



**Evidências Moleculares de autopolinização em um exemplar monóico de
Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze**

Nathana da Silva Corneleo

Orientador: Prof^o. Dr^o. Valdir Marcos Stefenon

Dezembro 2012.

Nathana da Silva Corneleo

**Evidências Moleculares de autopolinização em um exemplar monóico de
Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze**

Trabalho apresentado como requisito
para obtenção do grau de Bacharel
no Curso de Ciências Biológicas

São Gabriel, 2012.

Nathana da Silva Corneleo

**Evidências Moleculares de autopolinização em um exemplar monóico de
Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito para
obtenção do grau de Bacharel
no Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Pampa.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovada em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon
Ciências Biológicas- Unipampa

Prof. Dr. Fabiano Pimentel Torres
Ciências Biológicas- Unipampa

Prof. Dr. Margéli Albuquerque Victoria
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais- INCT-APA -
Unipampa

Agradecimentos

A minha mãe Liri em especial por sempre estar do meu lado, muito obrigada mãe pelo apoio, incentivo, por ser meu exemplo de mulher, por ser essa pessoa guerreira que nunca me deixou sem uma palavra de conforto, sem um abraço nas horas em que eu mais precisei. Ao meu pai Luiz pelo incentivo e exemplo de dignidade.

Aos meus padrinhos/pais Kátia e Jefferson Rocha pelo exemplo de vida profissional e pessoal, pela dedicação, pelo amor, pela paciência, por estarem ao meu lado sempre.

Aos meus irmãos do coração Nájila, Emmanuel e Mariana Rocha por me darem as melhores lembranças que eu poderia ter de uma infância e adolescência feliz. Muito obrigada por me deixarem fazer parte da família, muito obrigada pelo amor, pelo incentivo e pelos conselhos de toda a vida.

A minha avó Carmen e ao meu avô Odilon Rocha pelo apoio e amor sempre.

Aos meus colegas de laboratório Fernanda Alves Pereira, Daniela Dalazen, Rayssa Medina, pela colaboração, momentos de descontração e ensinamentos.

Ao meu orientador Valdir Stefenon, pelos ensinamentos e tempo dispensados e além de tudo pela confiança no meu trabalho. Professor pelo qual criei uma profunda admiração.

As amigas Juliana Dorneles, Mariana Iung Freitas, Marcela Saldanha Pires, Juliane Schmitt, Juliana Dockhorn, Fernanda Alves Pereira, Fernanda Gallon, Anna Karolline Rezende e Taciara Horst, obrigada pela paciência de me escutarem, pelos ensinamentos, pelas inúmeras tardes e noites de estudos, pelas gargalhadas, pelos mates, pelas jantares, pelas festas, pois sem vocês tudo seria mais difícil, muito obrigada pela amizade.

Ao meu namorado Renan Castro, pela paciência de me aguentar nos dias em que precisava de colo, pelo incentivo sempre, pelo carinho e amor me dado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	1
1.INTRODUÇÃO.....	2
2.OBJETIVOS.....	4
3.MATERIAIS E METODOS.....	5
3.1.Material Vegetal.....	5
3.2.Extração de DNA.....	6
3.3. Análise molecular de marcadores microssatélites.....	6
3.4.Corrída Eletroforética.....	7
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	7
5.CONCLUSÃO.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12

Resumo

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze é uma conífera primariamente dióica nativa do Brasil, os exemplares monóicas são raramente encontrados na natureza. Sugere-se que essa ocorrência seja por efeito das infecções patogênicas ou outro tipo de lesões na planta adulta. Até agora, nenhuma outra explicação tem sido proposta para a ocorrência desse fenômeno. Este trabalho objetivou testar a viabilidade das sementes e a presença de evidências moleculares de autopolinização em um indivíduo monóico de *A. angustifolia* encontrado em uma área natural de ocorrência, na cidade de Lages, Santa Catarina, Brasil. Sementes maduras foram coletadas no indivíduo monóico, no inverno de 2009 e colocadas para germinar em vasos, no município de São Gabriel, RS. Folhas ou raízes foram coletadas das plântulas oriundas destas sementes para a extração de DNA, seguida de análise molecular baseada em marcadores microssatélites. Amostras foliares da planta-mãe de *A. angustifolia* foram utilizadas na análise molecular. Todas as sementes coletadas na planta monóica germinaram. As análises moleculares sugerem que 100% das sementes estudadas podem ter se originado de auto-polinização.

