhosas do sudeste brasileiro;
- b) a flora endêmica e andina;
- c) os remanescentes dos bosques de araucária;
- d) a continuidade da cobertura vegetal do espigão central e das manchas de vegetação primitiva;
- e) a vida selvagem, principalmente as espécies ameaçadas de extinção.

Art. 3º - A APA da Serra da Mantiqueira tem a seguinte delimitação geográfica: tem início no cruzamento da Estrada de Ferro Campos do Jordão, com a divisa dos municípios de Santo Antônio do Pinhal e Pindamonhangaba (ponto 00)(Folha Tremembé); segue em direção norte pela divisa dos municípios de Santo Antonio do Pinhal e Pindamonhangaba até cruzar a primeira curva de nível de cota altimétrica 1800 (um mil e oitocentos) metros (ponto 01); segue em direção nordeste pela curva de nível de cota altimétrica 1800 (um mil e oitocentos) metros até o cruzamento com o Ribeirão das Perdizes (ponto 02); segue a jusante pelo Ribeirão das Perdizes até o cruzamento com a curva de nível de cota altimétrica 1760 (um mil setecentos e sessenta) metros (ponto 03); segue em direção leste pela curva de nível de cota altimétrica 1760 (um mil setecentos e sessenta) metros até o cruzamento com o Córrego Ganha Bola (ponto 04)(Folha Campos do Jordão); segue a jusante pelo Córrego Ganha Bola até a confluência com o Rio Sapucaí-Guaçu (ponto 05)(Folha de Delfim Moreira); segue em linha reta, direção nordeste até atingir o ponto cotado 2616 (dois mil seiscentos e dezessês) metros (ponto 06); segue inicialmente em direção noroeste, e depois oeste, pela linha de crista dividindo águas entre o Rio Sapucaí-Guaçu e o Ribeirão do Paiol, passando respectivamente pelos pontos cotados 1672 (um mil seiscentos setenta e dois) metros 1694 (um mil seiscentos e noventa e quatro) metros, 1668 (um mil seiscentos e sessenta e oito) metros, 1665 (um mil seiscentos e sessenta e cinco) metros, 1647 (um mil seiscentos e quarenta e sete) metros 1668 (um mil seiscentos e sessenta e oito) metros, 1669 (um mil seiscentos sessenta e nove) metros, 1758 (um mil setecentos e cinquenta e oito) metros, 1750 (um mil setecentos e cinquenta) metros, 1785 (um mil setecentos e oitenta e cinco) metros até o ponto cotado 1858 (um mil oitocentos e cinquenta e oito) metros (Pico do Imbiri) (ponto 07) (Folha Campos do Jordão); segue rumo norte-noroeste pelo divisor de águas entre os tributários do Ribeirão dos Marmelos e Córrego Taquaral, vertendo até a confluência do Córrego Taquaral com o Córrego do Campista (ponto 08); segue a montante pelo Córrego do Taquaral até a confluência com seu terceiro tributário da margem esquerda (ponto 09); segue a montante por este tributário até atingir a curva de nível de 1600 (um mil seiscentos) metros na Serra do Baú (ponto 10); segue por esta em direção oeste-sudoeste e posteriormente

nordeste até cruzar com a divisa dos Estados de São Paulo e Minas Gerais (ponto 11); segue por esta divisa em direção nordeste até a divisa dos municípios de Luminosa e Piranguçu (Pedra da Chita) (ponto 12); segue pela divisa dos municípios em direção norte até o Morro das Antas (ponto 13); desce pela vertente norte do Morro das Antas até atingir a cabeceira mais alta do Córrego das Antas (ponto 14) segue a jusante pelo Córrego das Antas até a confluência com o Córrego do Carro (ponto 15); segue a jusante pelo Ribeirão Piranguçu até a confluência com o Córrego do Gamelão (ponto 16); segue a montante pelo Córrego do Gamelão até a confluência com o Córrego da Pedra Branca (ponto 17) (Folha Delfim Moreira); segue em linha reta em direção norte-nordeste até o ponto cotado 953 (novecentos e cinquenta e três) metros (ponto 18); segue em linha reta em direção nordeste até o ponto cotado 1042 (um mil e quarenta e dois) metros (ponto 19); segue em linha reta em direção norte passando pelo ponto cotado 1042 (um mil e quarenta e dois) metros até o ponto cotado 1238 (um mil duzentos e trinta e oito) metros na divisa dos municípios de Piranguçu e Itajubá (ponto 20); segue pela divisa dos municípios de Piranguçu e Itajubá em direção leste até o Rio Sapucaí (ponto 21); segue a jusante por este rio dividindo os municípios de Itajubá e Wenceslau Brás até a confluência com o Rio Santo Antônio (ponto 22) (Folha de Itajubá); segue a montante pelo Rio Santo Antonio dividindo os municípios de Wencenlau Brás e Itajubá até a confluência do Ribeirão do Salto com o Rio Santo Antonio na Fazenda Água Limpa (ponto 23); segue rumo noroeste e posteriormente nordeste pelo limite dos municípios de Itajubá e Delfim Moreira na Serra da Água Limpa até alcançar o Rio Lourenço Velho (ponto 24); segue a montante por este rio dividindo os municípios de Delfim Moreira e Maria da Fé até o cruzamento com a estrada de tráfego periódico que liga Morangal à Virgínia (ponto 25) (Folha de Virgínia); segue por esta estrada no sentido de Virgínia até o ponto em que esta cruza com a curva de nível de 1300 (um mil e trezentos) metros, logo após ter cruzado o Ribeirão Caeté ou dos Santos (ponto 26); segue pela curva de nível 1300 (um mil trezentos) metros, inicialmente na direção nordeste até cruzar com o Córrego Ponte Alta (ponto 27); segue a montante por este Córrego até a estrada que liga Morangal a Ferreirinha (ponto 28); segue em rumo leste por esta estrada passando por Ferreirinha até atingir a curva de nível de 1500 (um mil e quinhentos) metros (ponto 29); segue por esta rumo sul até a divisa dos Estados de Minas Gerais e São Paulo (ponto 30); segue rumo leste pelo limite dos Estados cruzando a rodovia interestadual (São Paulo - 52, Minas Gerais - 152), que liga Cruzeiro a Passa Quatro até encontrar a seguir a curva de nível 1300 (um mil e trezentos) metros (ponto 31) (Folha Passa Quatro); segue por esta curva de nível rumo nordeste passando pelos rios das Pedras e da Cachoeira até encontrar o limite sul da Floresta Nacional de Passa Quatro do Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (ponto 32); segue rumo leste pelo limite sul da Floresta Nacional até encontrar com o Ribeirão de Carlos Tibúrcio (ponto 33); segue a jusante por este até cruzar a curva de nível de 1300 (um mil e trezentos) metros (ponto 34); segue pela curva de nível rumo nordeste até encontrar o Córrego da Tapera (ponto 35); segue a jusante por este córrego até cruzar com a curva de nível de 1200 (um mil e duzentos) metros (ponto 36); segue rumo leste por esta curva de nível cruzando o Rio Verde, o Ribeirão do Imburi, a rodovia federal BR-354, o Rio Capivari, o Rio das Furnas, o Rio da Colina, o Rio do Sapão, o Rio das Lavras, até encontrar a estrada de tráfego permanente que liga Itamonte a Alagoa (ponto 37) (Folha de Pouso Alto); segue por esta estrada no rumo oeste até o entroncamento à direita com a estrada de tráfego periódico que liga a Usina Hidrelétrica dos Bragas ao povoado de Serra (ponto 38); segue por esta estrada no rumo norte até o ponto em que cruza com o Ribeirão da Cachoeirinha (ponto 39); segue a jusante por este ribeirão até a confluência com o Ribeirão do Coura (ponto 40); segue a jusante por este ribeirão até a sua confluência com o Ribeirão Bibiria (ponto 41); segue a montante por este ribeirão até cruzar com o caminho que liga os povoados de Bibiria e Paciência pouco acima da Escola Monsenhor Calazans (ponto 42); segue por este caminho rumo norte até encontrar com o Córrego da Paciência no povoado do mesmo nome (ponto 43); segue a jusante pelo Córrego da Paciência até a confluência com o Ribeirão do Pouso Alto (ponto 44); segue a jusante por este ribeirão até a confluência com o primeiro tributário da margem direita que passa pela Fazenda da Cachoeirinha (ponto 45); segue a montante por este tributário até sua nascente a 1080 (um mil e oitenta) metros (ponto 46) subindo a encosta sul até o ponto cotado de 1246 (um mil duzentos e quarenta e seis) metros (ponto 47); segue

