

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**

Cristina Silva Sant'Anna

**DIVERSIDADE GENÉTICA, ESTRUTURA GENÉTICA  
ESPACIAL E DISPERSÃO REALIZADA DE PÓLEN E  
SEMENTES EM UMA POPULAÇÃO CONTÍNUA DE *Araucaria  
angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE NO PLANALTO NORTE DE  
SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada a  
Universidade Federal de Santa  
Catarina como parte dos requisitos  
necessários para a obtenção do título  
de Mestre em Ciências, área de  
concentração: Recursos Genéticos  
Vegetais.

Florianópolis  
Fevereiro de 2011



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

S232d Sant'Anna, Cristina Silva  
Diversidade genética, estrutura genética espacial e dispersão realizada de pólen e sementes em uma população contínua de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no planalto norte de Santa Catarina [dissertação] / Cristina Silva Sant'Anna ; orientador, Maurício Sedrez dos Reis. - Florianópolis, SC, 2011.  
89 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Recursos genéticos vegetais. 2. Pinheiro-do-paraná - Santa Catarina. 3. Análise ambiental. 4. Pólen - Espalhamento. 5. Variação (Genética). 6. Conservação da natureza. I. Reis, Maurício Sedrez dos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

CDU 631



## **Agradecimentos**

A meus pais, Tânia e Milton Sant'Anna pelo exemplo de vida e dignidade e as minhas irmãs Juliana e Betina pela força, carinho e amor.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, Alison, Sarah, Regina, Ramon, Vinícius, Aline, Mathias, Rafael, Paula, Clarissa e Amanda, pela amizade, colaboração, momentos de descontração e ensinamentos. Em especial agradeço ao Gustavo Henrique Klabunde pelo incondicional apoio, incentivo, confiança e ensinamentos.

Ao pessoal da GE (General Electric) pelo suporte aos inesgotáveis troubleshootings no nosso sequenciador MegaBACE, em especial ao Gustavo Avelar pelos valiosos e incansáveis ensinamentos no processo de genotipagem.

Ao Professor Edmundo Grisard pela grande ajuda prestada.

A Capes pela bolsa concedida durante dois anos do mestrado e a Epagri pela disponibilização do alojamento.

Ao pessoal do Núcleo de Pesquisas em Florestas Tropicais, em especial, Alison, Montagna, Steiner, Diogo, Giovani, André, Roberta, Caio e Luis Guilherme que colaboraram com a coleta em campo e nas maratonas de extração de DNA.

Aos colegas do SNUPA pelos momentos de socialização do conhecimento e confraternização, em especial agradeço ao Giovani por todo apoio e pelas incansáveis ajudas no campo e nas várias consultas ao banco de dados.

Aos amigos biólogos pelo apoio e incentivo. Especialmente aos amigos da Botânica, Ademir Reis, Thaysi e Rafaela.

Aos colegas da Pós, Henrique, Clarissa e Juliano, pela parceria nos estudos.

As amigas, Mariane, Marília, Mariana, Laura, Camila, Ana, Priscila e Fernanda, pela amizade e pela torcida.

Ao meu co-orientador Adelar Mantovani pelo apoio, incentivo aos microssatélites e fornecimento dos primers. E ao pessoal do laboratório DNA/ UDESC Lages, em especial ao Alison e ao Newton.

A professora Tânia Castellani pela valiosa experiência de ensino no estágio de docência e o reconhecimento e incentivo com a manutenção da aula nos posteriores três semestres.

A família Araucariaceae, em especial Valdir Marcos Stefenon e Andréa Branco Schmidt pelo grande apoio no momento de maior desafio do trabalho.

Ao Professor Maurício Sedrez dos Reis pelo aceite de orientação e pelo apoio logístico no trabalho.

Ao professor Rubens Onofre Nodari pela orientação, pelos ensinamentos e tempo dispensados e além de tudo pela confiança no meu trabalho. Por toda preocupação comigo e com o meu trabalho. Professor pelo qual experimentei o profundo sentimento de admiração.

Ao amigo Alexandre Magno Sebbenn pela orientação, pelo auxílio na parte das análises, além da participação em todo processo de dissertação. Pelos ensinamentos e por todo incentivo. Por toda preocupação comigo e com o meu trabalho. Professor pelo qual também experimentei o profundo sentimento de admiração.

Ao meu namorado Ricardo Bittencourt pela orientação no planejamento e execução do trabalho de campo e apoio durante todo o processo de laboratório, além de todo carinho e amor nestes três anos de jornada.

## RESUMO

Os objetivos deste estudo foram investigar a partir de marcadores microssatélites a distância e os padrões realizados de dispersão de pólen e sementes, a estrutura genética espacial (EGE) e a dinâmica da endogamia entre gerações de uma população de *Araucaria angustifolia*, localizada em uma floresta contínua da Reserva Genética de Caçador, estado de Santa Catarina. Para fazer isso, uma parcela de 7,2 ha foi estabelecida no interior da reserva, onde foram mapeadas, sexadas, medido diâmetro a altura do peito (DAP) e genotipadas todas as 290 árvores adultas existentes, além de uma amostra de 223 juvenis. O teste de desequilíbrio de ligação, não detectou nenhum indício de desequilíbrio entre os locos avaliados, indicando que estes podem ser usados em estudos de diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e análise de parentesco. Dos 513 indivíduos genotipados a partir de nove locos foram detectados 86 alelos, a heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e=0,639$ ) foi maior que a heterozigosidade observada ( $H_o=0,559$ ) e o índice de fixação positivo e significativamente diferente de zero ( $F=0,125$ ), o que indica que a população tem altos níveis de diversidade genética, embora também apresente endogamia. Quando a população foi separada em faixas etárias, os índices de diversidade genética e de fixação diferiram entre adultos e juvenis. Ambas heterozigosidades observada e esperada foram significativamente maiores nos adultos ( $H_o=0,580$ ,  $H_e=0,647$ ) do que nos juvenis ( $H_o=0,534$ ,  $H_e=0,624$ ). O alto índice de fixação observado nos adultos ( $F=0,096$ ) foi atribuído, em parte, ao efeito Wahlund, devido à presença de EGE na população. Após descontar o efeito Wahlund o índice de fixação diferiu entre adultos ( $F=0,082$ ) e juvenis ( $F=0,163$ ). A análise EGE revelou estruturação genética significativa nos adultos e juvenis até 20 m. A EGE foi causada possivelmente pela dispersão de sementes nas vizinhanças da árvore materna e dispersão curta do pólen. O poder de exclusão do par de parentes para o conjunto de locos foi alto ( $P_{Par-parente}=0,99998$ ), mostrando que esta bateria de locos tem alto poder para resolver testes de parentescos. O estudo da dispersão de pólen e sementes foi realizado dividindo a população adulta em duas classes etárias, sub-adultos (20 cm<DAP<30 cm) e adultos (DAP≥30 cm) e utilizando-se os juvenis. A análise de parentesco indicou que a grande maioria dos parentais maternos e paternos está dentro da parcela, revelando uma baixa taxa de imigração de sementes (5% nos juvenis e 9% nos sub-adultos) e de

pólen (5,9% nos juvenis e 14% nos sub-adultos). Este estudo também revelou uma alta frequência de dispersão de pólen (50% até 130 m) e sementes (50% até 133 m) a curtas distâncias. Em conclusão, os resultados indicam que a população estudada é importante para a conservação genética *in situ* e pode ser utilizada para a coleta de sementes para a conservação *ex situ*, dado os altos níveis de diversidade genética que ela apresenta. Entretanto, é fundamental considerar que sementes coletadas de polinização aberta vão conter alguns níveis de endogamia advindo do cruzamento entre parentes, devido a presença de estrutura genética espacial na população reprodutiva.

**Palavras-chave:** Araucária, espécie arbórea, análise de parentesco, dispersão gênica realizada, estrutura genética espacial, conservação.

## ABSTRACT

The aims of this study were to investigate by microsatellite loci the realized patterns of seed and pollen dispersal, the spatial genetic structure (SGS) and the dynamic of inbreeding among generations of an *Araucaria angustifolia* population located in a continuous forest of the Reserva Genética de Caçador, Santa Catarina State. To make this, a 7.2 ha plot was established inside of the reserve, where all 290 adult trees and 223 juveniles were mapped, sexed, measured the diameter at breast height (dbh) and genotyped. The linkage disequilibrium test did not detect indications of linkage disequilibrium between pairwise loci, indicating that this battery of loci can be used for studies of genetic diversity and structure, mating system analysis and parentage tests. To the total sample of 513 individuals were detected 86 alleles, expected heterozygosity in Hardy-Weinberg equilibrium ( $H_e=0.639$ ) higher than the observed heterozygosity ( $H_o=0.559$ ) and a positive and significant fixation index ( $F=0.125$ ), which indicate that the population have high levels of genetic diversity, although also presents inbreeding. When the population was split in etaries stages, the genetic diversity indexes and the fixation index were different between adults and juveniles. Both observed and expected heterozygosity were significant higher in adults ( $H_o=0.580$ ,  $H_e=0.647$ ) than in juveniles ( $H_o=0.534$ ,  $H_e=0.624$ ). The high fixation index observed in the adults ( $F=0.096$ ) was attributed in part to the Wahlund effect, due the presence of SGS in the population. After subtracting the Wahlund effect, the fixation index differed among adults ( $F=0.082$ ) and juveniles ( $F=0.163$ ). The SGS analysis revealed significant genetic structuring in adults and juveniles up to 20 m. The cause of the SGS was possibly the seed dispersed near to the mother tree and short pollen dispersal. The combined over loci exclusion power of the parent pair was high ( $P_{\text{Pair-parent}}=0.99998$ ), showing that this loci battery have high power to resolve parentage tests. The study of the pollen and seed dispersal was carrying out splitting the adult population in two etary classes, sub-adults (20 cm<DAP<30 cm) and adults (DAP≥30 cm) and using the juveniles. The parentage analysis indicated that the great majority of the maternal and paternal parents is inside of the plot, revealing a low rate of seeds (5% in the juveniles and 9% in the sub-adults) and pollen (5.9% in the juveniles and 14% in the sub-adults). This study also revealed a high frequency of short pollen (50% until 130 m) and seeds dispersal distance (50% until 133 m). In conclusion, the results indicate that the studied population is important for *in situ*

conservation and can be used to seed collect for *ex situ* conservation plans due its high levels of genetic diversity. However, it is important to consider that the seeds collected from open polinization will contain some levels of inbreeding due mating among relatives caused by the presence of SGS in the reproductive population.

**Key-words:** Araucária, parentage analysis, realized gene dispersal, spatial genetic structure, tree specie, conservation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Gel de agarose com amplificação dos locos Ag23, Ag62 e Ag94.....33
- Figura 2. Genotipagem de Araucária com painel biplex A de marcadores microssatélites.....34
- Figura 3. Distribuição espacial de todos os genótipos adultos de *Araucaria angustifolia* na parcela de estudo, RGF de Caçador/SC.....42
- Figura 4. Distribuição espacial da amostra dos juvenis de *Araucaria angustifolia* na parcela de estudo, RGF de Caçador/SC.....43
- Figura 5. Distribuição de frequência em classes diamétricas de todos os indivíduos adultos de *Araucaria angustifolia* existentes na parcela da RGF de Caçador.....45
- Figura 6. Distribuição das frequências alélicas nos nove locos microssatélites de indivíduos adultos e juvenis de *A. angustifolia* na RGF de Caçador - SC.....50
- Figura 7. Estrutura genética espacial nos indivíduos adultos e nos juvenis de *Araucaria angustifolia* na RGF de Caçador.....61
- Figura 8. Distância de dispersão de pólen (a) e sementes (b), determinada por análise de parentesco nos juvenis e sub-adultos em *Araucaria angustifolia*.....72



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Os nove locos microssatélites, suas sequências repetidas (motivo), a sequência dos <i>primers</i> e os respectivos autores que os desenvolveram.....	31
Tabela 2. Sequência dos <i>primers</i> marcados com fluorescência azul (FAM) e verde (HEX) em combinação biplex e em reações simples.....	32
Tabela 3. Características fenotípicas dos adultos e dos juvenis amostrados de <i>Araucaria angustifolia</i> na parcela. n é o número de indivíduos.....	44
Tabela 4. Desequilíbrio de ligação entre os locos de árvores adultas e juvenis de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	47
Tabela 5. Frequências alélicas e presença de alelos exclusivos nos indivíduos adultos e juvenis na população de <i>A. angustifolia</i> na RGF de Caçador – SC.....	49
Tabela 6. Diversidade genética e endogamia na amostra agrupada de árvores adultas e juvenis de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	53
Tabela 7. Diversidade genética e endogamia em locos microssatélites de árvores adultas e juvenis de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	56
Tabela 8. Estimativas de parâmetros da estrutura genética especial para adultos juvenis de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	64
Tabela 9. Dispersão de pólen e sementes medida nos juvenis e sub-adultos de <i>Araucaria angustifolia</i> na Reserva Genética Florestal de Caçador - SC.....	69