Palavras-chave: autopolinização, marcadores moleculares, pinheiro brasileiro.

Abstract

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze is a primarily dioiceous conifer species native from Brazil. However, rare monoiceous samples are also found in nature. It is suggested that the occurrence of monoicy in this species is due to pathogenic infections or other kind of injuries on the adult plant. Up to now, there is no other explanation given to this phenomenon. This work describes the analysis of seed viability and occurrence of self pollination in a monoiceous sample of *A. Angustifolia* found in its natural area of occurrence, in Lages, Santa Catarina, Brazil. Ripe seeds were collected from a monoiceous individual in the winter 2009 and germinated in pots in the municipality of São Gabriel, RS. Seeds or roots were sampled from the plantlets for DNA extraction, followed by the molecular analysis using microsatellite markers. Leaf samples from the mother-plant were included in the analysis. All seeds tested germinated normally and the molecular analysis of four microsatellite loci revealed strong evidence of self pollination for all samples.

Key words: self pollination, molecular markers, *Brazilian pine*

1.Introdução

Segundo achados palinológicos, já era possível encontrar a espécie *Araucária angustifolia* (Bert.) O. Kuntze no Brasil a partir do Quaternário Superior, no Pleistoceno (Salgado-Labouriau, 1994). A sua primeira coleta foi feita apenas em 1817, no Rio de Janeiro, no cume do Corcovado, pelo naturalista italiano Giuseppe Raddi (1770-1829), vindo ao Brasil em expedição científica mandada pela coroa da Áustria juntamente com a comitiva da princesa Leopoldina. O naturalista coletou galhos do pinheiro com uma pequena pinha e a enviou para a Europa. Apenas em 1819, a espécie teve sua primeira descrição científica feita pelo botânico Antônio Bertolini que a nomeou de *Columbea angustifolia* Bertol. (Mattos, 1994). Muitas descrições foram feitas até a última efetuada por Kuntze em 1893. A araucária então passou a ser chamada de *Araucária angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Reitz e Klein, 1966). A espécie *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, pertencente à família Araucariaceae, conhecida popularmente com diversos nomes que variam de região para região, como por exemplo, pinho, pinheiro-do-paraná, pinheiro-brasileiro, pinheiro-caiová, pinheiro-das-missões e pinheiro-são-josé (Reitz e Klein, 1966). Ocorre principalmente nos estados do sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), ocorrendo em alguns pontos de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e na província de Misiones na Argentina (Reitz e Klein, 1966) (Figura 1).