rumo norte-nordeste pela linha de crista dividindo águas entre o Ribeirão Pouso Alto ao sul e os Córregos Cafundó e da Tapera ao norte até o ponto cotado 1652 (um mil seiscentos e cinquenta e dois) metros na divisa dos municípios de Pouso Alto e Baependi (ponto 48); segue na divisa dos municípios no rumo norte-noroeste até alcançar o topo de 1420 (um mil quatrocentos e vinte) metros ao norte da Fazenda do Charco e a sudeste das cabeceiras do Rio da Palmeira (ponto 49); segue rumo norte pelo divisor de águas entre o Rio da Palmeira e o Rio do Jacu, passando respectivamente pelos pontos cotados de 1317 (um mil trezentos e dezessete) metros, 1474 (um mil quatrocentos e setenta e quatro) metros, 1420 (um mil quatrocentos e vinte) metros, 1352 (um mil trezentos e cinquenta e dois) metros, 1160 (um mil cento e sessenta) metros, continuando pelo divisor até o ponto onde cruza a estrada que liga Baependi ao núcleo de São Pedro, próximo ao ponto cotado de 1097 (um mil e noventa e sete) metros e às cabeceiras do Córrego da Limeira (ponto 50); segue por esta estrada no sentido do núcleo de São Pedro até cruzar com o Rio São Pedro (ponto 51); segue a jusante pelo Rio São Pedro até a confluência com o Rio Gamarra (ponto 52) (Folha de Caxambu); segue a jusante pelo Rio Baependi até a confluência com o Ribeirão das Furnas (ponto 53); segue a montante pelo Ribeirão das Furnas até o primeiro cruzamento com a BR-267, próximo ao ponto cotado 908 (novecentos e oito) metros (ponto 54); segue a direção leste pela BR-267 até encontrar o limite entre os municípios de Baependi e Aiuruoca (ponto 55); segue em direção sul pelo limite dos municípios até atingir a ponto cotado 1200 (um mil e duzentos) metros (ponto 56); deste ponto segue pelo divisor de água, na direção leste, entre o Córrego da Cangalha e o Córrego José Sindra até atingir o ponto cotado de 1263 (um mil duzentos e sessenta e três) metros (ponto 57) (Folha de Aiuruoca); deste ponto segue em direção sul pela linha de crista, passando respectivamente pelos pontos cotados de 1243 (um mil duzentos e quarenta e três) metros e 1351 (um mil trezentos e cinquenta e um) metros, segue por esta cumeada no divisor de águas entre os Córregos das Posses Rebordão até atingir a leste o ponto cotado de 1262 (um mil duzentos e sessenta e dois) metros (ponto 58); desce pela encosta leste cruzando o Ribeirão das Furnas na captura de declive (curva de nível de 1200 metros) (ponto 59), sobe a encosta na direção sudeste até atingir a linha de crista, passando respectivamente pelos pontos cotados de 1463 (um mil quatrocentos e sessenta e três) metros, 1496 (um mil quatrocentos e noventa e seis) metros, 1542 (um mil quinhentos e quarenta e dois) metros, 1558 (um mil quinhentos e cinquenta e oito) metros, até o ponto cotado 1738 (um mil setecentos e trinta e oito) metros (ponto 60) (Folha de Alagoa), continua pela linha de crista no rumo leste até o ponto cotado 1485 (um mil quatrocentos e oitenta e cinco) metros (ponto 61), desce em rumo sudeste até atingir a cabeceira do Córrego da Usina (curva de nível 1300 metros) próximo à Usina Hidrelétrica de Aiuruoca (ponto 62); segue a jusante pelo Córrego da Usina até a sua confluência com o Rio Aiuruoca (ponto 63); segue a jusante pelo Rio Aiuruoca até a confluência com o Córrego do Lírio (ponto 64); segue a montante pelo córrego do Lírio até a sua cabeceira mais alta (1300 metros) (ponto 65) (Folha de Aiuruoca), sobe a encosta no rumo norte até atingir o ponto cotado de 1508 (um mil quinhentos e oito) metros coincidindo com os limites dos municípios de Aiuruoca e Carvalhos (ponto 66); segue no rumo sul pelo limite dos municípios de Aiuruoca e Carvalhos até atingir o ponto cotado 2011 (dois mil e onze) metros (Morro Verde na Serra da Aparecida) (ponto 67) (Folha de Alagoas); segue em direção leste pelo limite dos municípios de Carvalhos e Bocaina de Minas até o ponto cotado de 1569 (um mil quinhentos e sessenta e nove) metros próximo ao Morro de Souza na Serra da Aparecida (ponto 68) (Folha de Liberdade), segue rumo norte pela divisa dos municípios de Carvalhos e Liberdade (que coincide respectivamente com os ribeirões do Curraleiro e Barulho), até a confluência do Ribeirão do Barulho com o Córrego Muchocho (ponto 69); segue a montante pelo Córrego do Muchocho passando por sua nascente (curva de nível 1300 metros), e, subindo pela encosta até atingir o ponto cotado 1364 (um mil trezentos e sessenta e quatro) metros (ponto 70), desce pela encosta leste até alcançar a cabeceira de um pequeno tributário do Córrego Taquaraçu (aproximadamente à 200 metros do ponto cotado 1364 metros) (ponto 71); segue a jusante por este tributário até a confluência com o Córrego Taquaraçu (ponto 72); segue a jusante pelo córrego Taquaraçu até sua confluência com o Rio Grande (ponto 73); segue a jusante pelo Rio Grande até sua confluência com o Ribeirão do Carvão (ponto 74) (Folha de Bom Jardim de Minas), segue a montante pela Ribeirão