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
A espécie <i>Araucaria angustifolia</i> .....	21
Fragmentação Florestal e Diversidade Genética.....	22
Marcadores Microssatélites.....	25
Fluxo gênico.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
Área de estudo.....	28
Demografia.....	28
Coleta para a caracterização genética.....	29
Extração de DNA.....	30
Amplificação do DNA via PCR.....	30
Corrida Eletroforética.....	32
Genotipagem.....	33
Análise de agregação dos indivíduos.....	34
Análises da diversidade genética, índice de fixação e desequilíbrio de ligação.....	35
Análises da distribuição espacial dos genótipos.....	35
Estimativa da dispersão gênica histórica da análise da estrutura genética espacial.....	37
Análise de parentesco.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
Estrutura populacional.....	41
Desequilíbrio de ligação, diversidade genética e endogamia.....	46
Diversidade genética e endogamia nas gerações.....	55
Estrutura genética espacial intrapopulacional.....	60
Dispersão gênica histórica.....	63
Poder de exclusão.....	65
Dispersão realizada de sementes e pólen.....	65
Distância de dispersão de pólen e sementes.....	68
6. SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	76
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79



## 1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um dos 25 hotspots de biodiversidade reconhecidos no mundo, áreas que perderam pelo menos 70% de sua cobertura original, mas que, juntas, abrigam mais de 60% de todas as espécies terrestres do planeta. Além disso, a Mata Atlântica é, provavelmente, o ecossistema mais devastado e mais seriamente ameaçado do planeta. Nesse hotspot em que o ritmo das mudanças está entre os mais rápidos, conseqüentemente, a necessidade de ação para conservação é mais urgente (Leal & Câmara, 2005). Resta menos de 8% da cobertura original da Mata Atlântica no Brasil, Paraguai e Argentina, a maior parte distribuída em pequenos fragmentos. A rica biodiversidade da região está ameaçada, enquanto a população humana mantém seu crescimento explosivo e a aspiração por um estilo de vida cada vez mais consumista continua a fazer crescer a demanda sobre o ambiente (Moore, 2005).

O estado de Santa Catarina era originalmente coberto pela Mata Atlântica. Dentro deste bioma, a Floresta Ombrófila Mista (ou Floresta de Araucária) que atingia 42,5% do território estadual, hoje não ultrapassa 5% da sua cobertura original se encontra na forma de fragmentos e, em grande maioria, cobertos com formações secundárias em fase inicial ou intermediária de sucessão (Guerra *et al.*, 2002). Grande parte dos povoamentos naturais de Araucária foi devastada para a exploração da madeira, bem como para a expansão da agropecuária e de reflorestamentos com espécies exóticas (Gubert Filho, 1989). A exploração da floresta de Araucária desde o início da colonização alavancou o desenvolvimento para a região sul do país de maneira predatória, não sustentável seja do ponto de vista social, econômico e ecológico (Guerra *et al.*, 2002). Segundo Mattos (1994), a exploração da Araucária teve seu auge entre as décadas de 50 e 70. Desde então, a falta de uma política ambiental com medidas eficientes para controlar esta exploração desordenada contribuiu para o esgotamento de suas reservas naturais. Portanto, as populações remanescentes encontram-se normalmente degradadas devido a remoção das árvores de melhor qualidade para a extração da madeira.

As espécies endêmicas são de importância crítica por serem restritas a determinadas áreas, como é o caso da Araucária, com distribuição restrita a América do Sul. A Lista Vermelha de espécies ameaçadas de extinção, compilada pela União Mundial para a Conservação da Natureza (IUCN), evidencia que mais de 110 espécies da Mata Atlântica estão ameaçadas, e destas, 29 são consideradas

criticamente em perigo, inclusive a Araucária (Leal & Câmara, 2005). A espécie também se enquadra como vulnerável na lista de espécies em extinção do IBAMA (IBAMA, 2007) (Port. 37-N 1992), em perigo de extinção pelo Workshop “Revisão da Lista da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção”, realizado em 2005 e mais recentemente, no ano de 2008, entrou na Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção do Ministério do Meio Ambiente.

Muitas espécies de coníferas, como a Araucária, ocorrem em grandes populações, com distribuição contínua, enquanto que outras ocorrem em populações restritas e isoladas. Especialmente neste último caso, assim como nos pequenos fragmentos remanescentes, a deriva genética pode ocasionar erosão da variabilidade genética. No caso da Araucária, em grande parte dos remanescentes as populações podem estar se tornando inviáveis e sujeitas ao desaparecimento, devido ao rompimento da dinâmica da sua regeneração, amadurecimento e reprodução. Ademais, mesmo que esse ciclo se complete, o pequeno tamanho efetivo das populações nos fragmentos torna as futuras gerações cada vez mais frágeis devido ao aumento da endogamia e perda de alelos pelo efeito da deriva genética (Shimizu *et al.*, 2000).

Diante deste cenário de paisagem com remanescentes florestais distribuídos de forma extremamente fragmentada, com distâncias e tamanhos destes fragmentos muito variados, as preocupações relacionadas à conservação e ao uso dos recursos florestais são evidentes e ações para reverter este quadro necessitam de informações sobre as espécies, para que sejam delineados planos que garantam a continuidade destas populações. Uma das abordagens que pode colaborar neste sentido é a caracterização da diversidade e estrutura genética das espécies (Reis 1996, Premoli *et al.* 2000). Pois, se de fato se quer a sustentabilidade desses fragmentos, além de estudar o aspecto demográfico das espécies, deve-se acrescentar também o estudo de genética de populações, já que nem sempre um número grande de indivíduos representa uma população geneticamente viável (Kageyama *et al.*, 1998).

A integração das informações relativas em níveis de diversidade, distribuição da variabilidade, taxa de cruzamento e fluxo gênico obtidas em diferentes populações (espaço) e em diferentes anos (tempo) permite uma caracterização efetiva da dinâmica da movimentação dos alelos em populações naturais. Tal caracterização mostra-se mais pertinente para o estabelecimento de estratégias de conservação e manejo de populações naturais em plantas, uma vez que

permitem projeções mais realistas de eventos no espaço e no tempo (Reis, 1996).

Detectar o efeito genético da degradação de habitat em árvores longevas é uma tarefa complexa, pois em muitos casos as árvores adultas podem ter se estabelecido antes que a degradação ocorresse. É provável que a diversidade e estrutura genética de adultos remanescentes devem ter sido determinadas antes da fragmentação. Então, avaliar indivíduos adultos pode não trazer informações suficientes em relação aos efeitos genéticos dos processos contemporâneos de degradação ambiental. Uma forma de estudar os processos contemporâneos é comparar geneticamente a diversidade e estrutura de adultos (pré-distúrbio) com coortes jovens (pós-distúrbio) (Kettle *et al.*, 2007).

A maioria dos estudos de caracterização genética de Araucária (Shimizu *et al.*, 2000; Auler *et al.*, 2002; Mantovani *et al.*, 2006) analisou indivíduos adultos, possivelmente refletindo uma condição de menor pressão antrópica do que a atual. Contudo, permanece a necessidade de se avaliar o potencial dos remanescentes florestais de Araucária, em termos de diversidade genética, para a conservação da espécie. Em outras palavras, medir o fruto da atual pressão ecológica que os remanescentes vem sofrendo, avaliando o que está sendo passado geneticamente para as gerações mais recentes para que possam ser estabelecidas estratégias mais eficientes de conservação e manejo da Araucária.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram investigar a diversidade genética e a estrutura genética espacial intra-populacional entre diferentes fases ontogênicas (juvenis e adultos), bem como, investigar a dispersão realizada de sementes e de pólen em uma população contínua de *Araucaria angustifolia*. As seguintes questões foram abordadas:

1. Existem diferenças nos níveis de diversidade genética entre adultos e juvenis da população e onde os níveis são menores, nos adultos ou nos juvenis?
2. Existe endogamia nos adultos e nos juvenis da população e se positivo, onde esta é maior?
3. Existe estrutura genética espacial na geração adulta e nos juvenis da população e se positivo, em qual destes estágios ontogênicos a estrutura é mais forte?
4. Qual a taxa de imigração de sementes e pólen na parcela?
5. Qual a distância e os padrões realizados de dispersão de sementes e de pólen dentro da parcela?
6. Árvores femininas e masculinas de maior diâmetro deixam mais descendentes?

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### **A espécie *Araucaria angustifolia***

A espécie *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze pertence a família Araucariaceae e é conhecida popularmente como Araucária, pinho, pinheiro do Paraná, dentre outros nomes. O gênero *Araucaria* conta com 19 espécies somente no hemisfério sul, das quais duas são oriundas da América do Sul e o restante da Oceania (Setoguchi *et al.* 1998 Guerra *et al.*, 2002). É uma espécie arbórea, conífera e que já constituiu o principal item da economia florestal do país. Além da madeira essa espécie produz resina e o pinhão para a alimentação humana e fauna nativa (Reitz *et al.*, 1978).

*A. angustifolia* é componente marcante da fitofisionomia Floresta Ombrófila Mista, que se estende pelo Planalto Meridional Brasileiro, formando povoamentos puros ou mistos com espécies folhosas e, por vezes, separados por extensões variadas de campos naturais. Sua distribuição natural era contínua nas porções mais elevadas do Planalto Meridional, nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Além disso, ela ocorre, descontinuamente, no estado de São Paulo, nas serras de Paranapiacaba, Cantareira e Campos do Jordão; em Minas Gerais, nas regiões de Poços de Caldas e na Serra da Mantiqueira; e, no Rio de Janeiro, no maciço de Itatiaia e na Serra da Bocaina (Klein, 1960; Reitz & Klein, 1966; Mattos, 1994).

Os indivíduos de Araucária atingem 20 a 50 m de altura e de 1 a 2 m de diâmetro a altura do peito (DAP). Possui tronco cilíndrico e raramente ramificado. Apresenta uma copa de formato peculiar tornando-se uma figura imponente e característica na paisagem do sul do Brasil. 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). A Araucária é heliófila e, a pesar de longeva, tem um comportamento tipicamente pioneiro, avançando pelos campos e sendo gradativamente substituída pela floresta latifoliada (Reitz & Klein, 1966). Entretanto, ainda é controverso o seu comportamento de regeneração natural no interior da floresta (Paludo *et al.* 2009). É uma espécie dióica, raras vezes monóica, com sexos separados em cones ou estróbilos. Os estróbilos masculinos são cilíndricos medindo de 10 a 22 cm de comprimento e de 2 a 5 cm de diâmetro. O estróbilo feminino apresenta forma arredondada, o cone maduro mede de 10 a 25 cm de diâmetro e apresenta um número variável de sementes (5 a 150) seu peso pode atingir mais de 4,7 kg. A dispersão de pólen se dá pelo vento

e a dispersão de sementes primária se dá pela gravidade, e secundária por zoocoria. As sementes apresentam alto valor nutritivo, alimentam a fauna e servem também para consumo alimentar humano. Por conseguinte, a comercialização do pinhão constitui uma significativa fonte de renda para inúmeros pequenos agricultores (Reitz & Klein, 1966; Mattos, 1994; Souza & Hattemer, 2003; Stefenon & Caprestano, 2009, Vieira da Silva & Reis, 2009).

### **Fragmentação Florestal e Diversidade Genética**

A conservação da natureza se fundamenta sobre princípios científicos e éticos que valorizam a diversidade de espécies, as complexas interações ecológicas e o processo evolutivo, que condenam a extinção de espécies provocada por atividades humanas e que estabelecem que a diversidade biológica tem valor intrínseco. O estudo da conservação confronta com a alarmante crise ambiental que visa a combinação de perspectivas básicas e aplicadas para evitar, atenuar ou restaurar a destruição de habitats e comunidades biológicas, a extinção de espécies e a perda da variabilidade genética (Primack *et al.*, 2001).