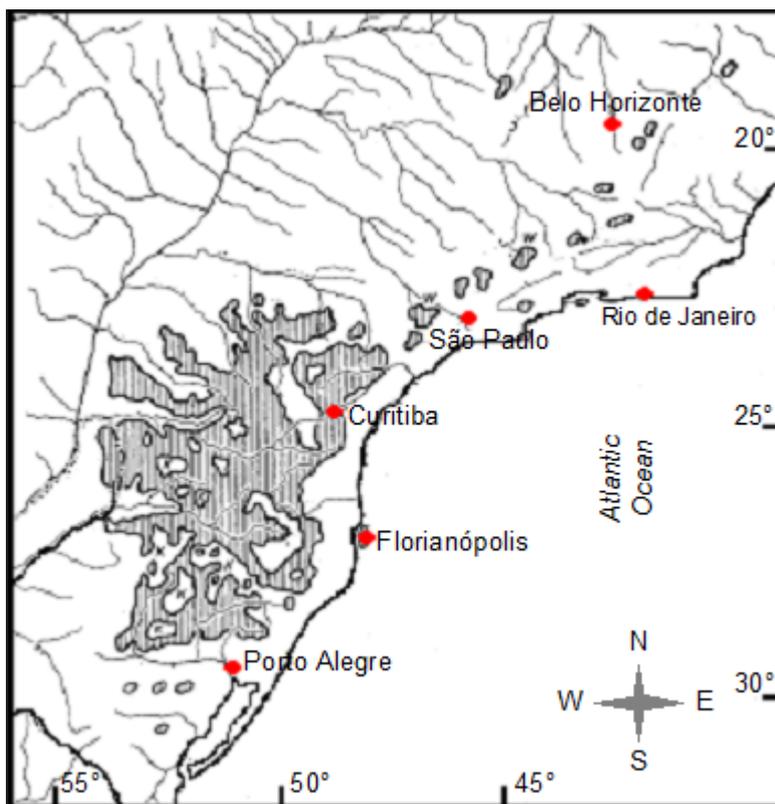


Figura 1- Mapa de ocorrência natural de *Araucaria angustifolia*.

São árvores altas que podem chegar a medir até 50 metros de altura por até 2 metros de diâmetro, o tronco em geral é cilíndrico e reto, raras vezes possui ramificações, a casca é grossa de até 15cm. As flores masculinas são constituídas de uma escama coriácea, as escamas se arranjam na inflorescência masculina em espiral e se abrem, primeiramente, as da base para deixarem o pólen livre e à disposição do vento para serem transportado até o estróbilo feminino. Já as flores femininas em estróbilo (pinhas) são protegidas por numerosas folhas muito próximas umas das outras, brácteas escamiformes, coriáceas, sem asas (Reitz e Klein, 1966). Sua Dispersão de pólen é mediada pela ação do vento e a dispersão de sementes ocorre pela ação da gravidade (Souza M, I, F. 2006). As sementes (pinhões) são lisas achatadas ou não, com ápice formado de um tecido frouxo e seco, terminando com um espinho achatado, a amêndoa branca ou rosada é constituída de amilácea, envolvida pelas brácteas ventral e dorsal. O amadurecimento do pólen e a polinização geralmente se efetuam em setembro, pinhas maduras de Fevereiro até Dezembro (Reitz e Klein, 1966). A forma da copa é um indicativo do estágio ontogênico dos indivíduos de Araucária, quando jovens apresentam formato cônico e quando adultas apresentam copa no formato de taça ou umbela (Reitz & Klein, 1966). Além da madeira essa espécie produz resina e o pinhão para a alimentação humana e fauna nativa. As espécies *A. angustifolia* e *A. araucana* (Mol.) K., são

as únicas representantes da família Araucariaceae na América do Sul, ambas pertencem ao gênero *Araucaria* (Stefenon et al., 2006). Nas décadas de 1950 a 1970, a *A. angustifolia* foi muito explorada por possuir uma madeira de alta qualidade. Estima-se que restam cerca de 1 a 5% da área original das florestas de araucária, sendo classificadas como espécie da categoria vulnerável na Lista Oficial de Espécies Ameaçadas da IUCN (Souza I,F,S. 2006). A *Araucaria angustifolia* é uma conífera primariamente dióica, mas há ocorrência de alguns exemplares monóicos (Stefenon e Capestrano, 2009). Acredita-se que exemplares monóicos de *A. angustifolia* sejam provenientes de alguma infecção patogênica ou alguma moléstia em árvores já adultas (Reitz e Klén, 1966). Na ausência de endogamia, a dioicia em espécies vegetais garante a manutenção de maior diversidade genética, pois obriga a ocorrência de polinização cruzada (alogamia).