do Carvão que coincide com o limite entre os municípios de Liberdade e Bom Jardim de Minas, até encontrar a divisa dos Municípios Passa Vinte e Santa Rita do Jacutinga (ponto 75) (Folha de Santa Rita do Jacutinga); segue rumo sul, pela divisa dos municípios de Passa Vinte e Santa Rita do Jacutinga, até encontrar o Rio do Bananal (ponto 76) segue a montante por este rio passando pela sua cabeceira mais alta (1400 metros), e subindo a vertente até atingir o limite entre os municípios de Passa Vinte e Bocaina de Minas (ponto 77) (Folha de Liberdade), segue por este limite, pelo Córrego das Furnas, no rumo sul até atingir o limite estadual MG-RJ no Rio Preto (ponto 78) (Folha de Resende); segue a jusante pelo Rio Preto até o cruzamento com a rodovia estadual RJ-21 (ponto 79) (Folha de Liberdade); segue por esta rodovia no rumo sul até o entroncamento com a estrada de tráfego periódico que dá acesso à Vila de Pedra Selada (ponto 80) (Folha de Resende); segue por esta estrada em direção sudoeste até o entroncamento com a rodovia estadual RJ-109 na Vila de Pedra Selada (ponto 81); segue pela rodovia estadual RJ-109; rumo a Agulhas Negras até o entroncamento com a rodovia que liga esta à RJ-163 (ponto 82); segue pela rodovia que liga as rodovias RJ-109 à RJ-163, em direção oeste até o entrocamento com a rodovia RJ-163 (ponto 83); segue rumo sul pela rodovia RJ-163 até cruzar o Rio Pirapetinga (ponto 84) (Folha de Agulhas Negras); segue a montante pelo Rio Pirapetinga até cruzar a divisa leste do Parque Natural do Itatiaia (ponto 85); segue em direção norte contornando o perímetro do Parque Natural do Itatiaia, atravessando os limites dos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, cortando o Ribeirão Santa Clara, e segue em direção nordeste cortando o Ribeirão das Flores, indo em direção leste atravessando as nascentes do Rio Grande, cotando o Córrego do Brejo, da Capivara, Rio Aiuruoca, acompanhando parte da Serra da Colina, a partir daí indo em direção sul acompanhando parte da rodovia federal BR-354 no povoado de Alto da Serra, atravessa-se o Ribeirão do Palmital, Córrego do Itatiaia, até alcançar o Córrego do Pinhal localizado a sudoeste do limite do Parque, no estado do Rio de Janeiro (ponto 86); segue a jusante pelo Ribeirão do Pinhal até a confluência com o Ribeirão do Salto (ponto 87); segue a jusante por este ribeirão até o cruzamento com a curva de nível de 700 (setecentos) metros (ponto 88); segue por esta curva de nível em direção oeste até o cruzamento com o Córrego Xavier próximo à rodovia SP-52 (ponto 89) (Folhas: Passa Quatro, Cruzeiro, Lorena); segue a montante por este córrego até cruzar a curva de nível de 900 (novecentos) metros (ponto 90); segue por esta curva de nível em direção oeste até cruzar o Ribeirão do Ronco localizado ao sul da cidade de Piquete (ponto 91); segue a jusante pelo Ribeirão do Ronco até a confluência com o Ribeirão da Fortaleza (ponto 92); segue por este a montante até cruzar a divisa dos municípios de Guaratinguetá e Lorena (ponto 93); segue por esta divisa até cruzar o Ribeirão da Posse ou dos Macacos (ponto 94); segue por este a montante até cruzar a curva de nível de 800 (oitocentos) metros (ponto 95); segue em linha reta em direção sudoeste até o cruzamento do Ribeirão do Leme com a curva de nível de 600 (seiscentos) metros (ponto 96) (Folha Delfim Moreira); segue a jusante pelo Ribeirão dos Lemes até a confluência com o Rio Piaguí (Fazenda São José) (ponto 97) (Folha de Lorena); segue em linha reta em direção sudoeste até o cruzamento do Rio Guaratinguetá com a linha de alta tensão (ponto 98) (Folha de Delfim Moreira); segue a montante pelo Rio Guaratinguetá até cruzar a estrada de tráfego periódico que liga o Bairro da Pedrinha ao Bairro do Soares (ponto 99) (Folha de Pindamonhangaba); segue por esta rodovia em direção sul até cruzar o Ribeirão dos Buenos ou dos Moreiras (ponto 100); segue a montante por este ribeirão até a confluência com o Córrego Guamirim (ponto 101); segue a montante pelo Córrego Guamirim até cruzar a curva de nível de 700 (setecentos) metros (ponto 102); segue em linha reta em direção sudoeste até a confluência com o Ribeirão Tetequera ou Grande com o Córrego do Cachoeirão (ponto 103); segue a montante pelo Córrego do Cachoeirão até a confluência com o Córrego do Bonfim (ponto 104); segue por este a montante até a sua nascente, subindo a encosta no rumo sudoeste até o ponto cotado 1282 ((um mil duzentos e oitenta e dois) metros (ponto 105) (Folha de Tremembé); desce a encosta rumo sudoeste, seguindo a jusante pelo Ribeirão do Oliveira até cruzar a rodovia estadual SP-132 (ponto 106); segue por esta rodovia em direção noroeste até o entroncamento com a rodovia estadual SP-46 (ponto 107); segue por esta rodovia em direção sudoeste até a divisa dos municípios Pindamonhangaba e Tremembé (ponto 108); segue em direção oeste divisa dos municípios até encontrar a divisa com o município de

Monteiro Lobato (ponto 109); segue rumo norte pela divisa dos municípios de Pindamonhangaba e Monteiro Lobato até encontrar a divisa do município de Santo Antonio do Pinhal (ponto 110); segue pela divisa dos municípios de Pindamonhangaba e Santo Antonio do Pinhal até a nascente do Ribeirão Boa Vista (ponto 111); segue a jusante pelo Ribeirão Boa Vista até cruzar o caminho que liga o povoado de Boa Vista ao Bairro do Pico Agudo (ponto 112); segue rumo norte por este caminho até a estrada de tráfego periódico que liga Santo Antonio do Pinhal ao Morro do Pico Agudo (ponto 113); segue rumo leste pelo divisor de águas entre o Rio da Prata e Córrego do Pico Agudo até o ponto cotado 1390 (um mil trezentos e noventa) metros (ponto 114); segue rumo noroeste em linha reta até o ponto cotado 1304 (um mil trezentos e quatro) metros (ponto 115); segue rumo leste pelo divisor de águas entre o Rio da Prata e Córrego do Barreira até o cruzamento do limite dos municípios de Santo Antonio do Pinhal e Pindamonhangaba com a Estrada de Ferro Campos do Jordão (ponto 00), onde teve início esta descrição.