No contexto da Mata Atlântica e de seus ecossistemas associados, a superexploração e a extração seletiva de madeiras nobres alterou a dinâmica populacional de espécies de interesse econômico, espécies de menor frequência tornaram-se abundantes, enquanto outras se extinguíram nas regiões de exploração. Além disso, a expansão da fronteira agrícola com conseqüentes derrubadas em grandes áreas provocou o isolamento de populações de plantas e animais impedindo a retomada da dinâmica sucessional em áreas de formação secundária e a perda de recursos genéticos (Reis *et al.* 2002).

A intervenção humana tem um efeito desestabilizador sobre os ecossistemas naturais, perturbando seu equilíbrio dinâmico. Dentre as alterações recentes que vêm ocorrendo nas florestas mundiais, destaca-se a fragmentação de remanescentes naturais em pedaços progressivamente menores, isolados por áreas tomadas pelo desenvolvimento agrícola, industrial e urbano. Com esse processo antrópico de fragmentação do habitat, a estrutura da paisagem é modificada, resultando em mudanças na composição e diversidade das comunidades (Metzger, 1999; Tabanez & Virgílio, 2000). A fragmentação introduz uma série de novos fatores na história evolutiva de populações naturais de plantas e animais. Essas mudanças afetam de forma diferenciada os parâmetros demográficos de diferentes espécies e, portanto, a estrutura e dinâmica de ecossistemas. No caso de espécies

arbóreas, a alteração na abundância de polinizadores, dispersores, predadores e patógenos alteram as taxas de recrutamento de plântulas, bem como as de fluxo gênico, comprometendo a sustentabilidade tanto das populações da espécie em questão, quanto dos demais organismos (Viana & Pinheiro, 1998). Em determinado ponto, os fragmentos podem se tornar menores que o mínimo necessário para sustentar uma população ou um território. Espécies incapazes de atravessar a porção não florestal da paisagem (matriz) estarão confinadas em fragmentos, reduzindo seu tamanho populacional e provavelmente sua probabilidade de persistência (Fahrig, 2003).

Outro efeito negativo da fragmentação é o efeito de borda, paisagens mais fragmentadas possuem mais bordas por área de habitat. Os efeitos diretos da criação de bordas incluem distúrbios físicos na vegetação e no solo, mudanças em atributos abióticos como incidência de luz, aumento de temperatura e exposição ao vento e o aumento na entrada de organismos, material (pólen, sementes, poluentes) e energia. Devido às mudanças bióticas e abióticas decorrentes do aumento do efeito de borda que acompanha a fragmentação, os remanescentes podem não conter habitats adequados para espécies de interior da floresta (Holsinger, 2000).

Entre as consequências da fragmentação também estão as alterações que as populações remanescentes sofrem nos padrões de diversidade genética, de troca de genes e conseqüentemente na estrutura genética. A perda de diversidade genética, através da deriva genética, pode reduzir a aptidão individual das espécies, inviabilizando o remanescente populacional. A redução da riqueza alélica e o aumento da endogamia podem limitar a habilidade das espécies a responderem às mudanças devidas à ação de pressões seletivas tornado-as ainda mais vulneráveis a extinção (Kageyama *et al.*, 1998; Ricklefs, 2003).

Uma das principais metas nos programas de conservação, adicionalmente à preservação de habitats, é a manutenção de níveis adequados de diversidade genética em populações de espécies raras, ameaçadas ou que estão inseridas em biomas ameaçados (Hamrick *et al.* 1992, Neel & Ellstrand, 2003). O potencial de responder às mudanças ambientais apresentado pelas espécies é dependente da existência de diversidade genética. Para fins de conservação de espécies que se encontram inseridas em biomas que devem ser conservados, como a *A. angustifolia*, os parâmetros genéticos populacionais são úteis na detecção de populações que apresentem diferentes magnitudes de diversidade genética, e que, desse modo, requerem diferentes estratégias para sua conservação. Ao elaborar um programa de conservação para

espécies vegetais, tornam-se essenciais estudos da estrutura genética populacional assim como dos fatores evolutivos que iniciaram e mantêm essa estrutura (Hamrick *et al.*, 1992). O entendimento do modo como a diversidade genética está organizada entre as populações é de importância primária para a conservação do potencial evolutivo das espécies (Hamrick & Godt, 1989).

Além disso, para a análise da estrutura de populações é fundamental a junção de conceitos de ecologia e genética de populações de forma a orientar as ações a serem efetuadas e definir parâmetros adequados para o monitoramento das mesmas (Kageyama *et al.*, 1998). Nesse sentido, Oyama (1993) já chamava a atenção de que ações efetivas de conservação de florestas tropicais são limitadas. Segundo o autor, dois aspectos básicos da biologia populacional devem ser estudados para fundamentar ações efetivas, sendo eles a estrutura demográfica e a estrutura genética, para que sejam minimizados os prejuízos causados pela destruição e fragmentação das populações naturais, que tem levado à extinção de espécies.

Em populações naturais o uso de marcadores genéticos, há um tempo considerável, tem se mostrado eficiente para caracterização dos níveis de diversidade genética e o grau de endogamia existente em populações (Hamrick & Godt, 1989). Estes podem ser empregados para monitoramento do grau de comprometimento genético de populações naturais decorrente da fragmentação e superexploração.

Em espécies arbóreas, a distribuição espacial, o parentesco intrapopulacional e o sistema de reprodução podem estar associados. Indivíduos próximos tendem a se cruzar mais do que indivíduos localizados espacialmente distantes (Hardesty *et al.*, 2005; Bittencourt & Sebbenn, 2007; Bacles & Ennos, 2008; Bittencourt & Sebbenn, 2008), e se estes são relacionados pela dispersão de sementes próxima a árvore materna, a endogamia biparental pode aumentar na população com o passar das gerações (Young *et al.*, 1996; Young & Boyle, 2000), caso a pressão de seleção contra indivíduos endogâmicos não seja efetiva. Para compreender como se processa a dinâmica da endogamia entre gerações, são necessários estudos em fina escala do sistema de reprodução, distribuição espacial de genótipos e comparações dos níveis de endogamia, existentes em diferentes estágios ontogênicos das plantas.

## 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. As técnicas são utilizadas para diversas aplicações no estudo de genética e melhoramento de plantas (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Das classes de marcadores moleculares disponíveis atualmente os marcadores microssatélites, ou *simple sequence repeats* (SSR), destacam-se por apresentarem um elevado conteúdo de informação por loco gênico. Além disso, reúnem as vantagens de co-dominância (possibilidade de discriminação entre heterozigotos e homozigotos) e de genotipagem por meio da análise de produtos da reação de polimerase em cadeia (PCR) realizada pela eletroforese com detecção de espectro de fluorescências em sequenciador de DNA (Litt & Luty, 1989; Scott *et al.*, 2003). 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 descoberta de locos altamente variáveis nos microssatélites constitui uma enorme vantagem por garantir estimativas de diferenças genéticas com alto poder estatístico (Litt & Luty, 1989; Pinto *et al.*, 2001). Portanto são aplicados em diversas finalidades, tais como mapeamento genético, diagnóstico de doenças, investigação forense, análise populacional, estudos ecológicos, análise de paternidade e biologia da conservação.

Mesmo que demande de tecnologias trabalhosas e custo elevado para o desenvolvimento desses marcadores, a quantidade de informações gerada é compensatória em relação a outras metodologias (Scott *et al.*, 2003). A primeira descrição de microssatélites em *Araucariaceae* foi publicada por Scott *et al.* (2003), desenvolvidos para *Araucaria cunninghamii*. Posteriormente, Salgueiro *et al.* (2005) e Schmidt *et al.* (2007) desenvolveram SSR específicos para *A. angustifolia*. O presente estudo utilizou locos microssatélites desenvolvidos por estes três trabalhos.

Marcadores microssatélites também são ideais para se avaliar o fluxo gênico através da dispersão de pólen e de sementes. Isto por causa do alto poder de exclusão na probabilidade análise de parentesco, devido ao seu alto polimorfismo (Dow & Ashley, 1998). Uma maneira de

avaliar o fluxo gênico através de marcadores genéticos é identificar as árvores maternas e paternas de cada indivíduo juvenil. Conseqüentemente o fluxo gênico pode ser estimado com base na proporção de juvenis que não tiveram seus pais encontrados na área e que, portanto, são filhos de pólen ou sementes advindos de fora da área (Dow & Ashley, 1998; Burczyk *et al.*, 2004).

### **Fluxo gênico**

O fluxo gênico via pólen e sementes é um dos fatores evolutivos mais importantes pois exerce forte influência na estrutura genética das espécies arbóreas. Uma forte atuação do fluxo gênico via pólen promove altos níveis de diversidade genética dentro de populações e baixa diferenciação entre populações e é o principal mecanismo de manutenção da coesão genética de uma espécie (Smouse & Sork, 2004). Em populações naturais o fluxo gênico intenso pode efetivamente contrapor os efeitos de perda de diversidade provocados pela deriva e pode ser a origem de novos alelos nas populações (Burczyk *et al.*, 2004). No entanto, o entendimento do fluxo gênico via sementes e de sua extensão também é essencial para estimar o tamanho reprodutivo de populações de espécies arbóreas tropicais (Hamilton, 1999). Em suma, para prever as mudanças genéticas causadas pela fragmentação em populações de espécies arbóreas, é necessário estudar o fluxo gênico contemporâneo (atual) via sementes e via pólen (Hamrick, 2004).

Matins (1987) já alertava sobre o fato de que nem sempre estimar as distâncias de dispersão de pólen e de sementes reflete diretamente o fluxo gênico efetivo. Haja vista a possibilidade de cruzamentos estar condicionada pela compatibilidade genotípica de pólen e estigma, além do que até o fluxo gênico ser considerado realizado depende ainda de muitos fatores como: vigor e viabilidade de sementes, diferenças na qualidade de plântulas e conseqüentemente sobrevivência e estabelecimento. Daí a necessidade da utilização de marcadores genéticos para efetivamente se estimar intercruzamentos e movimento de genótipos através de sementes e pólen, pelo levantamento das plântulas estabelecidas após dispersão. Não obstante, caracterizar geneticamente as sementes provê estimativas de fluxo gênico efetivo, já a caracterização genética de indivíduos juvenis permite acessar estimativas de fluxo gênico realizado (Burczyk *et al.*, 2004).

Tais análises incluem a determinação da paternidade de sementes de polinização aberta e da distância entre a planta materna e o doador de pólen, bem como da distância de dispersão das sementes

(Burczyk *et al.*, 2004). Estudos da dispersão de pólen como Dow & Ashley (1998); Degen *et al.* (2004); Asuka *et al.* (2005); Hardesty *et al.* (2006); Bittencourt & Sebbenn (2007); Jordano *et al.* (2007); Bacles & Ennos (2008); Bittencourt & Sebbenn, (2008); Nakanishi *et al.* (2008); Gaino *et al.* (2010); Sebbenn *et al.* (2011) tem sido conduzidos com base em marcadores genéticos altamente polimórficos, os microssatélites. Alguns destes têm mostrado que o pólen pode mover-se a distâncias consideráveis entre plantas dentro de populações e que o fluxo de genes é muitas vezes alto (Hardesty *et al.*, 2006; Bittencourt & Sebbenn, 2007; 2008; Bacles & Ennos, 2008), embora outros tenham mostrado justamente o oposto (Degen *et al.*, 2004; Smouse & Sork, 2004).

Como o conceito de fluxo gênico refere-se ao movimento efetivo de alelos entre populações diferentes (Hartl & Clark, 2010), convencionou-se no presente trabalho, usar o termo dispersão de pólen e dispersão de sementes, ao invés de fluxo gênico, por se tratar de apenas uma população contínua (uma única área de estudo) e não isolada.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### Área de estudo

O presente trabalho foi desenvolvido na Reserva Genética Florestal (RGF) de Caçador, no Planalto Norte do Estado de Santa Catarina. Esta área localiza-se na região meio-oeste do município de Caçador – SC, a 15 km do centro da cidade e possui uma área total de 772 ha. A Reserva pertence à EPAGRI – Estação Experimental de Caçador, que detém o título de posse em regime de comodato com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). A RGF está localizada entre latitudes 26°49' e 26°53'S e longitudes 50°59' e 50°53' W, compreendendo altitudes de 900 a 1.104 m. O clima da região é do tipo Cfb de Köppen (mesotérmico, úmido sem estação seca definida, verões frescos, com ocorrência de geadas severas e frequentes no inverno). Os solos predominantes na região são denominados de nitossolo e latossolos (Puchalski, 2006). A cobertura vegetal original desta região é descrita por Klein (1978) como vegetação Ombrófila Mista com predominância de indivíduos de *Araucaria angustifolia* bem desenvolvidos associados principalmente à *Ocotea porosa*, *Ilex paraguariensis* e *Dicksonia sellowiana*.