A auto-incompatibilidade (AI) é a incapacidade de uma planta fértil formar sementes quando fertilizada por seu próprio pólen. É um mecanismo fisiológico, com base genética, que promove a alogamia (Schifino-Wittmann e Dall’Agnol, 2002.) Como barreira reprodutiva, a pré-fertilização é um dos menos dispendiosos mecanismos que impedem a autofecundação, considerando a alocação de recursos maternos. A auto-incompatibilidade é, portanto, um mecanismo que favorece a alogamia, promovendo, desta forma, a manutenção da variabilidade genética. Existem dois tipos principais de AI, a gametofítica (AIG), em que a especificidade do pólen é gerada pelo alelo S do genoma haplóide do grão do pólen (gametófito), e a esporofítica (AIE), em que a especificidade é gerada pelo genótipo diplóide da planta adulta (esporófito) que deu origem ao grão de pólen. O fenômeno da auto incompatibilidade (AI) tem sido definido de diversas maneiras ao longo do tempo (De Nettancourt,2000).

2.Objetivos

Este trabalho objetivou testar a viabilidade das sementes e a presença de evidências moleculares de autopolinização em um indivíduo monóico de *A. angustifolia* encontrado em sua área natural de ocorrência, na cidade de Lages, Santa Catarina, Brasil

Com base em descobertas anteriores da ocorrência de *A. angustifolia* monóica Reitz e Klén (1966), foram testadas as seguintes hipóteses:

- a) As sementes produzidas pelo indivíduo monóico estudado são viáveis e vão gerar plântulas morfológicamente normais.
- b) Ao menos parte das sementes produzidas são oriundas de autopolinização.

3. Materiais e Métodos

3.1. Material Vegetal

Sementes geradas por polinização aberta de um exemplar monóico de *A. angustifolia* descrito por Stefenon e Capestrano (2009) foram coletadas no ano de 2009 e germinadas em vasos de plásticos com solo humoso adquiridos em uma floricultura (Figura 2). As plantas foram irrigadas diariamente. Todo o experimento foi desenvolvido no campus da UNIPAMPA/São Gabriel.



Figura 2- Semente já germinada de um exemplar de *Araucaria angustifolia*, com aproximadamente 18 cm de altura.

3.2.Extração do DNA

Após a germinação das sementes, folhas frescas ou raízes das mesmas foram coletadas para a extração de DNA. O procedimento utilizado para a extração do DNA foi o método CTAB 2% (brometo de cetil trimetil amônio), de acordo com o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1990) e adaptado por Stefenon et al. (2004) específico para a espécie.

3.3.Análise molecular de marcadores microssatélites

Diversas técnicas de biologia molecular são capazes de detectar a variabilidade genética por análise de sequência de DNA (polimorfismo genético), que permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares que cobrem grande parte do genoma do organismo. Os marcadores microssatélites utilizam-se de pares de iniciadores específicos (*primers*) complementares às sequências únicas que flanqueiam a região repetitiva do genoma. Apresentam natureza multialélica e requerem pequena quantidade de DNA para sua amplificação (Weber & Wong, 1993). A primeira descrição de marcadores microssatélites para *Araucaria* foi publicada por Scott et al. (2003), desenvolvidos para *A. cunninghamii* (Hook.) Oerst.. Posteriormente, Salgueiro et al. (2005) e Schmidt et al. (2007) desenvolveram SSR específicos para *A. angustifolia*. Neste trabalho foram analisados quatro locos microssatélites [CRCAc2 (Scott et al. 2003), AA01 (Schmidt et al. 2007), Ag45 e Ag94 (Salgueiro et al. 2005)] , conforme descrito na Tabela 1, tendo por base a descrição original dos autores. As condições de amplificação via PCR estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 1. Os quatro loci microssatélites, suas sequências repetidas, a sequência dos *primers* e os respectivos autores que os desenvolveram.