Art. 4º - Na implantação e funcionamento da APA da Serra da Mantiqueira, serão adotadas as seguintes medidas:

I - zoneamento a ser efetivado através de portaria da Secretaria Especial do Meio Ambiente-SEMA, do Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente, em estreita articulação com a Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia de Minas Gerais, através da Comissão de Política Ambiental-COPAM, a Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais-CETEC, o Instituto de Geociências Aplicada-IGA, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental-CETESB/SP, a Fundação Estadual do Meio Ambiente-FEEMA/RJ, a Secretaria Especial da Região Sudeste-SERSE e as Prefeituras Municipais dos municípios envolvidos, indicando as atividades a serem encorajadas ou incentivadas em cada zona, bem como as que serão ser limitadas, restringidas ou proibidas, de acordo a legislação aplicável;

II - a utilização dos instrumentos legais e dos incentivos financeiros governamentais, para assegurar a proteção da Zona de Vida Silvestre, o uso racional do solo e outras medidas referentes à salvaguarda dos recursos ambientais, sempre que consideradas necessárias;

III - a aplicação, quando cabível, de medidas legais, destinadas a impedir ou evitar o exercício de atividades causadoras de sensível degradação da qualidade ambiental;

IV - a divulgação das medidas previstas neste Decreto objetivando o esclarecimento da comunidade local sobre a APA e as suas finalidades.

Art. 5º - Na APA da Serra da Mantiqueira ficam proibidas ou restringidas:

I - a implantação de atividades industriais potencialmente poluidoras, capazes de afetar mananciais de água;

II - a realização de obras de terraplenagem e a abertura de canais, quando essas iniciativas importarem em sensível alteração das condições ecológicas locais, principalmente da Zona de Vida Silvestre, onde a biota será protegida com mais rigor;

III - o exercício de atividades capazes de provocar acelerada erosão das terras ou acentuado assoreamento das coleções hídricas;

IV - o exercício de atividades que ameacem extinguir as espécies raras da biota, principalmente os remanescentes dos bosques de araucária, as manchas de vegetação primitiva e as nascentes de cursos d'água existentes na região;

V - o uso de biocidas, quando indiscriminado ou em desacordo com as normas ou recomendações técnicas oficiais.

Art. 6º - A abertura de vias de comunicação, de canais, a implantação de projetos de urbanização, sempre que importarem na realização de obras de terraplenagem, bem como a realização de grandes escavações e obras, que causem alterações ambientais, dependerão da autorização prévia da SEMA, que somente poderá concedê-la:

a) após estudo do projeto, exame das alternativas possíveis e avaliação de suas conseqüências ambientais;

b) mediante a indicação das restrições e medidas consideradas necessárias à salvaguarda dos ecossistemas atingidos.

Parágrafo único - As autorizações concedidas pela SEMA, não dispensarão outras autorizações e licenças federais, estaduais e municipais porventura exigíveis.

Art. 7º - Para melhor controlar seus efluentes e reduzir o potencial poluidor das construções destinadas ao uso humano, não serão permitidas:

a) a construção de edificações, em terrenos que, por suas características, não comportarem, a existência simultânea de poços para receber o despejo de fossas sépticas, e de poços de abastecimento d'água, que fiquem a salvo de contaminação, quando não houver rede de coleta e estação de tratamento de esgoto, em funcionamento;

b) a execução de projetos de urbanização, sem as devidas autorizações, alvarás, licenças federais, estaduais e municipais exigíveis.

Art. 8º - Os projetos de urbanização que, pelas suas características, possam provocar deslizamento do solo e outros processos erosivos, não terão a sua execução autorizada pela SEMA.

Art. 9º - Com vistas a impedir a pesca predatória, nas águas marinhas ou interiores da APA e nas proximidades, será dada especial atenção ao cumprimento da legislação pertinente e das normas expedidas pela Superintendência do Desenvolvimento da Pesca - SUDEPE, do Ministério da Agricultura.

Art. 10 - Em casos de epidemias e endemias, veiculadas por animais silvestres, a Ministério da Saúde e as Secretarias de Saúde, dos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, poderão, em articulação com a SEMA, promover programas especiais, para controle dos referidos vetores.

Art. 11 - Fica estabelecida na APA da Serra da Mantiqueira, uma Zona de Vida Silvestre, destinada, prioritariamente, à salvaguarda da biota nativa para garantia da reprodução das espécies, proteção do habitat de espécies raras, endêmicas, em perigo ou ameaçadas de extinção.

Parágrafo Único - A Zona de Vida Silvestre, de que trata o caput deste artigo, compreenderá as áreas mencionadas no artigo 18, da Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981, as quais, quando forem de domínio privado, serão consideradas como de Relevante Interesse Ecológico (ARIE), e ficarão sujeitas às restrições de uso e penalidades estabelecidas, nos termos dos Decretos nºs 88.351/83, e 89.532/84.

Art. 12 - Visando à proteção de espécies raras, na Zona de Vida Silvestre, não será permitida a construção de edificações, exceto as destinadas à realizações de pesquisas e ao controle ambiental.

Art. 13 - Na Zona de Vida Silvestre não será permitida atividade degradadora ou potencialmente causadora de degradação ambiental, inclusive o porte de armas de fogo e de artefatos ou instrumentos de destruição da biota ressalvados os casos objeto de prévia autorização, expedida, em caráter excepcional, pela SEMA.

Art. 14 - Para os efeitos do artigo 18, da Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981, consideram-se como de preservação permanente as nascentes ou "olhos d'água" e o seu entorno, num raio de 60 metros, exceto a faixa necessária para assegurar a utilização e o bom escoamento das águas.

Art. 15 - A APA da Serra da Mantiqueira será supervisionada, administrada e fiscalizada pela SEMA, em articulação com o Instituto Estadual de Floresta-MG, a Comissão de Política Ambiental - COPAM-MG, Prefeituras Municipais dos municípios envolvidos, Conselhos Municipais de Defesa do Meio Ambiente-CODEMAS-MG, Divisão de Proteção dos Recursos Naturais - DPRN, Secretaria de Estado de São Paulo, Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente - FEEMA, do Estado do Rio de Janeiro.

Art. 16 - Com vistas a atingir os objetivos previstos para a APA da Serra da Mantiqueira, bela como para definir as atribuições e competências no controle de suas atividades, a SEMA poderá firmar convênios com órgãos e entidades públicas ou privadas.