A escolha dessa área para o estudo se deve ao fato de ser uma floresta natural de Araucária e possuir um histórico de baixa exploração, mantendo desse modo, a integridade ecológica. Atualmente a RGF de Caçador representa um dos maiores remanescentes contínuos com vegetação característica da Floresta Ombrófila Mista no Estado. O histórico de exploração da área foi de corte seletivo há aproximadamente oitenta anos, sendo que é considerada como mata secundária em avançado estado de sucessão (Puchalski, 2006).

### Demografia

Os levantamentos demográficos foram realizados em uma parcela permanente de 72.000 m<sup>2</sup> (300 x 240 m), dividida em sub-parcelas de 100 m<sup>2</sup> (10 x 10 m) para facilitar a localização e avaliação das plantas, visando verificar a densidade e frequência de indivíduos *A. angustifolia*. Dentro desta área, todos os indivíduos de *A. angustifolia* foram mapeados e mensurados.

Todas as plantas foram etiquetadas com placas de alumínio contendo o número da sub-parcela e da planta. As plantas também foram mapeadas com coordenadas x e y para as análises de distribuição e de estrutura genética espacial. As plantas foram avaliadas quanto a altura total, com auxílio de régua dendrométrica para indivíduos jovens e

quanto ao diâmetro a altura do peito (diâmetro a 1,3 m de altura da árvore - DAP) para indivíduos com altura acima de 1,50 m. A partir dos dados coletados foram montadas tabelas com a distribuição de frequências em classes diamétricas.

Em todos os indivíduos que apresentaram DAP acima de 20 cm foi feita a sexagem, verificando-se a existência de estruturas reprodutivas (estróbilos), com o auxílio de binóculos, em três momentos com um intervalo de um ano para a confirmação do sexo. Aqueles indivíduos que apresentaram estruturas reprodutivas foram denominados *adultos* e quando ausentes, *não reprodutivos*. A área de estudo (parcela) em um primeiro momento tinha as seguintes dimensões: 51.000 m<sup>2</sup> (300 x 170 m) e em 2009 ela foi ampliada para 72.000 m<sup>2</sup> (300 x 240 m), para estudo genético. Quando da ampliação, foi também realizada a identificação e avaliação demográfica de todos os indivíduos de Araucária e nos indivíduos adultos (DAP maior que 20 cm) foi feito também a determinação do sexo.

### **Coleta para a caracterização genética**

A coleta para caracterização genética foi realizada em todos os indivíduos adultos da parcela de 7,2 ha. Foram considerados indivíduos adultos todos aqueles que apresentavam DAP maior que 20 cm, visto que muitos já eram reprodutivos.

Para a caracterização dos indivíduos juvenis foram amostrados todos os que estavam dentro do critério pré-estabelecido de: serem maiores que 50 cm de altura até os que possuíam 5 cm de DAP. Contudo, devido a uma idéia inicial do projeto de estudar a regeneração em uma sub-parcela estabelecida no centro da parcela, todos os indivíduos deste local foram coletados para a caracterização genética. Diante disto, 14 indivíduos juvenis ficaram fora do critério pré-estabelecido, possuindo altura de 0,2 a 0,4 m e DAP de 5,2 a 6,4.

A amostragem foi feita coletando-se um ramo contendo cerca de 40 acículas dos indivíduos selecionados. A amostra dos indivíduos adultos foi obtida através do uso de estilingues devido ao porte das plantas. Após a coleta, as acículas foram acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados, contendo aproximadamente 30 gramas de sílica gel azul para a retirada de umidade e evitar a degradação do material biológico. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Genético Vegetal (LFDGV) da Universidade Federal de Santa Catarina onde ficaram armazenadas até o momento da extração de DNA.

### **Extração de DNA**

O procedimento utilizado para a extração do DNA da folha (acícula) foi através do método do CTAB (brometo de cetil trimetil amônio) de acordo com o protocolo desenvolvido por Stefenon *et al.* (2004) específico para a espécie. Após a extração de DNA foi feita a quantificação de cada amostra utilizando-se o espectrofotômetro *NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)*. De cada amostra foram tiradas três medidas e feita uma média aritmética devido as possíveis variações e falta de homogeneidade dentro de cada amostra. Após a quantificação preparou-se a solução trabalho de cada amostra diluindo-se com água miliQ autoclavada a uma concentração final de 10 ng/μl.

### **Amplificação do DNA via PCR**

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica que permite a amplificação exponencial de um fragmento gênico de interesse (Hartl & Clark, 2010). Neste estudo foram amplificados nove locos de microssatélites (Tabela 1) selecionados pelo fato de serem polimórficos e por não apresentarem desequilíbrio de ligação nos trabalhos de origem.

**Tabela 1.** Os nove locos microssatélites, suas sequências repetidas (motivo), a sequência dos *primers* e os respectivos autores que os desenvolveram.

Loco	Motivo	Sequência (5' para 3')	Autor
<b>Aang01</b>	F (CT) <sub>22</sub>	TGACGGGTTCACTCCTACCT	Schmidt
	R	TAGGAACCCCCATTCAATTG	<i>et al.</i> 2007
<b>Ag20</b>	F (GA) <sub>12</sub>	ACTAGGAATGGATGTTGGTG	Salgueiro
	R	AAGGTATGGCATCATGTCTC	<i>et al.</i> 2005
<b>Ag23</b>	F (TA) <sub>5</sub> (GT) <sub>4</sub>	CCCTGTTAGACCTATGGTTG	Salgueiro
	R	ATATCATCCATCAATGAGGC	<i>et al.</i> 2005
<b>Ag45</b>	F (GT) <sub>4</sub> AT(GT) <sub>7</sub>	CCATCCTCCATCATTCATCC	Salgueiro
	R	TCCCTCCCTATGTCCCAAAG	<i>et al.</i> 2005
<b>Ag56</b>	F (TC) <sub>11</sub>	CCACACTCAAAAACAATAGCAGTTC	Salgueiro
	R	TGAAGTTGGCCAATCAGATAC	<i>et al.</i> 2005
<b>Ag62</b>	F (TC) <sub>13</sub>	ATATGGTGGGGTGCTACAG	Salgueiro
	R	TCCAATCGTTCCTCCAACAG	<i>et al.</i> 2005
<b>Ag94</b>	F (CT) <sub>12</sub>	CCCCACAATAACCCAAGATG	Salgueiro
	R	AGTAAAAATCCGCTAACAAATGC	<i>et al.</i> 2005
<b>CRCA1</b>	F (GA) <sub>19</sub>	ACAACATGGAAAACATATGAG	Scott <i>et al.</i>
	R	CCGTGTAACATTATGACTGC	2003
<b>CRCA2</b>	F (GA) <sub>23</sub>	ATGCATGACTAGGATGAACA	Scott <i>et al.</i>
	R	ATAGTTCTGCTTATCACATCT	2003

Para amplificação dos locos foi utilizado o seguinte conjunto de ciclos e temperaturas: 95 °C por 3 min para desnaturação seguido de 30 ciclos, sendo cada ciclo composto por três fases: a primeira com 95 °C por 30 s, a segunda com a T(a) °C por 45 s e a terceira com 72 °C por 1 min para extensão, e a extensão final a 72 °C por 7 min. Para a amplificação do *primer* Aang01 (marcado com fluorocromo) utilizou-se o seguinte protocolo de mix de PCR: para uma reação com volume total de 12 µl foram utilizados: 1x Taq buffer (biotools), 1U de DNA polimerase (biotools), 100 µM de cada *primer* (F e R), 0,25 mM de cada dNTP (Fermentas), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio (Biotools) e 3 ng de DNA.

Já para a amplificação dos *primers* com cauda (*primer* universal M13 marcado com fluorocromo), técnica *primer-tail*, utilizou-se o seguinte protocolo de mix de PCR: para uma reação com volume total de 20 µl foram utilizados: 1x Taq buffer (biotools), 1U de DNA polimerase (biotools), 100 µM de cada *primer* (F e R), 100 µM de

*primer* M13, 0,25 mM de dNTPs (Fermentas), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio (Biotools) e 3 ng de DNA.

Os *primers* desenvolvidos por Salgueiro *et al.* (2005) foram amplificados nas mesmas condições da publicação, exceto os *primers* Ag20, Ag45 e Ag94, os quais amplificaram em temperaturas de anelamento diferentes, como mostra a Tabela 2. O *primer* desenvolvido por Schmidt *et al.* (2007) Aang01 foi amplificado na mesma condição utilizada pelos autores. Já os *primers* desenvolvidos por Scott *et al.* (2003) amplificaram em diferentes condições das descritas pelos autores. Um *primer* de cada loco foi marcado com fluorocromo. Utilizou-se fluorocromo HEX (verde) e fluorocromo FAM (azul) para os nove locos microssatélites (Tabela 2).

**Tabela 2.** Sequência dos *primers* marcados com fluorescência azul (FAM) e verde (HEX) em combinação biplex e em reações simples.

	Fluorescência marcada	Ta (°C)	Fragmento esperado (pb)
<b>Biplex A</b>			
Ag 94	FAM	55	161 - 191
Ag 20	HEX	58	256 - 270
<b>Biplex B</b>			
Ag 23	FAM	55	265 - 289
Ag 56	HEX	60	166 - 176
<b>Biplex C</b>			
CRCA 1	FAM	55	224 - 232
Ag 62	HEX	55	128 - 134
<b>Biplex D</b>			
Ag 45	FAM	58	173 - 187
CRCA 2	HEX	52	200 - 224
<b>Simples</b>			
Aang01	FAM	56	202 - 252

### Corrida Eletroforética

Para testar a temperatura de anelamento (Ta°C) de cada um dos nove locos microssatélites utilizados neste trabalho, o produto da PCR foi visualizado através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Uma solução contendo 4,5 g de agarose em 300 ml de tampão TBE (tris-borato-EDTA) 1x (tris-Cl 20 mM, ácido bórico 2M, EDTA

(ácido etileno diamono tetracético) 20 mM) era preparada e dissolvida em forno microondas. A solução era então despejada em uma cuba de acrílico horizontal, montada com pentes de acrílico para a formação de poços e aplicação das amostras. Após a polimerização do gel, adicionava-se tampão TBE 1x e aplicava-se 4  $\mu$ L do produto de PCR com 2  $\mu$ L do corante GelRed (Biotium).

A eletroforese era 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 era visualizado por transiluminação com luz ultravioleta, onde o complexo formado pelo DNA e Gel Red fluorescia (Figura 1).

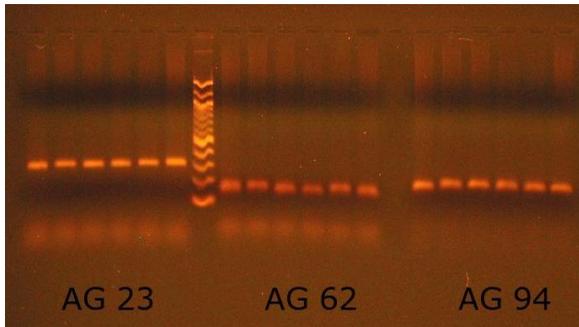


Figura 1. Padrão de gel de agarose com amplificações dos *primers* Ag23, Ag62 e Ag94, todos na Ta 55°C. Agarose 1,5%. Padrão de peso molecular de 100 pb.

### Genotipagem

A leitura dos alelos em sistema de detecção por fluorescência foi realizada em sequenciador MegaBACE 1000 DNA Analysis System Amersham Biosciences Corp. de 96 capilares. Para a eletroforese por capilar foi utilizado produto de PCR diluído 5 x em água miliQ autoclavada. Em 2 $\mu$ l de cada produto diluído foram adicionados 8 $\mu$ l de 0,1% de *Tween 20* (GE-Healthcare) e 0,25 $\mu$ l de MegaBACE ET400-R Size Standard (GE-Healthcare). Para as corridas em sistema biplex utilizou-se apenas 1  $\mu$ l de produto de PCR de cada *primer* marcado com cor diferente. A Figura 2 ilustra a genotipagem de Araucária com painéis biplex.