Loco	Sequência (5' para 3')	Autor
AA01	R: TGA CGG GTT CAC TCC TAC CT F: TAG GAA CCC CCA TTC ATT TG	Schmidt et al. 2007
CRCAc2	R: ATG CAT GAC TAG GAT GAA CA F: ATA GTT CTG CTT ATC ACA TCT	Scott et al. 2003
Ag45	R: TCC CTC CCT ATG TCC CAA AG F: CCA TCC TCC ATC ATT CAT CC	Salgueiro et al. 2005
Ag 94	R: AGT AAA ATC CGC TAA CAA ATG C F: CCC CAC AAT AAC CCA AGA TG	Salgueiro et al. 2005

Tabela 2- Os quatro loci microsatélites e o protocolo de PCR de cada um.

Loco	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclos	Extensão final
AA01	94°C / 4min	94°C / 45s	56°C / 45s	72°C / 1min	31	72°C / 4min
CRCAc2	92°C / 1min	92°C / 10s	50°C / 25s	72°C / 1min	40	72°C / 2min
Ag 45	94°C/ 5min	94°C/ 1min	60°C/ 1min	72°C/ 1min	30	72°C/ 5min
Ag 94	94°C/5min	94°C/ 1min	55°C/ 1min	72°C/ 1min	30	72°C/ 5min

3.4. Corrida Eletroforética

Para testar as hipóteses deste trabalho foram realizadas corridas eletroforéticas a partir do produto da PCR, em gel de agarose a 3%. Uma solução contendo 3 g de agarose em 100 ml de tampão TBE (tris-borato-EDTA) 1x foi preparada e dissolvida em forno microondas. A solução foi então vertida em uma cuba de acrílico horizontal, montada com pentes de acrílico para a formação de poços para posterior aplicação das amostras. Após a polimerização do gel, adicionou-se tampão TBE 1x e aplicou-se 4 µL do produto de PCR com 3 µL do corante GelRed®. Um marcador de peso molecular (ladder) normalmente de 100pb (concentração: 0,1 µg/µl) ou 50pb (Concentração: 0,05 µg/µl) , 4 µL de ladder para 3 µL de GelRed® foi utilizado para identificação do tamanho dos produtos da PCR amplificados. A eletroforese foi realizada normalmente a uma corrente elétrica de 90 volts, na qual os fragmentos de DNA (que são eletronegativos) migram por repulsão do pólo negativo para o pólo positivo da cuba eletroforética. Após aproximadamente 120 minutos de corrida eletroforética o resultado foi visualizado por transiluminação com luz ultravioleta.

4. Resultados e Discussão

Após o plantio das sessenta e seis sementes e obtenção de 100% de germinação as plântulas em desenvolvimento foram transplantadas para o solo, na área rural do município de São Gabriel, RS. Este resultado demonstra que as sementes são viáveis, confirmando a primeira hipótese testada. A segunda hipótese, que sugere a autopolinização deste exemplar de *A. angustifolia* foi estudada no Centro Interdisciplinar de Pesquisas Biotecnológicas, da

Universidade Federal do Pampa, campus São Gabriel. Podemos afirmar a evidência de autopolinização após termos feitos inúmeros testes com marcadores moleculares, onde 100% da progênie possui genótipo equivalente ao da planta-mãe, tanto em homozigose como em heterozigose (Figura 3 e 4) (Tabela 3).

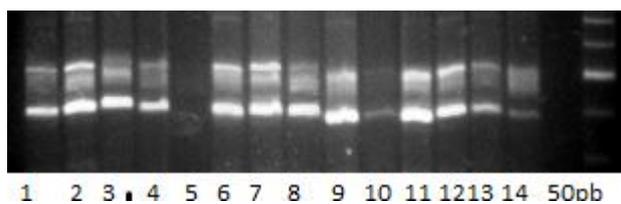


Figura 3- Padrão do gel de agarose 3%, com amplificações do *primer* AA01 e marcador molecular de 50pb. Amostras referentes a progênie.