Art. 17 - As penalidades previstas nas Leis 6.902, de 27 de abril de 1981, e 6.938, de 31 de agosto de 1981, serão aplicadas, pela Secretaria Especial do Meio Ambiente - SEMA, aos transgressores das disposições deste Decreto, com vistas ao cumprimento das medidas preventivas e corretivas, necessárias à preservação da qualidade ambiental.

Parágrafo Único - Dos atos e decisões da SEMA, referentes à APA da Serra da Mantiqueira caberá recurso ao conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA.

Art. 18 - Os investimentos e a concessão de financiamento e incentivos, da Administração Pública Federal, direta ou indireta, destinados à APA da Serra da Mantiqueira, serão previamente compatibilizados com as diretrizes estabelecidas neste Decreto.

Art. 19 - A SEMA poderá constituir Grupo de Assessoramento Técnico (GAT), e Conselho Assessor, para implementação das atividades de zoneamento, administração e fiscalização da APA da Serra da Mantiqueira.

Art. 20 - A SEMA expedirá as instruções normativas necessárias ao cumprimento deste Decreto.

Art. 21 - Este Decreto entrará em vigor na data da sua publicação, revogadas as disposições em contrato.

Brasília, 03 de junho de 1985, 164º da Independência e 97º da República.

OSÉ SARNEY

Flávio Rios Peixoto da Silveira

ANEXO D – Decreto n. 38.925

29/05/2015

Decreto nº 38

Decreto nº 38.925, de 17 de julho de 1997.

Declara de proteção ambiental áreas de interesse ecológico situadas nas bacias hidrográficas dos Rios Jaguari, Sapucaí-Mirim e Sapucaí, e dá outras providências.

(Publicação - Diário do Executivo - Minas Gerais - 18/07/1997)

O Governador do Estado de Minas Gerais, no uso de atribuição que lhe confere o artigo 90, inciso VII, da Constituição do Estado, de acordo com a Lei Federal nº 6.902, de 27 de abril de 1981, o Decreto Federal nº 99.274, de 6 de junho de 1990, e a Resolução CONAMA nº 10, de 14 de dezembro de 1988, e tendo em vista o Decreto nº 33.944, de 18 de setembro de 1992,

DECRETA:

Art. 1º - Fica declarada Área de Proteção Ambiental, sob a denominação de APA Fernão Dias, a região abrangida pela bacia hidrográfica do Rio Jaguari, no Estado de Minas Gerais, estendendo-se sobre as áreas dos Municípios de Sapucaí-Mirim, Camanducaia, Itapeva, Extrema e Toledo, além de áreas das bacias dos Rios Sapucaí-Mirim e Sapucaí, nos Municípios de Sapucaí-Mirim, Gonçalves, Paraisópolis e Brasópolis, com as delimitações geográficas constantes do artigo 3º deste Decreto.

Art. 2º - A declaração de que trata o artigo anterior, além de garantir a conservação do conjunto paisagístico e da cultura regional, tem por objetivo proteger e preservar as formações florestais remanescentes da Mata Atlântica e a fauna silvestre, através do disciplinamento de uso dos recursos naturais e de incentivos ao ecodesenvolvimento regional, com vistas à melhoria da qualidade ambiental e de vida da população.

Art. 3º - O memorial descritivo dos limites da área que compreende a APA, nas bacias dos rios Jaguari, Sapucaí-Mirim e Sapucaí, foi elaborado com base nas cartas topográficas da Região Sudeste do Brasil, escala 1:50.000, do IBGE, folhas SF.23-Y-B-IV-1 (Munhoz); SF.23-Y-B-IV-2 (Cambui); SF.23-Y-B-IV-3 (Extrema); SF.23-Y-B-IV-4 (Camanducaia); SF.23-Y-B-V-1 (Paraisópolis); SF.23-B-V-2 (Campos do Jordão); SF.23-Y-B-V-3 (Monteiro Lobato); SF.23-Y-B-V-4 (Tremembé); conforme se segue: tem início no ponto em que a rodovia federal BR-381 - Fernão Dias intercepta a divisa dos Estados de Minas Gerais e São Paulo, sobre o córrego da Guaraiúva, na localidade de Divisa (Folha de Extrema), seguindo, daí, em sentido anti-horário a sudeste, acompanhando o limite entre os dois Estados pelo leito do córrego da Guaraiúva, subindo pela encosta da Serra da Mantiqueira, denominada, localmente, Serra do Lopo, até o ponto cotado de 1669m, na Pedra da Guaraiúva; daí, segue pela crista da Serra da Mantiqueira, acompanhando a divisa entre Minas Gerais e São Paulo, que constitui o divisor de águas entre as bacias do Rio Jaguari e do Rio Jacareí, neste Trecho; continua pelo limite, ao longo do espigão da Serra da Mantiqueira, passando pelos marcos de divisa MD 135 e MD 136 e pelo limite dos Municípios de Extrema e Camanducaia (Folha de Camanducaia), seguindo por, aproximadamente, 12km até o ponto cotado de 1649m, de onde flete para o sul, acompanhando o limite estadual até o marco de divisa MD 139; daí, segue pelo limite estadual a nordeste, passando pela Serra do Selado, onde está a Pedra do Selado (2.082 m de altitude), ao sul da Vila Monte Verde; segue pela crista da Serra da Mantiqueira, limite entre Minas Gerais e São Paulo, que recebe sucessivamente os nomes locais de Serra dos Poncianos, Serra de Santa Bárbara, Serra do Palmital, Serra do Queixo D'Anta e Serra de São Benedito; daí, prossegue pelo limite estadual, fletindo para noroeste a partir do ponto cotado a 1172 m e depois para nordeste (Folha de Monteiro Lobato); continua, pelo limite