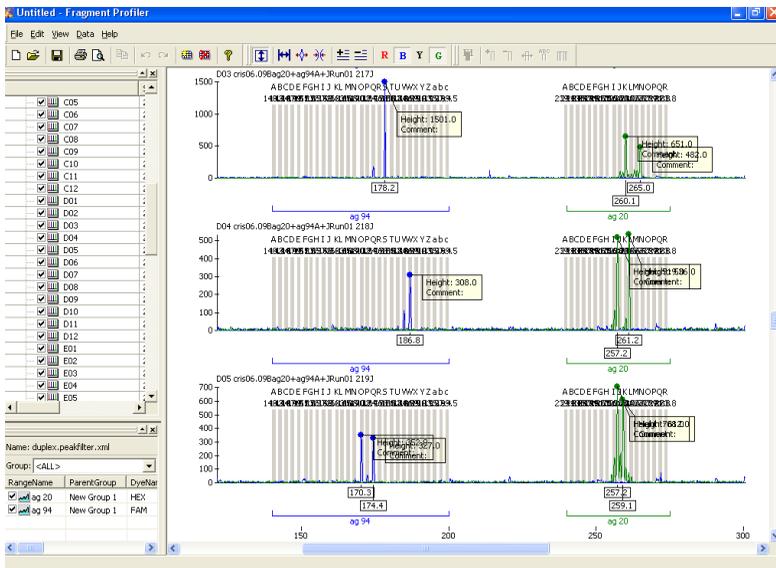


Figura 2. Genotipagem de Araucária com painel bplex A de marcadores microssatélites.

A injeção das amostras foi feita durante 60 segundos com carga elétrica de 3 KV e a corrida eletroforética foi conduzida durante 80 minutos e carga elétrica de 9 KV. Os dados obtidos das 93 corridas foram analisados, através da interpretação dos eletroferogramas, utilizando o software MegaBACE Fragment Profiler 1.2. A partir dos arquivos de saída do programa, foram feitas as análises genéticas populacionais, como descrito a seguir.

### Análise da agregação dos indivíduos

Para verificar se as árvores adultas ou os juvenis apresentavam distribuição espacial agregada dentro da parcela, estimou-se o índice de dispersão descrito por Clark & Evans (1954), utilizando o programa SGS (Degen *et al.*, 2001). Para isto foi utilizada a seguinte equação:

$\hat{R}_{CE} = \hat{R}_o / \hat{R}_E$ , em que  $R_o$  é a distância média do vizinho mais próximo e  $R_E$  é a distância esperada média do vizinho mais próximo. Se  $R_{CE} = 1$ ,  $R_{CE} < 1$  ou  $R_{CE} > 1$ , então a distribuição dos indivíduos é considerada aleatória, agregada ou uniforme, respectivamente.

### **Análises da diversidade genética, índice de fixação e desequilíbrio de ligação**

A diversidade genética para amostra de total de adultos e parcial de juvenis da parcela foi caracterizada para o número total de alelos nos locos ( $k$ ), número médio de alelos ( $A$ ), número efetivo de alelos por locos ( $A_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ), utilizando o programa FSTAT, versão 2.9.3.2. (Goudet, 1995). Os níveis de endogamia dentro das amostras foram quantificados pelo índice de fixação individual ( $F$ ). A significância estatística dos valores de  $F$  foram testados por permutação (10.000). Aplicou-se também neste caso uma correção sequencial de Bonferroni pra múltiplas comparações (95%,  $\alpha=0,05$ ) para evitar falsos positivos. O índice de fixação e as permutações foram obtidos utilizando o programa SPAGEDI 1.3 (Hardy & Vekemans, 2002). O desequilíbrio genotípico entre pares de locos foi estimado para verificar se existia alguma associação entre os locos. Esta análise foi realizada também utilizando o programa FSTAT, versão 2.9.3.2.

### **Análises da distribuição espacial dos genótipos**

A distribuição espacial dos genótipos adultos e juvenis foram realizadas utilizando-se a estimativa do coeficiente de coancestria entre pares de árvores ( $\theta_{xy}$ ) proposto por J. Nason e descrito em Loiselle *et al.* (1995). O coeficiente  $\theta_{xy}$  mede a extensão da similaridade entre os indivíduos  $x$  e  $y$ , relativo a similaridade genética média entre dois indivíduos aleatórios da amostra (Hardy & Vekemans, 2002). Este coeficiente é definido para cada  $k$ -ésimo alelo do  $l$ -ésimo loco em cada par de indivíduos,  $x$  e  $y$ , como:

$$\hat{\theta}_{xy} = \left[ \frac{\sum_l \sum_k (p_{xlk} - \bar{p}_{lk})(p_{yjk} - \bar{p}_{lk})}{\sum_l \sum_k \bar{p}_{lk}(1 - \bar{p}_{lk})} \right] + \left[ \sum_l \frac{1}{(2n_l - 1)} \right]$$

em que  $p_{xlk}$  e  $p_{yjk}$  são as frequências do alelo  $k$  no loco  $l$  no indivíduo  $x$  e  $y$ , respectivamente (assumindo valores de zero, 0,5 e 1 em homozigotos para alelos alternativos, heterozigotos e indivíduos homozigotos para o alelo em consideração, respectivamente).  $\bar{p}_{lk}$  é a

frequência média do alelos  $k$  no loco  $l$  na população amostrada;  $n_l$  é o número de alelos existentes no loco  $l$  (número de indivíduos multiplicados pelo nível de ploidia, menos o número de alelos não amplificados). Na análise dos juvenis foi utilizado como frequências alélicas de referência as frequências estimadas nas árvores adultas. Já na análise dos adultos, assumiu-se que as frequências alélicas dos próprios adultos representavam a frequência da geração parental. Para visualizar a estrutura genética espacial, os valores de  $\theta_{xy}$  foram calculados para a média de pares de indivíduos dentro de dez classes de distância pré-determinadas. Para adultos foram determinadas dez classes, todas de tamanho de 20 m (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200); para juvenis utilizou-se dez classes, cada uma com tamanho de 10 (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100). Para testar se os valores médios de coancestria dentro de cada classe eram significativamente diferentes de zero, o intervalo de confiança a 95% de probabilidade foi calculado para cada valor observado em cada classe de distância, usando 10.000 permutações de indivíduos entre diferentes classes de distância. O intervalo de confiança e os valores médios foram utilizados para construir o correlograma. Estas análises também foram conduzidas utilizando o programa SPAGEDI versão 1.3. Para comparar a extensão da estrutura genética espacial entre adultos e juvenis foi utilizada a estatística  $S_p$  (Vekemans & Hardy, 2004), calculada como segue:

$S_p = -b_k / (1 - \theta_1)$ , em que  $\theta_1$  é a coancestria média calculada entre todos os pares de indivíduos dentro da primeira classe de distância (0-20 m para adultos e 0 a 10 m para juvenis) e  $b_k$  é a inclinação da curva de regressão em relação ao logaritmo da distância espacial (até 200 m para adultos e 100 m para juvenis). Para testar a intensidade da estrutura genética espacial, a posição espacial dos indivíduos foram permutadas 10.000 vezes para obter-se a distribuição de frequências de  $b_k$  sobre a hipótese nula de que  $\theta_1$  e o logaritmo natural da distância entre os indivíduos [ $\ln(d_{xy})$ ] não eram correlacionados.

### **Estimativa da dispersão gênica histórica da análise da estrutura genética espacial**

O programa SPAGeDi 1.3 foi utilizado para estimar a dispersão histórica de genes para adultos e juvenis da análise de estrutura genética espacial assumindo um modelo de equilíbrio entre deriva genética e imigração (Hardy *et al.*, 2006). A dispersão histórica de genes em termos de tamanho de vizinhança ( $Nb$ ) foi estimada como  $Nb = -(1 - \theta_1) / b_k$  (Vekemans & Hardy, 2004), em que  $b_k$  é a inclinação da curva de regressão dentro da classe de distância de  $\sigma_g < d_{ij} < 200$  m para adultos e  $\sigma_g < d_{ij} < 100$  m para juvenis. Este estimador de  $Nb$  é dependente do valor assumido para densidade efetiva de indivíduos reprodutivos,  $D_e$  (Hardy *et al.*, 2006). Assim,  $D_e$  estimado como  $D_e = D(N_e / N)$ , em que a densidade efetiva é a razão entre o tamanho efetivo da população e o tamanho senso da população (Vekemans & Hardy, 2004). De acordo com prévias estimativas realizadas para plantas (Hardy *et al.*, 2006),  $D/10$  e  $D/2$  foram escolhidos como a mínima e máxima estimativa de  $D_e$ , respectivamente. Fixando  $D_e$ , o limite mínimo e máximo a 95% de probabilidade de  $Nb$  foram estimados como  $Nb_{(lower)} = (\theta_1 - 1) / (b_k - 2SE_b)$  e  $Nb_{(upper)} = (\theta_1 - 1) / (b_k + 2SE_b)$ , respectivamente, em que  $SE_b$  é o erro padrão de  $b_k$  que foi calculado por reamostragem jackknifing dos dados através de cada loco (Hardy *et al.*, 2006). O intervalo de confiança a 95% de probabilidade de  $\sigma_g$  foi calculado como  $\sigma_g = \sqrt{Nb / 4\pi D_e}$ , utilizando os limites inferiores e superiores de  $Nb$  (Hardy *et al.*, 2006).

## Análise de parentesco

As estimativas de dispersão de sementes e pólen nos juvenis foram realizadas utilizando análise de parentesco e o programa CERVUS 3.0 (Marshall *et al.*, 1998; Kalinovski *et al.*, 2007). A análise de parentesco foi realizada com base no genótipo dos juvenis, sub-adultos e adultos. Para isto foi utilizado um método de simples exclusão, aceitando a maternidade ou paternidade apenas em casos onde não houvesse nenhuma incoerência entre o trio filho-mãe-pai. Os mais prováveis parentes foram determinados utilizando-se como referência as frequências alélicas estimadas apenas na geração parental, como sugerido por Meagher & Thompson (1987). Os alelos imigrantes, que não se encontravam na população adulta reprodutiva, tiveram sua frequência estimada e foram adicionados ao arquivo com as frequências alélicas de referência da geração parental. As análises de maternidade e paternidade foram conduzidas a partir dos genótipos de 290 adultos (DAP > 20 cm), 223 genótipos juvenis (altura > 50 cm até DAP < 5 cm) e 57 sub-adultos (20 cm > DAP < 30 cm). Para estas análises, foi determinada a provável idade dos juvenis, sub-adultos e adultos com base no incremento médio anual estimado (IMA) em um teste de procedências de *A. angustifolia* estabelecido em Itapeva, estado de São Paulo (Sebbenn *et al.*, 2004). Este estudo observou que o IMA para a média de cinco procedências da espécie para DAP aos seis anos era de 1,99 cm e aos 30 anos era de 0,68 cm. Para altura, o IMA aos dois e seis anos foi estimado em 1,24 m e aos 30 anos em 0,60. Assim, os juvenis amostrados no presente trabalho, com DAP variando entre 0,14 a 6,4 cm e altura variando entre 0,16 a 6,4 cm (Tabela 1) podem ter idade variando de menos de um ano a no máximo 10 anos (6,4 cm/0,68 cm). Devido a isso, árvores com DAP entre 20 a 30 cm que não tiveram o sexo determinado, foram excluídas como possíveis parentais dos juvenis, visto que de acordo com o raciocínio para o cálculo das idades, estas podem ter idade variando entre 29 a 44 anos. Esta classe de DAP (20 a 30 cm) era composta em sua maioria por indivíduos determinados como *não reprodutivos*. Dos 290 indivíduos “adultos”, 60 estavam nesta classe de 20 a 30 cm e destes, 46 não foram sexados (76%) e dos 14 remanescentes, oito foram sexados como fêmeas (DAP entre 24,6 a 29 cm) e seis como machos (DAP entre 22 a 27,9 cm). Assim estes 60 indivíduos foram denominados de “sub-adultos” e utilizados em uma análise adicional de dispersão de sementes e pólen, em que apenas indivíduos com DAP > 50 cm (idade mínima estimada de 70 anos) foram considerados possíveis parentais maternos e paternos. Os indivíduos que não puderam ser sexados foram utilizados em ambas as análises de