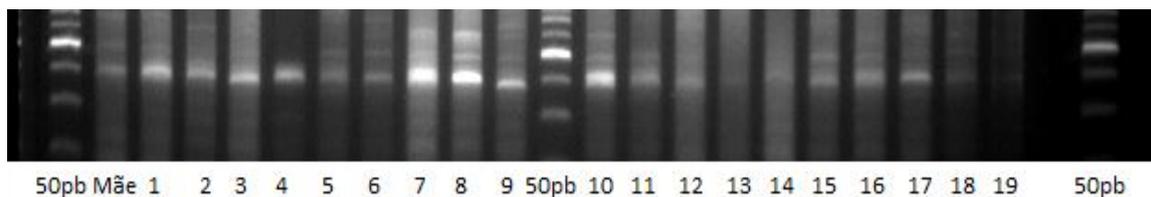


Figura 4- Padrão do gel de agarose 3%, com amplificações do *primer* CRCAC2 e marcador molecular de 50pb. Primeira amostra referente a planta-mãe, demais amostras a progênie.

Tabela 3- Genótipos da planta-mãe e da progênie, para os quatro locos estudados.

Mãe/Progênie	AA01	CRCAc2	Ag45	Ag94
002(mãe)	180/220	200/250	154/168	142/170
1	180/220	200/250	168/168	142/170
2	180/220	200/250	168/168	142/170
3	180/180	200/250	-	-
4	180/180	200/250	168/168	-
5	180/180	-	-	-
6	180/220	200/250	168/168	142/170
7	180/220	200/250	168/168	142/142
8	180/220	200/250	168/168	142/142
9	180/220	200/250	-	142/170
10	180/220	200/200	168/168	-
11	180/220	200/250	168/168	142/142
12	180/220	200/250	168/168	170/170
13	180/180	200/250	168/168	142/170
14	180/180	200/250	-	142/170
15	180/180	200/250	-	-
16	180/180	-	168/168	142/142
17	180/220	-	-	-
18	180/220	200/250	154/154	170/170
19	180/180	-	154/154	142/170
20	180/180	-	154/154	-
21	180/220	-	154/154	142/170
22	180/220	-	154/154	-
23	180/220	250/250	-	142/142
1R	180/220	200/250	-	-
2R	180/220	250/250	154/154	142/142
3R	-	200/250	-	-
4R	180/220	200/200	154/154	170/170
5R	-	250/250	168/168	-
6R	-	-	-	-
7R	180/220	200/250	-	-
8R	180/180	250/250	168/168	-
9R	180/180	250/250	-	-

Não houve polinização cruzada, pois nenhum indivíduo da progênie apresentou alelos diferentes do materno, caracterizando a polinização por pólen oriundo de outra árvore. Este fenômeno deve-se, provavelmente, ao fato de que os estróbilos produtores de pólen estavam situados logo acima dos estróbilos femininos a serem polinizados (Figura 5), enquanto o pólen externo precisaria ultrapassar diversas barreiras naturais até atingir os estróbilos femininos do indivíduo monóico. Apenas a progênie 6R (Raiz) não amplificou em nenhum dos quatro locos, com isso não temos informações sobre este indivíduo.



Figura 5: Detalhes da disposição dos estróbilos masculinos e femininos no exemplar monóico descrito por Stefenon e Capestrano (2009). Fotos de V.M.Stefenon.