29/05/2015

Decreto nº 38

estadual, cruzando a rodovia MG-42, fletindo ao sul, passando pelos pontos cotados de 1050 m, 1123 m, 1149 m, no Morro do Caçununga, de onde flete a norte, passando pela Pedra do Pião (1193 m); daí, segue a noroeste até o ponto cotado de 1015 m, fletindo a noroeste, passando pelo morro da Jangada; prossegue pelo limite estadual até alcançar o Córrego da Velha Guarda e, mais a jusante, o Córrego das Pedras (Folha de Tremembé); segue a jusante por este curso d'água até a sua confluência com o Ribeirão do Baú; atravessa, perpendicularmente, o Ribeirão do Baú, prosseguindo no rumo norte-noroeste, atravessando novamente a rodovia estadual MG-42 e, em seguida o Rio Sapucaí-Mirim, fletindo para oeste, acompanhando a divisa entre os Estados de Minas Gerais e São Paulo, para alcançar o alinhamento de crista que coincide com o limite entre os Municípios de Sapucaí-Mirim (MG) e São Bento do Sapucaí (SP) (Folha de Campos do Jordão); segue pelo limite estadual, no sentido oeste-sudoeste, passando pelo Morro da Divisa dos Morenos (1416 m) e pelo Alto do Campestre (1910 m), fletindo a norte na Serra da Balança e a nordeste (Folha de Paraisópolis), atravessando a rodovia estadual MG-42 e o Rio Sapucaí-Mirim até alcançar o ponto cotado de 1678 m; daí, segue rumo noroeste pela Serra da Bocaina, acompanhando o limite estadual até o ponto em que este encontra o Córrego da Bocaina, quando flete para leste, passando pelo Morro do Cantagalo (1615 m), até alcançar o alinhamento da crista da Serra da Candelária, fletindo para o sul, passando pelo Morro do Tatu e prosseguindo até encontrar na Serra da Coimbra o ponto cotado de 1610 m, quando flete a leste, acompanhando sempre o limite estadual que rumo, a nordeste até encontrar a Pedra da Chita; daí, segue pelo limite entre os Municípios de Brasópolis e Piranguçu rumo norte, passando pela crista da Serra da Luminosa e pelo morro das Antas até encontrar, ao norte, na Serra do Alto da Bandeira, o Morro dos Dias, onde abandona o limite municipal, fletindo a noroeste, no Município de Brasópolis, passando pelo ponto cotado de 1638 m até alcançar, na extremidade sul da Serra da Bandeira, o ponto cotado de 1585 m; daí, prossegue a oeste, descendo pelo interflúvio do esporão da Serra da Bandeira, atravessando o vale do Ribeirão da Vargem Grande ou da Candelária, até alcançar na margem esquerda o Morro do Alegre (1149 m); daí, continua descendo para transpor o vale do Córrego São Gabriel até alcançar, na margem esquerda, o ponto cotado de 965 m ao sul da Serra do Tatu ou do Alegre; daí, segue a oeste, pelo interflúvio entre pequenas sub-bacias, e depois a sudoeste, até encontrar o ponto cotado de 1629 m na extremidade norte da Serra dos Pereiras, onde alcança o limite municipal entre Brasópolis e Paraisópolis; daí, prossegue a oeste, pelo limite municipal, até o ponto cotado de 1333 m; abandonando a divisa dos municípios, segue a sudoeste pela linha de cumeada da Serra do Daniel, passando pelo Morro do Meio e fletindo a oeste pelo interflúvio, até alcançar o Morro do Taquaraçu (1079 m); daí, continua a oeste pelo interflúvio, passando pelo ponto cotado de 968 m (Folha de Campos do Jordão) e descendo o esporão no vale do Rio Sapucaí-Mirim rumo sudoeste, até alcançar a margem direita deste rio; daí, prossegue a montante pela margem direita do Rio Sapucaí-Mirim até a altura da confluência do Ribeirão Vermelho, seu afluente pela margem esquerda; segue pelo Ribeirão Vermelho a montante até o ponto da confluência com o canal do aqueduto da Usina Hidrelétrica de Paraisópolis; daí, segue pelo Ribeirão Vermelho até a confluência do primeiro tributário pela margem esquerda, subindo por este curso d'água pelo canal de drenagem mais ao norte, até alcançar a Serra do Machado; segue pelo interflúvio da Serra do Machado rumo oeste até o ponto cotado de 1691 m, fletindo daí para sudoeste, atravessando perpendicularmente a Serra dos Cochos e descendo a crista do interflúvio, até alcançar a confluência entre o Rio Capivari e o Córrego Mundo Novo, na extremidade norte do Município de Gonçalves; prossegue pela margem direita o Rio Capivari a jusante até a confluência com o Ribeirão dos Azevedos, que constitui a divisa de Municípios entre Paraisópolis e Consolação; daí, segue a divisa entre estes dois municípios a oeste, até o ponto em que este limite passa constituir a divisa entre Paraisópolis e Córrego de Bom Jesus, por onde segue rumo sul, passando pelas Serras da Pedra Chata e da Embira Branca, até a Pedra de São Domingos, na Serra de São Domingos, ponto de convergência dos Municípios de Paraisópolis, Gonçalves, Camanduaia e Córrego de Bom Jesus; daí, segue pela divisa dos Municípios de

29/05/2015

Decreto nº 38

Camanducaia e Córrego de Bom Jesus, constituído pelo Ribeirão de São Domingos, a jusante rumo oeste, até encontrar o ponto de divisa entre os Municípios de Camanducaia, Córrego de Bom Jesus e Cambuí; prossegue a oeste, passando pelas Serras da Faisqueira e da Canguara, pela divisa entre os Municípios de Camanducaia e Cambuí, até alcançar a divisa destes dois municípios com o de Itapeva; segue pela divisa de Municípios entre Cambuí e Itapeva rumo norte, passando pelas Serras do Isidério, do Vaz e do Cabral, fletindo daí a oeste até encontrar o ponto 1553 m, onde convergem os limites municipais de Cambuí, Itapeva e Munhoz; prossegue pela divisa entre estes dois últimos municípios, no sentido geral de sudoeste, pela Serra dos Campos dos Negros (Folha de Cambuí) até alcançar o ponto de divisa entre os Municípios de Itapeva, Munhoz e Toledo na extremidade norte da Serra do Chá; daí, segue pela divisa dos Municípios de Toledo e Munhoz, rumo geral oeste-noroeste, até alcançar o limite entre os Estados de Minas Gerais e São Paulo na Serra do Gamelão; segue pela linha de crista na Serra do Gamelão, acompanhando o limite estadual, passando pelo Morro do Currupira, fletindo para o sul, descendo o interflúvio, até encontrar a cabeceira de drenagem do Córrego do Boava, até a confluência pela margem direita com o Rio Camanducaia ou da Guardinha, seguindo por este curso d'água a montante, coincidente ao limite estadual (Folha de Munhoz); prossegue a montante pelo Rio da Guardinha até a confluência com o Córrego dos Pitangueiras, seguindo por este curso d'água até alcançar a última cabeceira de drenagem que verte da extremidade norte da Serra das Pitangueiras; sobe por esta cabeceira de drenagem até alcançar a linha de cumeada da Serra das Pitangueiras, acompanhando o limite estadual; segue pela crista dessa serra, passando pela Pedra do Vicente Simão, rumo sul-sudoeste, por aproximadamente 10km até descer o interflúvio no sentido da cabeceira de drenagem do Ribeirão dos Godóis; segue por este curso d'água a jusante até a sua confluência com o Rio Jaguari; deste ponto, acompanhando o limite estadual, segue pelo Rio Jaguari a montante até a confluência do Córrego da Guaraiúva, pela margem esquerda; daí, prossegue pelo Córrego da Guaraiúva até o ponto em que este é transposto pela rodovia federal BR-381 - Fernão Dias, onde teve início esta descrição.