maternidade e paternidade. O fluxo gênico crítico ( $FG_C$ ) ou, em outros termos, a probabilidade de encontrar um candidato compatível como pai ou mãe de um indivíduo dentro da população, quando o verdadeiro pai ou mãe encontra-se fora da população, foi calculado segundo método de Dow & Ashley (1998),  $FG_C = 1 - (1 - P_{nExc}^n)$ , em que  $P_{nExc}$  é o poder de não exclusão (probabilidade de não excluir o verdadeiro parental materno ou paterno de um indivíduo) determinado para o par de parentes (pai e mãe) e  $n$  é o número de candidatos a pai e mãe encontrados como putativos parentais paternos e maternos dos juvenis e sub-adultos nas respectivas análises de maternidade e paternidade. Como todas as árvores e juvenis da população tinham o seu genótipo determinado e sua posição espacial conhecida, em termos de coordenadas X e Y, as plantas que tiveram ambos, pai e mãe, determinados dentro da parcela foram utilizadas para determinar as distâncias mínima, máxima, média e mediana de dispersão de pólen, que correspondia a distância linear entre estes dois putativos parentes. A distância entre as mães e os juvenis foi utilizada para determinar a distância de dispersão de sementes. No caso de apenas a mãe ser determinada como ocorrendo dentro da parcela, a distância entre esta putativa mãe e o respectivo juvenil ou sub-adulto, foi utilizada para representar a distância de dispersão da semente. Quando apenas o pai foi determinado dentro da parcela, não foi possível calcular a distância de dispersão de pólen, pelo fato da árvore materna estar localizada fora da parcela. A análise de paternidade e maternidade permitiu ainda sexar alguns indivíduos quando eles apareceram apenas como prováveis parentais maternos ou paternos. Dos 123 candidatos a mãe, 14 estavam classificados como não-reprodutivos e destes, oito foram sexados geneticamente. Dos 141 candidatos a pai, 14 estavam classificados como não-reprodutivos e destes, 11 foram sexados geneticamente. Nos casos em que alguns indivíduos não reprodutivos apareceram como podendo ser simultaneamente machos e fêmeas, foi assumido a possibilidade destes serem monóicos. Nos casos em que dois indivíduos não reprodutivos foram encontrados como possíveis parentes de um indivíduo, o candidato localizado mais próximo ao juvenil ou sub-adulto foi considerado como o parental materno e o mais distante como o parental paterno. Embora esse procedimento possa introduzir alguns erros na estimativa da distância direta de dispersão de sementes e pólen, o mesmo tem sido o mais utilizado na literatura corrente quando não é possível distinguir com precisão o parental materno do paterno, como no caso de espécies monóicas (Dow & Ashley, 1998; Schueler *et al.*, 2006,

Nakanishi *et al.*, 2008; Sebbenn *et al.*, 2010). Contudo, como a dispersão primária de sementes em *A. angustifolia* ocorre por gravidade e a de pólen pelo vento, acredita-se que justamente pelo fato deste procedimento ter sido aplicado apenas em poucos casos, ele não tenha causado grandes vícios nas estimativas. A taxa de imigração de sementes ( $m$ ) foi calculada como a proporção de juvenis e sub-adultos que não tiveram um candidato a mãe determinado dentro das populações ( $n_{imigrante}$ ) em relação ao total de juvenis ou sub-adultos genotipados ( $n_{total}$ ) dentro da população,  $\hat{m} = \hat{n}_{imigrante} / n_{total}$  (Burczyk *et al.*, 1996; Burczyk *et al.*, 2004; Smouse & Sork, 2004). A taxa de imigração de pólen ( $m$ ) foi calculada como a proporção de juvenis e sub-adultos que não tiveram um candidato a pai determinado dentro da população ( $n_{imigrante}$ ) em relação ao total de juvenis ou sub-adultos genotipados ( $n_{total}$ ) dentro da população,  $\hat{m} = \hat{n}_{imigrante} / n_{total}$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Estrutura populacional

A distância espacial entre as árvores adultas amostradas variou entre 0,71 a 372,4 m e para juvenis variou de 0,20 a 363,9 m. Na Figura 3 estão representadas a distribuição espacial dos indivíduos adultos e a dos juvenis na parcela de 7,2 ha. O índice de dispersão para adultos foi não significativamente diferente da unidade ( $R_{CE} = 0,977$ ,  $P > 0,05$ ), indicando distribuição aleatória dentro da parcela (Figura 3). Já para os juvenis, este índice foi significativamente inferior a unidade ( $R_{CE} = 0,833$ ,  $P < 0,05$ ), o que indica uma distribuição agrupada (Figura 4) nesta fase ontogênica. A distância média observada do vizinho mais próximo para adultos foi de 7,66 m e para juvenis foi de 7,45 m. Este padrão pode estar ligado à dispersão de sementes restrita, fazendo com que os indivíduos novos se estabeleçam de forma agregada próximos a planta mãe. Porém esta proximidade com a planta mãe pode expor os indivíduos juvenis a altas taxas de mortalidade devido a predação (Janzen, 1970; Connell, 1971). Com a mortalidade dos indivíduos que se encontram agrupados, os níveis de agregação tendem a diminuir nas seguintes fases ontogênicas, o que explicaria a tendência a aleatoriedade do padrão espacial observado nos adultos. O modelo Janzen e Connell descreve que quando sementes e plântulas estão localizadas mais próximas aos adultos coespecíficos e apresentam altas densidades, tornam-se mais susceptíveis a predação e a ação dos patógenos. Como consequência dos efeitos dependentes da densidade, há uma redução na sobrevivência destes propágulos nas áreas próximas aos parentais, aumentando a chance de outras espécies de plantas colonizarem. Entretanto este modelo não foi testado neste trabalho tratando-se apenas de uma possível explicação para o padrão encontrado, logo, merece estudos adicionais e de longo prazo.

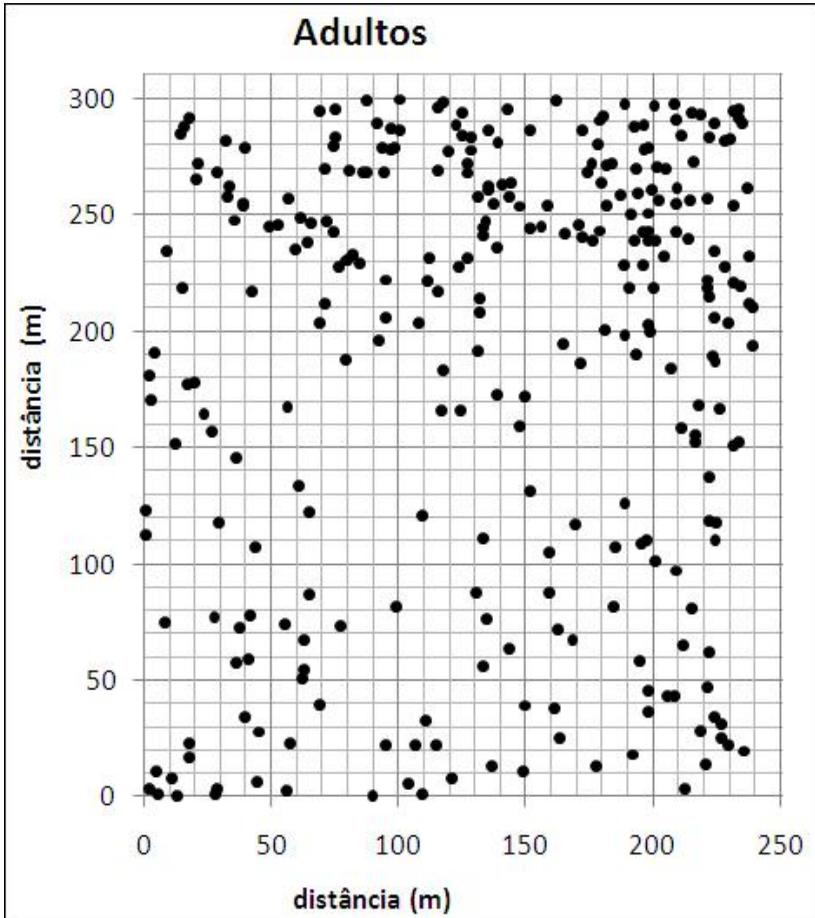


Figura 3. Distribuição espacial de todos os genótipos adultos de *Araucaria angustifolia* na parcela de estudo, RGF de Caçador/SC.

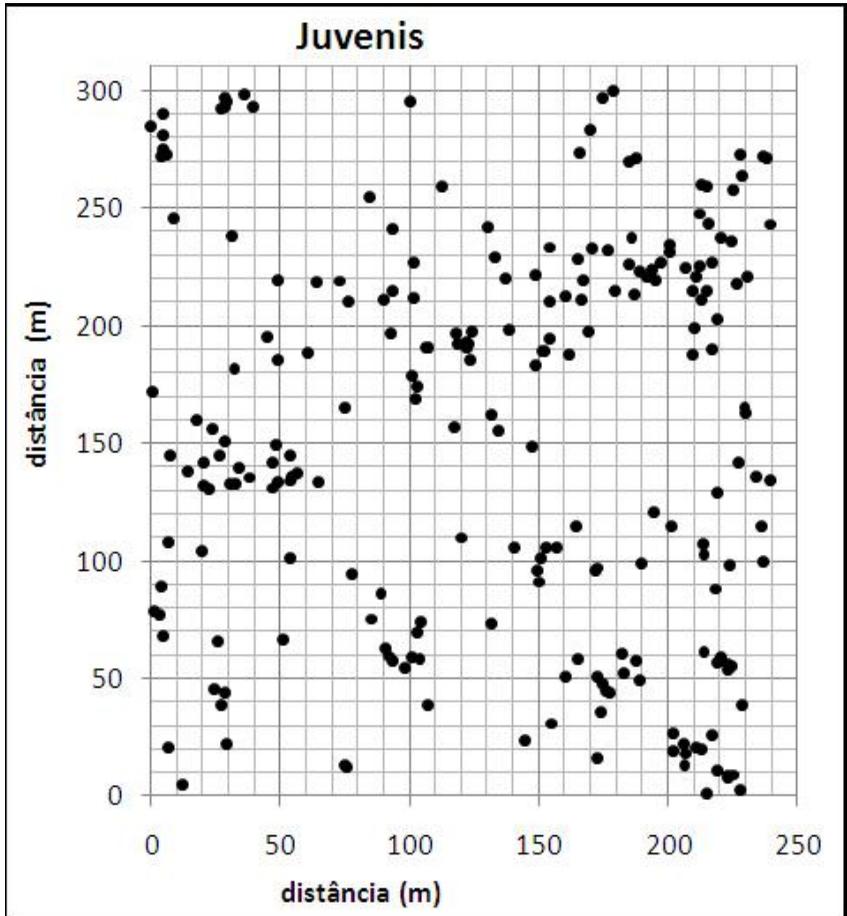


Figura 4. Distribuição espacial da amostra dos juvenis de *Araucaria angustifolia* na parcela de estudo, RGF de Caçador/SC.

A população de Araucária estudada apresentou alta densidade de indivíduos adultos (40,3 indivíduos/ha). A razão sexual das árvores de Araucária nesta área foi de 1:1 como descreve Paludo *et al.* (2009). Nos 7,2 ha da parcela foram encontrados 290 indivíduos adultos com DAP variando de 20 a 147,1 cm e uma média de 57,2 cm (Tabela 3). O DAP das fêmeas (variou de 24,6 a 147,1, com média de 72,2) foi maior do que o observado nos indivíduos machos (variou de 22,0 a 125,1, com média de 58,1), sugerindo que fêmeas tendem a crescer mais do que os machos.

O DAP médio encontrado para os indivíduos adultos (57,2 cm) e a presença de indivíduos com mais de 140 cm, reflete o grande porte a que podem chegar os indivíduos desta espécie. Mattos (1994) afirma que o diâmetro do tronco de Araucária geralmente está dentro de 60 a 120 cm. O elevado DAP médio encontrado, juntamente com a presença de indivíduos com DAP maior que 120 cm são indicativos do grau de conservação no qual se encontra esta floresta, já que a Araucária apresenta um crescimento lento (Reitz & Klein 1966, Sebbenn *et al.*, 2004).

**Tabela 3.** Características fenotípicas dos adultos e dos juvenis amostrados de *Araucaria angustifolia* na parcela. *n* é o número de indivíduos.

Classes	<i>n</i>	DAP (cm)			Altura (m)		
		Média	Mediana	Mín-max	Média	Mediana	Mín-max
Adultos	290	57,2	51,1	20,0-147,1	--	--	--
Fêmeas	100	72,2	67,0	24,6-147,1	--	--	--
Machos	115	58,1	53,5	22,0-125,1	--	--	--
Monóica	1	45,2	--	--	--	--	--
NR	74	35,7	28,7	20,0-94,5	--	--	--
Juvenis	223	2,6	2,5	0,1-6,4	1,7	1,0	0,2-6,4
Total	513						

NR= não reprodutivos

Considerando a distribuição em classes diamétricas (Figura 5) é possível perceber uma maior frequência de indivíduos nas primeiras classes de DAP, sendo que este número vai diminuindo conforme as classes diamétricas aumentam. Este padrão de distribuição diamétrica é similar a um J invertido, ou seja, existem muitos indivíduos nos menores valores da distribuição diamétrica e poucos indivíduos nas classes diamétricas superiores.