Algumas das amostras não amplificaram para um loco específico, mesmo após várias tentativas. Uma possível explicação para este fenômeno é a homozigose para um alelo nulo, proveniente de uma mutação ocorrida na região de anelamento do primer, em células que originaram tanto o gameta masculino quanto o gameta feminino. Contudo, esta hipótese só pode ser testada com o sequenciamento destas regiões. Na AIG, os tubos polínicos só irão crescer e só irá ocorrer fecundação se o alelo presente no grão de pólen não estiver presente no tecido diplóide do estilete (Schifino-Wittmann e Agnol, 2002). Por exemplo, nos seguintes cruzamentos, envolvendo progenitores com diversos genótipos para os alelos S (alelos da AI): S1S2 (feminino) x S1S2 (masculino) os tubos polínicos não irão crescer, não haverá progênie pois possuem o mesmo genótipo. S1S2 (feminino) x S1S3 (masculino) apenas os tubos polínicos S3 irão crescer a progênie será S1S3 e S2S3. S1S2 (feminino) x S3S4 (masculino) grãos de pólen serão S3 e S4, todos os tubos polínicos irão crescer, progênie será S1S3, S1S4, S2S3 e S2S4; portanto, os cruzamentos compatíveis só ocorrerão quando o alelo S do pólen for diferente de qualquer alelo presente no estilete diplóide (Schifino-Wittmann e Agnol, 2002). Nesse processo, o grão de pólen germina e a reação de incompatibilidade ocorre entre o tubo polínico e o estilete. Supõe-se que a ação dos genes S seja ativada após a meiose. Há envolvimento de RNAses e glicoproteínas (Newbigin *et al*, 1993). Muito ainda precisa ser estudado em relação à genética e à reação da AIG. Sabe-se que os tubos polínicos compatíveis apresentam estrutura normal, com deposição reticulada de calose, e os auto-incompatíveis

desenvolvem um depósito irregular de calose mas ainda não está claro o que é causa e o que é consequência (De Nettancourt, 2000). O número de alelos S em diferentes populações de diferentes espécies é muito variável, podendo ser muito alto nas espécies que apresentam alta taxa de fertilidade. Um grande número de alelos diferentes em uma população assegura um número suficiente de polinizações compatíveis, não comprometendo a fertilidade (Heslop-Harrison, 1983). Existem genes que restauram a auto-fertilidade em algumas espécies, ocorrendo naturalmente ou surgindo como resultado de mutações ou poliploidização. Em função do grande número de alelos S a maioria das plantas auto-incompatíveis são plantas de fecundação cruzada (Burton, 1983). Trabalhos recentes confirmam que a estrutura do loco-S é bastante complexa, provavelmente envolvendo genes separados, controlando as funções do pólen e do pistilo (McCubbin e Kao, 1999), o que sugere certa analogia com o modelo original do loco tripartido para a AIG (Lewis, 1960). Como a *A. angustifolia* é uma espécie primariamente dióica, provavelmente carece de um sistema de auto-incompatibilidade. As evidências de auto-polinização no exemplar monóico estudado no trabalho sugerem a inexistência de tal mecanismo. Contudo, não existem estudos a respeito deste processo fisiológico nesta espécie que permitam confirmar esta hipótese.

5. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho apresentam, pela primeira vez, a evidência de auto-polinização em exemplares monóicos de *A. angustifolia*. *Araucaria angustifolia* é uma espécie primariamente dióica, carecendo de um sistema de auto-incompatibilidade. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram evidências de auto-polinização neste exemplar e sugerem a inexistência de mecanismos de auto-incompatibilidade. Contudo, não há estudos a respeito deste processo fisiológico nesta espécie que permitam confirmar esta hipótese.

Referências Bibliográficas

BORNET, B. e BRANCHARD, M. **Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting.** Canada. Sociedade Internacional de Biologia Molecular de Plantas, 2001.

DE NETTANCOURT, D. **Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants.** Berlin : Springer, 2000.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. 1990. **Isolation of plant DNA from fresh tissue.** Focus, 12.

FERREIRA, M.E. e GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 1966

HESLOP-HARRISON, J. **Self-incompatibility: phenomenology and physiology.** Proceedings of the Royal Society of London B, 1983.

KARP, A. KRESOVICH, S. BHAT, K.V. AYADA, W. G. e HODGKIN, T. **Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies.** IPGRI technical bulletin n° 2. International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy, 1997.