Art. 4º - Fica incluída no perímetro descrito no artigo 3º deste Decreto, que define os limites da APA-Fernão Dias, a Área de Proteção Ambiental da Serra do Lopo, APA-Serra do Lopo, localizada no Município de Extrema, criada pela Lei nº 11.936, de 6 de outubro de 1995.

Parágrafo único - As atividades de implantação, administração e fiscalização da APA-Fernão Dias serão extensivas à APA-Serra do Lopo, que se submeterá a todas as providências determinadas por este Decreto.

Art. 5º - A APA-Fernão Dias será regida conforme as normas previstas no Decreto nº 38.182, de 29 de julho de 1996.

Art. 6º - A Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável poderá firmar convênio com a Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo e com outros órgãos, visando à criação de mecanismos e ao desenvolvimento de ações coordenadas, integradas e articuladas, que possibilitem uma gestão conjunta das Áreas de Proteção Ambiental, e seus entornos, localizadas na fronteira entre os dois Estados.

Art. 7º - Este Decreto entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 8º - Revogam-se as disposições em contrário.

Palácio da Liberdade, em Belo Horizonte, aos 17 de julho de 1997.

Eduardo Azeredo - Governador do Estado

ANEXO E - Loci Microssatélites desenvolvidos por Salgueiro et al. (2005)
(Adaptada de Salgueiro et al. 2005)

Loco SSR	Elementos repetidos	Sequências do primer 5' - 3'	Temperatura de Anelamento (°C)
Ag 20	(GA)12	F: ACTAGGAATGGATGTTGGTG R: AAGGTATGGCATCATGTCTC	65
Ag 23	(TA)5 (GT)4	F: CCCTGTTAGACCTATGGTTG R: ATATCATCCATCAATGAGGC	58
Ag 45	(GT)4 AT(GT)7	F: CCATCCTCCATCATTATCC R: TCCCTCCCTATGTCCCAAAG	60
Ag 56	(TC)11	F: CCACACTCAAACAATAGCAGTTC R: TGAAGTTGGCCAATCAGATAC	60
Ag62	(TC)13	F: ATATGGTGGGGTGCCTACAG R: TCCAATCGTTCCTCCAACAG	55
Ag94	(CT)12	F: CCCACAATAACCCAAGATG R: AGTAAAATCCGCTAACAAATGC	55
CRCAc1*	(GA)19†	F: ACAACATGAAAACATATGAG R: CCGTGTAACATTATGACTGC	55
CRCAc2*	(GA)23†	F: ATGCATGACTAGGATGAACA R: ATAGTTCTGCTTATCACATCT	55

*Desenvolvido por Scott et al. (2003); † repetição em *Araucaria cunninghamii* (Scott et al. 2003)

ANEXO F - Loci Microsatélites desenvolvidos por Schmidt et al. (2007)
(Adaptada de Schmidt et al. 2007)

Loco SSR	Elementos repetidos	Sequências do primer 5' - 3'	Temperatura de Anelamento (°C)
Aang01	(CT) ₂₂	F: TGACGGGTTCACTCCTACCT R: TAGGAACCCCATTCATTTG	56
Aang02	(GA) ₂₇	F: AAGGGCCAGAATGAAAAGGT R: TTCACCCCCACATATTGTTGT	56
Aang03	(CT) ₁₃	F: CGCCTACCTCAATCACTGGT R: TGGGACAATGTGCTTATCCA	56
Aang04	(GA) ₁₂	F: TTGAAACCAACCATGATCCA R: GTTTTCCATTGCCGATGTGG	56
Aang07	(GA) ₂₄	F: ACCTCACAGGGACACCTCAC R: TTTTCATGCATGTTGCTTGC	54
Aang09	(GA) ₁₂	F: TCTTCTACAATAGCTCATTCCCTT R: TGAGGAGAGGGAAGAGAAGGT	54
Aang12	(GA) ₂₃	F: AAGGGTTCACAATGCTGAGG R: TGGATTTTATTATGATGGTTGTCC	56
Aang13	(GA) ₂₀	F: AAGGGTTCACAATGCTGAGG R: TGGATTTTATTATGATGGTTGTCC	56
Aang14	(GA) ₂₇	F: GAGCACGTGCAGATGTTGAT R: CCATCCTCTCCATGACCACT	56
Aang15	(GA) ₁₉	F: TGGTCGATCGTAGGGATCAT R: GCTGTCGAGCCTCCTATCAC	56
Aang17	(GA) ₂₂	F: TAAAAAGGGTGCAAATGTGG R: TTGTCATGGTCGCATCTTGT	56
Aang18	(TC) ₉	F: ACACGTTTAATCAGACGAAGAAG R: ATGCCACCTTTTTTCAGCAAC	54
Aang21	(GT) ₁₂	F: GGAGACACCTCACCCCTA R: TGATGAGGGAGGATTACAAGC	56
Aang22	(GA) ₁₀	F: TCAACTTGCAAGGTCACCTCTA R: ATGGGAGCCCCTTCTAGTGT	56
Aang23	(GA) ₁₉	F: TGAGGTATTTGGGCTAGCAA R: CTTCCACGCTCTCACTTCC	56
Aang24	(CT) ₁₉	F: CTCTCCTTCCCCTTGCTCTT R: AGGTGGATCACCCACTGAAG	56
Aang27	(CT) ₁₂	F: CATGGTGGCTATTGCTCCTT R: AGAAGCCATCAAAGGAGTGG	56
Aang28	(CT) ₁₁	F: TCCATTGCATTAGTTTGGGATA R: TTTCCAATCATAATTACCACA	58
Aang30	(CT) ₂₁	F: GTGGAGGTCTTGGCTAATGG R: TAGCTGGGAGCTGATCCAAT	56
Aang35	(GA) ₁₀	F: GGTGAAGCTTCGTTTCAAGG R: CCACTTGTCTTCACCAACCA	56
Aang36	(GA) ₁₄	F: CACCCCTGTAGGATTCAAA R: ATGGTTGCTGATGATGACGA	56
Aang37	(GA) ₁₈	F: GGGGAGTTTCCATGAGATGA R: TCCACTCACCCTCTGAGGA	54

Loco SSR	Elementos repetidos	Sequências do primer 5' - 3'	Temperatura de Anelamento (°C)
Aang41	(GA) ₁₂	F: TTGTCCATGTGAACGAGTCC R: TCTCTCCATTATTCATACATGCTC	56
Aang42	(GA) ₁₅	F: TGCACCAATGAACACCACTT R: GCCCACCAACTACCACCATA	56
Aang43	(GA) ₂₄	F: AGGCTCACATCAGGCTCACT R: TGGTTTTGGTGGTCAAATCA	56
Aang44	(CT) ₁₅	F: CAGAGGGTGGACACTTGGTT R: CACAAACCCCTTTGCCTAA	54
Aang45	(CT) ₁₅	F: AGGCTCACATCAGGCTCACT R: TGGTTTTGGTGGTCAAATCA	54
Aang46	(CT) ₁₂	F: TCCACCTACCTCAATCACTGG R: TGGGACAATGTGCTTATCCA	56
Aang47	(GA) ₁₅	F: GATATGAAAAGAAGGGTTCTATGCT R: TTTCTTCCATTCCCTCCAAGC	58