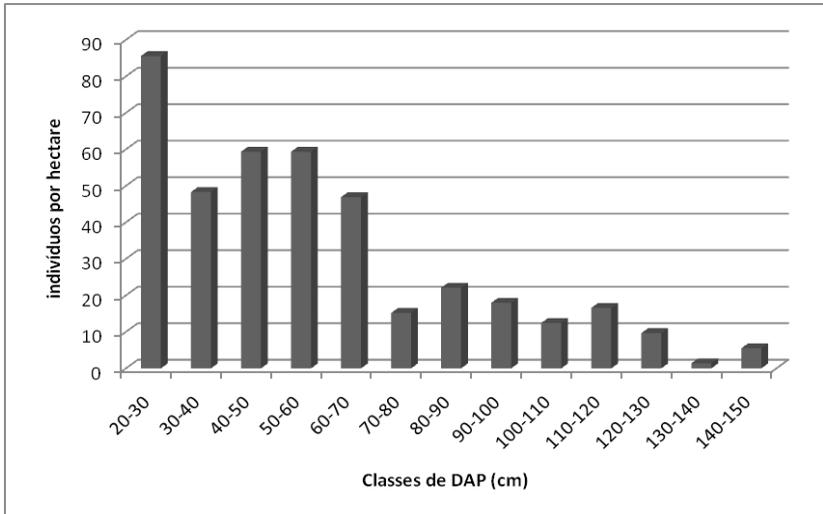


Figura 5. Distribuição de frequência em classes diamétricas de todos os indivíduos adultos de *Araucaria angustifolia* existentes na parcela da RGF de Caçador.

O DAP das 74 plantas que não estavam reprodutivas durante o período que foi realizada sexagem, variou de 20 a 94,5 cm, embora destas 74 plantas classificadas como não reprodutivas, 46 apresentavam DAP entre 20 a 30 cm. Por isso, 60 plantas dentro desta classe de 20 a 30 cm foram caracterizadas para as análises de parentesco como *sub-adultos*. Estimativas da idade das plantas foram realizadas no item material e métodos, com base no incremento médio anual estimado (IMA) obtido em um teste de procedências de *A. angustifolia* estabelecido em Itapeva, estado de São Paulo (Sebbenn *et al.*, 2004). Estima-se para juvenis, com DAP variando entre 0,1 a 6,4 cm (Tabela 3) e altura variando entre 0,2 a 6,4 cm, idades variando de menos de um ano a no máximo 10 anos (6,4 cm/0,68 cm). Para os sub-adultos, com DAP entre 20 a 30 cm estima-se idades variando entre 29 a 44 anos.

**Desequilíbrio de ligação, diversidade genética e endogamia**

O equilíbrio de ligação em locos marcadores é uma das pressuposições básicas para sua utilização em análise de diversidade e estrutura genética, sistema de reprodução e análise de paternidade. Dos 36 testes realizados entre os pares de locos avaliados nos adultos e juvenis, nenhum par apresentou desvios significativos, após a correção de Bonferroni ( $\alpha=0,05$ ), sugerindo equilíbrio genotípico (Tabela 4). Portanto, estes locos não estão ligados e podem ser usados em estudos da estrutura e diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico contemporâneo, visto que não vão gerar vícios nessas estimativas.

**Tabela 4.** Desequilíbrio de ligação entre os locos de árvores adultas e juvenis de *Araucaria angustifolia*. Valores referentes as probabilidades de desequilíbrio de ligação após 1000 permutações. O valor limite de significância após correção de Bonferroni é 0,000694.

Pares de locos	Adultos	Juvenis
Aang01XAg20	0,85139	0,37708
Aang01XAg56	0,68264	0,73403
Aang01XAg94	0,60486	0,85000
Aang01XCRCA1	0,59861	0,29375
Aang01XCRCA2	0,45556	0,41458
Aang01XAg45	0,70833	0,75903
Aang01XAg23	0,72986	0,64028
Aang01XAg62	0,48611	0,09097
Ag20XAg56	0,06806	0,95556
Ag20XAg94	0,27292	0,35417
Ag20XCRCA1	0,77361	0,02361
Ag20XCRCA2	0,65278	0,51458
Ag20XAg45	0,75000	0,72986
Ag20XAg23	0,49931	0,42083
Ag20XAg62	0,36667	0,45278
Ag56XAg94	0,84861	0,04097
Ag56XCRCA1	0,95208	0,70000
Ag56XCRCA2	0,30000	0,12292
Ag56XAg45	0,09028	0,22917
Ag56XAg23	0,43681	0,86111
Ag56XAg62	0,60208	0,89028
Ag94XCRCA1	0,97153	0,41528
Ag94XCRCA2	0,61042	0,09931
Ag94XAg45	0,15278	0,48750
Ag94XAg23	0,47431	0,95833
Ag94XAg62	0,03681	0,68750
CRCA1XCRCA2	0,95903	0,44514
CRCA1XAg45	0,42569	0,23194
CRCA1XAg23	0,02500	0,83681
CRCA1XAg62	0,25417	0,12778
CRCA2XAg45	0,04583	0,81389
CRCA2XAg23	0,32153	0,70903
CRCA2XAg62	0,45694	0,19583
Ag45XAg23	0,76389	0,34722
Ag45XAg62	0,87847	0,80417
Ag23XAg62	0,38611	0,17847

A partir da análise das frequências alélicas (Tabela 5) é possível notar que na maioria dos locos (Aang01, Ag23, Ag62, Ag94, CRCA1 e CRCA2) ocorreu a presença de alelos exclusivos aos adultos e em apenas um loco ocorreram alelos exclusivos aos juvenis (CRCA1). Todos os alelos exclusivos apresentaram baixa frequência. A presença de alelos exclusivos aos adultos indica que nem todos estes indivíduos participaram do processo reprodutivo e deixaram descendentes. Além do mais, eles podem ter participado da reprodução, porém seus filhos e, por conseguinte, seus alelos, não estão representados dentro da amostra de juvenis realizada neste trabalho.

Já os alelos exclusivos dos juvenis indicam a possibilidade de ter ocorrido imigração de sementes e ou pólen na parcela, embora como a frequência destes alelos é baixa, sugere uma consequente baixa taxa de imigração. A presença de alelos exclusivos dos juvenis mostra que o conjunto gênico desta população não está todo representado dentro da parcela denotando a importância em se conservar toda a extensão da reserva, bem como a importância em se conservar grandes áreas.

**Tabela 5.** Frequências alélicas de *A. angustifolia* na RGF de Caçador – SC.

<b>Aang01</b>	<b>Adultos</b>	<b>Juvenis</b>	<b>Ag20</b>	<b>Adultos</b>	<b>Juvenis</b>
202	0,015	0,018	256	0,004	0,019
204	0,004	0,006	258	0,111	0,110
206	0,013	0,003	260	0,496	0,532
208	0,002	0	262	0,243	0,198
210	0,047	0,061	264	0,086	0,104
212	0,006	0,009	266	0,042	0,019
214	0,082	0,070	268	0,015	0,016
216	0,075	0,045	270	0,004	0,003
218	0,277	0,306	exclusivos	0	0
220	0,084	0,079	<b>CRCA1</b>	<b>Adultos</b>	<b>Juvenis</b>
222	0,139	0,155	224	0	0,011
224	0,090	0,045	226	0	0,003
226	0,028	0,033	228	0,820	0,949
228	0,028	0,033	230	0,174	0,037
230	0,017	0,027	232	0,007	0
232	0,041	0,039	exclusivos	1	2
234	0,019	0,030	<b>Ag23</b>	<b>Adultos</b>	<b>Juvenis</b>
236	0,004	0,003	265	0,005	0,009
238	0,004	0,012	267	0,016	0,026
240	0,002	0,009	269	0,089	0,017
250	0,002	0	275	0,003	0
252	0,019	0,015	277	0,324	0,388
exclusivos	2	0	279	0,168	0,095
<b>Ag94</b>	<b>Adultos</b>	<b>Juvenis</b>	281	0,197	0,198
161	0,015	0,015	283	0,089	0,086
163	0,004	0,002	285	0,029	0,017
165	0,002	0	287	0,071	0,155
169	0,004	0,005	289	0,008	0,009
171	0,032	0,056	exclusivos	1	0
173	0,186	0,153	<b>Ag56</b>	<b>Adultos</b>	<b>Juvenis</b>
175	0,092	0,090	166	0,260	0,246
177	0,058	0,063	168	0,371	0,359
179	0,216	0,206	170	0,069	0,068
181	0,132	0,107	172	0,266	0,275
183	0,107	0,143	174	0,032	0,035
185	0,073	0,083	176	0,002	0,016
187	0,034	0,029	exclusivos	0	0
189	0,021	0,029	<b>CRCA2</b>	<b>Adultos</b>	<b>Juvenis</b>
191	0,024	0,019	200	0,002	0
exclusivos	1	0	204	0,002	0
<b>Ag62</b>	<b>Adultos</b>	<b>Juvenis</b>	206	0,009	0,012
128	0,004	0	208	0,487	0,478
130	0,173	0,180	210	0,050	0,063
132	0,735	0,721	212	0,193	0,180
134	0,088	0,099	214	0,093	0,115
exclusivos	1	0	216	0,071	0,063
<b>Ag45</b>	<b>Adultos</b>	<b>Juvenis</b>	218	0,061	0,051
173	0,051	0,057	220	0,009	0,027
185	0,249	0,260	222	0,004	0
187	0,700	0,683	224	0,019	0,010
exclusivos	0	0	exclusivos	3	0

Nos nove locos microssatélites, o padrão de distribuição das frequências alélicas foi semelhante nos adultos e nos juvenis como pode ser visto na Figura 6.

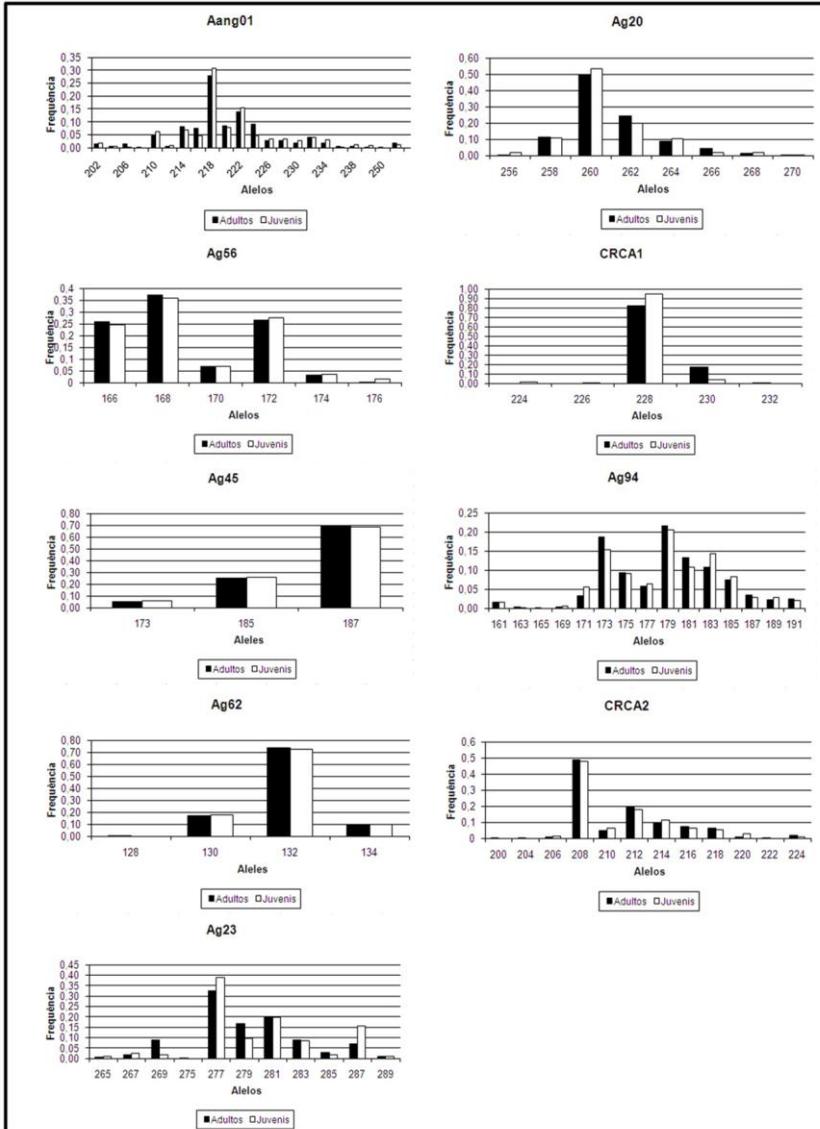


Figura 6. Distribuição das frequências alélicas nos nove locos microssatélites de indivíduos adultos e juvenis de *A. angustifolia* na RGF de Caçador - SC.