LEWIS, D. **Genetic control of specificity and activity of the S antigen in plants.** Proceedings of the Royal Society of London B, 1960.

LITT, M. e LUTY, J.A. **A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene.** American Journal of Human Genetics, 1989.

MANTOVANI A, MORELLATO APC AND REIS MS. **Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze.** Revista Brasileira de Botânica. 2004.

MATTOS, J.R. **O pinheiro-brasileiro**. Lages, Santa Catarina, Brasil. Editora Artes Gráficas Princesa LTDA, 1994.

MCCUBBINA, A. e KAO, T. **The emerging complexity of self-incompatibility (S-) loci**. Sexual Plant Reproduction, 1999.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. e DALL'AGNOL, M. **Auto-incompatibilidade em plantas**. Ciência Rural, Santa Maria, 2002.

NEWBIGIN, E., ANDERSON, M.A., CLARKE, A.E. **Gametophytic self-incompatibility systems**. The Plant Cell, 1993.

REITZ, R. e KLEIN, R.M. **Araucariaceas**. Flora Illustrada Catarinense. 1966

ROMANO, E. e BRASILEIRO, A. C. M. **Extração de DNA de plantas**. CENARGEN/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

SALGADO-LABORIAU, M. L. **História Ecológica da Terra**. São Paul. Editora Edgar Blücher, 1994.

SALGUEIRO, F.; CARON, H.; SOUZA, M.I.F.; KREMER, A. e MARGIS, R. **Characterization of nuclear microsatellite loci South American Araucariaceae species**. Molecular Ecology, 2005.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. e DALL'AGNOL, M. **AUTO-INCOMPATIBILIDADE EM PLANTAS**. Ciência Rural. Santa Maria, 2002.

SCHMIDT, A.B; CIAMPI A.Y.; GUERRA, M.P. e NODARI, R.O. **Desenvolvimento e caracterização de marcadores microsatélites (SSRs) para Araucaria angustifolia (Bert.), O. Kuntze**. Molecular Ecology Notes, 2007.

SCOTT, L. J.; SHEPHERD, R.; Henry, R.J. **Utility and evolution of microsatellites in the Araucariaceae**. Plant Systematics and Evolution, 2003.

SCOTT,L.J., SHEPHERD, M. e HENRY, R.J. **Characterization of highly conserved microsatellites loci in *Araucaria cunninghamii* and related species.** Plant Systems Evolution, 2003.

SOUZA, M. I. F. **Análise da diversidade genética de populações de *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze utilizando marcador AFLP.** Rio de Janeiro, Brasil. Instituto de Biologia, departamento de genética, 2006.

STEFENON, V. M. e NODARI, R. O. **Marcadores Moleculares no Melhoramento Genético de Araucária.** Revista Biotecnologia Ciência e desenvolvimento, 2003.

STEFENON, V.M.; NODARI, R.O. e GUERRA, M.P. **Genética e conservação de *Araucaria angustifolia*: III. Protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPD para análise da diversidade genética em populações naturais.** Biotemas 2004.

STEFENON VM, GAILING O AND FINKELDEY R. **Phylogenetic relationship within genus *Araucaria*(Araucariaceae) assessed by means of AFLP fingerprints.** Silvae Genet, 2006.

STEFENON, V. M. e CAPRESTANO, C. A. **Monoicy in *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae): I. Morphological aspects of the reproductive structures.** Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2009.

WEBER, J. L. e WONG, C. **Mutation of human short tandem repeats.** Human Molecular Genetics, 1993.

WILLIAMS, J.G.K. KUBELIK, A. R. LIVAK, K.J. RAFALSKI, J. A. e TINGEY, S. V. **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** Nucleic Acids Res 18:6231-6235. 1990.

ZIETKIEWICZ, E. RAFALSKI, A. E LABUDA, D. **Genome fingerpringting by simples sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification.** Genomics 1994.