ANEXO G - Frequência dos alelos nos oito locos microssatélites de populações naturais de *Araucaria angustifolia* localizadas em Minas Gerais

		POPULAÇÕES								
Locus	Alelo/n	DM	PQ	IT	AL	AI	LI	BO	GO	EX
AG45	N	42	48	46	47	50	50	49	49	50
	160	0,429	0,344	0,315	0,479	0,23	0,19	0,459	0,5	0,27
	162	0,571	0,656	0,685	0,521	0,77	0,81	0,541	0,5	0,73
CRC1	N	42	48	46	46	50	50	49	49	50
	195	0,143	0,208	0,239	0,141	0,07	0,11	0,102	0,143	0,16
	197	0,548	0,458	0,446	0,326	0,43	0,43	0,469	0,51	0,45
	199	0,262	0,25	0,261	0,38	0,42	0,37	0,347	0,276	0,25
	201	0,048	0,083	0,054	0,152	0,08	0,09	0,082	0,071	0,14
AS190	N	42	48	46	47	50	50	49	49	50
	170	0,119	0,031	0,033	0,011	0,04	0,05	0,153	0,214	0,01
	172	0,119	0,219	0,228	0,266	0,22	0,14	0,245	0,255	0,23
	174	0,226	0,219	0,239	0,234	0,2	0,18	0,153	0,184	0,25
	176	0,31	0,323	0,315	0,223	0,3	0,24	0,235	0,143	0,28
	178	0	0,021	0,011	0,011	0,01	0	0	0	0,02
	180	0,167	0,125	0,163	0,202	0,16	0,28	0,153	0,112	0,18
	182	0,06	0,063	0,011	0,053	0,07	0,11	0,061	0,092	0,03
AG20	N	43	48	39	36	47	50	48	49	50
	231	0,151	0,063	0,077	0,208	0,181	0,15	0,031	0,071	0,02
	233	0,081	0,031	0,077	0,028	0,021	0,02	0,021	0,02	0,02
	235	0,093	0,042	0,231	0,194	0,16	0,22	0,104	0,122	0,03
	237	0,186	0,219	0,154	0,125	0,266	0,12	0,125	0,122	0,19
	239	0,081	0,115	0,128	0,111	0,106	0,12	0,156	0,133	0,13
	241	0,256	0,271	0,141	0,167	0,096	0,15	0,26	0,286	0,28
	243	0,151	0,24	0,167	0,111	0,106	0,09	0,24	0,224	0,28
	245	0	0,021	0,026	0,042	0,064	0,13	0,052	0	0,05
	247	0	0	0	0,014	0	0	0	0	0
	249	0	0	0	0	0	0	0,01	0,02	0
AG56	N	41	47	37	32	47	50	49	48	50
	140	0,049	0,085	0,23	0,094	0,096	0,14	0,214	0,198	0,1
	142	0,488	0,202	0,297	0,406	0,468	0,39	0,296	0,24	0,25

POPULAÇÕES										
	144	0,317	0,213	0,135	0,125	0,17	0,16	0,214	0,208	0,24
	146	0,11	0,191	0,149	0,219	0,085	0,12	0,143	0,156	0,21
	148	0,037	0,245	0,108	0,109	0,138	0,13	0,133	0,188	0,16
	150	0	0,064	0,081	0,031	0,043	0,06	0	0,01	0,04
	152	0	0	0	0,016	0	0	0	0	0
AG14	N	50	43	50	50	49	50	50	50	43
	200	0,01	0	0	0,03	0	0	0,02	0,02	0,012
	202	0	0	0	0	0	0	0,01	0	0
	204	0	0,081	0,01	0,04	0,092	0,05	0,09	0,08	0,081
	206	0	0	0	0	0	0	0,01	0,01	0
	208	0,01	0,047	0,07	0,07	0,051	0,04	0,07	0,05	0,047
	210	0,03	0,023	0,03	0,05	0,01	0	0,01	0	0
	212	0,2	0,186	0,24	0,11	0,122	0,15	0,16	0,14	0,093
	214	0,43	0,256	0,29	0,21	0,265	0,32	0,25	0,27	0,279
	216	0,08	0,023	0,09	0,22	0,194	0,15	0,15	0,18	0,151
	218	0,02	0,093	0,11	0,2	0,173	0,14	0,15	0,18	0,233
	220	0,18	0,198	0,11	0,07	0,082	0,13	0,08	0,07	0,105
	222	0,01	0,012	0,01	0	0,01	0	0	0	0
	224	0,03	0,081	0,04	0	0	0,02	0	0	0
AG28	N	50	44	50	50	49	50	50	50	41
	148	0,1	0,17	0,12	0,08	0,092	0,09	0,04	0,07	0,098
	150	0,16	0,148	0,14	0,13	0,071	0,04	0,09	0,12	0,122
	152	0,25	0,261	0,28	0,19	0,224	0,13	0,2	0,18	0,28
	154	0,2	0,17	0,23	0,26	0,276	0,38	0,38	0,28	0,232
	156	0,05	0,057	0,1	0,17	0,163	0,15	0,17	0,12	0,061
	158	0,12	0,08	0,04	0,09	0,112	0,15	0,05	0,15	0,11
	160	0,12	0,114	0,09	0,08	0,061	0,06	0,07	0,08	0,098
CRC2	N	50	43	50	50	50	50	50	50	42
	170	0,11	0,151	0,08	0,12	0,18	0,15	0,1	0,16	0,214
	172	0,04	0,081	0,1	0,19	0,16	0,17	0,14	0,14	0,25
	174	0,03	0,047	0,04	0,08	0,11	0,12	0,1	0,05	0,119
	180	0,08	0,105	0,07	0,06	0,03	0,04	0,12	0,09	0,083
	184	0,06	0,012	0,09	0,1	0,1	0,09	0,1	0,08	0,071
	188	0	0,023	0,14	0,14	0,1	0,11	0,05	0,06	0,06

POPULAÇÕES									
190	0,04	0,081	0,1	0,17	0,13	0,12	0,18	0,2	0,095
194	0,01	0,105	0,1	0,12	0,11	0,11	0,12	0,14	0,06
196	0,17	0,174	0,08	0,02	0,07	0,09	0,09	0,07	0,048
198	0,2	0,093	0,1	0	0,01	0	0	0,01	0
200	0,11	0,035	0,01	0	0	0	0	0	0
204	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0
206	0,03	0,012	0	0	0	0	0	0	0
208	0,1	0,081	0,07	0	0	0	0	0	0
210	0	0	0,02	0	0	0	0	0	0