A presente população de *A. angustifolia* apresentou um alto nível de polimorfismo e diversidade genética para os nove locos microssatélites analisados. Da amostra total dos nove locos em 513 indivíduos foram observados 86 alelos (Tabela 6), indicando alto polimorfismo. O número de alelos por loco variou de três (Ag45) a 22 alelos (Aang01), com média de 9,56 alelos por loco. O número efetivo de alelos por locos foi menor do que o número médio de alelos por locos, variando de 1,28 a 8,06 alelos, com média de 3,96 alelos por loco, o que indica que embora este conjunto de locos possua muitos alelos, muitos destes apresentam baixa frequência.

Stefenon *et al.* (2007), utilizando cinco locos microssatélites coincidentes com este trabalho (Aang01, Ag20, Ag45, Ag94 e CRCA2), encontram um número de alelos para estes locos de 21, 18, 7, 13 e 14, respectivamente, num total de seis populações naturais de *A. angustifolia*. Especificamente para a população localizada em SC, o número de alelos foi de 13, 11, 3, 7 e 8 para os respectivos locos, valores estes diferentes dos encontrados pelo atual estudo (22, 8, 3, 15 e 12, respectivamente). Tal fato deve-se possivelmente ao tamanho amostral. O referido trabalho teve uma amostra de 63 indivíduos, na população de SC, enquanto que no atual trabalho a amostra foi de 513 indivíduos de *A. angustifolia*, de tal modo que os valores encontrados no presente trabalho mais se assemelham ao total das seis populações amostradas por estes autores (384 indivíduos). Porém, a discrepância encontrada nos locos Ag20 e Ag45, provavelmente deva-se ao fato da grande abrangência geográfica das seis populações amostradas por Stefenon *et al.* (2007) (SP, PR, SC e RS), refletindo possivelmente a divergência genética entre populações.

Schmidt (2005) detectou até 22 alelos para o loco Aang01 em duas populações (total 94 indivíduos) de *A. angustifolia* localizadas no planalto serrano de Santa Catarina. Patreze & Tsai (2010) detectaram apenas cinco alelos para o loco Aang01, em 105 indivíduos amostrados em Campos do Jordão. Contudo, outros dois locos utilizados no presente estudo (Ag23 e Ag56) também foram utilizados por Patreze & Tsai (2010). Estes autores detectaram 18 e 9 alelos por loco, respectivamente, ou seja, encontraram mais alelos do que no presente estudo.

Salgueiro *et al.* (2005) caracterizaram três populações da espécie (RJ, PR e RS) em uma amostragem total de 60 indivíduos com oito locos coincidentes com este trabalho (Ag20, Ag23, Ag45, Ag 56, Ag62, Ag94, CRCA1 e CRCA2). Os autores mencionados encontraram os seguintes números de alelos por locos: 8, 7, 3, 6, 11, 10, 4 e 8 respectivamente. Valores estes muito semelhantes aos encontrados pelo

atual estudo (8, 11, 3, 6, 4, 15, 5 e 12 respectivamente), onde somente um loco (Ag62) apresentou um número menor de alelos, todos os demais foram iguais ou apresentaram mais alelos, devido provavelmente a diferença no tamanho amostral entre os trabalhos.

Não obstante, o trabalho de Bittencourt & Sebbenn (2007) revelou uma expressiva diferença em relação ao número de alelos por loco. Este trabalho utilizou oito locos SSR, dos quais sete são coincidentes ao presente estudo (Ag20, Ag23, Ag45, Ag56, Ag62, CRCA1 e CRCA2). Conforme os autores, os locos apresentaram os seguintes números de alelos 12, 19, 9, 13, 20, 8, 16 respectivamente. Tal fato possivelmente ocorreu devido ao grande número de indivíduos genotipados (mais de 1370 indivíduos), incluindo sementes que, teoricamente, apresentaram a imigração de alelos (fluxo gênico efetivo).

A heterozigosidade observada variou de 0,225 (CRCA1) a 0,789 (Aang01), com média de 0,559. A heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi maior que a observada em quase todos os locos e na média dos locos, variando de 0,217 (CRCA1) a 0,876 (Ag94), com média de 0,639. Isso é um indicativo de excesso de homozigotos.

Trabalhos com a mesma espécie e utilizando isoenzimas como marcador demonstram, conforme o esperado, valores inferiores de diversidade genética. O valor encontrado no presente estudo ( $H_e=0,64$ ) é superior aos encontrados por Mantovani *et al.* (2006) em Campos do Jordão ( $H_e=0,170$ ) e ao valor médio encontrado por Auler *et al.* (2002) para populações analisadas em Santa Catarina e consideradas pouco degradadas ( $H_e=0,112$ ) e em específico para uma população localizada no município de Caçador-SC,  $H_e=0,108$ . Além destes, Ferreira (2008) também encontrou uma diversidade genética menor ( $H_e= 0,127$ ) para uma população natural de Araucária na Floresta Nacional de Tres Barras. Bem como Shimizu *et al.* (2000) encontraram  $H_e=0,248$  para uma população no Parque Nacional do Iguaçu.

Outros trabalhos com a mesma espécie, porém utilizando-se de marcadores microssatélites obtiveram valores de  $H_e$  semelhantes ao encontrado no presente estudo ( $H_e=0,64$ ). Bittencourt & Sebbenn (2008) encontraram  $H_e=0,59$  para uma população de 298 indivíduos de *A. angustifolia* em uma floresta contínua no Paraná, utilizando oito locos SSR. Stefenon *et al.* (2007) encontraram  $H_e=0,65$  para seis populações naturais de *A. angustifolia* (SP, PR, SC e RS) empregando cinco locos microssatélites. Patreze & Tsai (2010) obtiveram  $H_e=0,74$  para uma população em Campos do Jordão utilizando seis locos SSR, com base em um total de 105 indivíduos. Schmidt (2005) encontrou  $H_e=0,88$  em

média para duas populações (total 94 indivíduos) de *A. angustifolia* localizadas no planalto serrano de Santa Catarina, utilizando sete locos SSR.

No entanto, ao avaliar três populações de *A. angustifolia* (RJ, PR e RS) utilizando oito locos SSR, Salgueiro *et al.* (2005) encontraram uma diversidade genética um pouco mais baixa ( $H_e=0,34$ ) do que a dos referidos trabalhos, porém com uma amostragem total de 60 indivíduos para as três populações. Portanto, é importante considerar que é difícil comparar os níveis de diversidade genética entre populações com tamanhos amostrais diferentes, em especial para locos SSR, visto que estes tendem a apresentar maior número de alelos, quanto maior for o tamanho da amostra.

**Tabela 6.** Diversidade genética e endogamia na população de *Araucaria angustifolia*, na RGF de Caçador.  $n$  é o tamanho da amostra;  $K$  é o número total de alelos;  $A_e$  é o número efetivo de alelos nos locos;  $H_o$  é a heterozigiosidade observada;  $H_e$  é a heterozigiosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg;  $F$  é o índice de fixação.

Loco	$n$	Tamanho dos fragmentos (pb)	$K$	$A_e$	$H_o$	$H_e$	$F$
Aang01	398	202-252	22	7,52	0,789	0,867	0,090 *
Ag20	426	256-270	8	3,00	0,535	0,667	0,198 *
Ag56	465	166-176	6	3,62	0,742	0,724	-0,025
Ag94	440	161-191	15	8,06	0,701	0,876	0,200 *
CRCA1	418	224-232	5	1,28	0,225	0,217	-0,038
CRCA2	436	200-224	12	3,46	0,670	0,711	0,058
Ag45	420	173-187	3	1,83	0,397	0,453	0,123 *
Ag23	248	265-289	11	5,08	0,690	0,803	0,141 *
Ag62	327	128-134	4	1,76	0,284	0,433	0,343 *
Média	--	--	9,56	3,96	0,559	0,639	0,125 *
Total	513	--	86	--	--	--	--

\* $P < 0,05$ .

O índice de fixação foi positivo e significativamente diferente de zero em sete locos e para média dos locos, variando de -0,038 (CRCA1) a 0,343 (Ag62), com média de 0,125, indicando desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido a excesso de homozigotos, provavelmente endogamia (Tabela 6). *A. angustifolia* é uma espécie predominantemente de cruzamento, embora certa taxa de cruzamentos

entre parentes tenham sido detectados em populações naturais (Mantovani *et al.*, 2006, Bittencourt & Sebbenn, 2007, 2008, Ferreira *et al.* (submetido)).

A população estudada apresenta um índice de fixação que não adere ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg - princípio de acasalamentos aleatórios e ausência de atuação dos fatores evolutivos (Hartl & Clark, 2010). Aderir a este princípio é esperado para espécies dióicas com polinização anemófila. Índices de fixação altos e significativamente diferentes de zero sugerem que está ocorrendo cruzamentos entre aparentados visto que a *A. angustifolia* é uma espécie dióica (salvo exceções), não podendo, portanto, realizar autofecundação. Estes altos níveis de endogamia tendem, ao longo do tempo, a promover uma redução da riqueza alélica resultando na perda e fixação de determinados alelos, além de aumentar os efeitos de depressão por endogamia.

A maioria das populações é agrupada em subpopulações menores, como foi detectado neste trabalho. Esta subdivisão populacional resulta em cruzamento entre parentes, pois os indivíduos, na subpopulação, compartilham ancestrais remotos ou recentes (Hartl & Clark, 2010). O cruzamento entre parentes gera endogamia em uma taxa igual ao coeficiente de coancestria na geração parental. Assim, o nível médio de endogamia observada na presente população poderia ter sido originado do cruzamento entre meios-irmãos ( $\theta_{xy} = 0,125$ ).

A literatura mostra grande variação em relação aos índices de fixação encontrados para a espécie. Porém há de se ressaltar que as amostras, as regiões de ocorrência, o estado de conservação e, sobretudo o tipo de marcador utilizado em cada trabalho são distintos. Obtiveram índices altíssimos: Schmidt (2005),  $F=0,30$  (utilizando microssatélites) e Ferreira *et al.* (submetido)  $F=0,405$  (utilizando isoenzimas), ambos com populações naturais em SC.

Contudo os seguintes autores encontraram baixos índices de fixação não diferindo de zero. Bittencourt & Sebbenn (2008) para uma população contínua no Paraná,  $F=0,055$ . Auler *et al.* (2002) obtiveram  $F= 0,054$  médio para populações não degradadas em SC e  $F= -0,120$  em específico para uma população em Caçador. Shimizu *et al.* (2000) obtiveram um valor de  $F= 0,030$  no Parque Nacional do Iguaçu. Além destes, o índice de fixação encontrado por Patreze & Tsai (2010) para uma população em Campos do Jordão foi de  $F=-0,089$ . Mantovani *et al.* (2006) também não observaram efeito de endogamia nesta mesma população de Campos do Jordão ( $F=0,006$ ). Já Stefenon, Gailing &

Finkeldey (2007) encontraram endogamia significativa na média das seis populações estudadas ( $F=0,11$ ), porém a população localizada em Santa Catarina apresentou baixo índice de fixação de 0,076.

### **Diversidade genética e endogamia nas gerações**

A população em estudo apresentou um alto nível de polimorfismo e diversidade genética para os nove locos microssatélites analisados nas duas coortes estudadas (Tabela 7). Os adultos apresentaram um número maior de alelos (84) do que o observado nos juvenis (78), sendo nove alelos exclusivamente aos adultos e dois aos juvenis. Isso sugere a ocorrência de deriva genética durante o processo de reprodução ou que nem todos os indivíduos aptos a se reproduzir deixaram descendentes. Alternativamente, os alelos exclusivos aos juvenis podem ser imigrantes advindos de fora desta parcela via semente ou pólen.

Embora o número de alelos por loco ter sido maior nos adultos do que nos juvenis, a riqueza alélica estimada por rarefação não diferiu entre estes estádios ontogênicos. Em contraste, a heterozigosidade média observada foi significativamente maior nos adultos do que nos juvenis ( $\hat{H}_o=0,580$  e  $\hat{H}_o=0,558$  respectivamente). Igualmente, a heterozigosidade esperada foi significativamente maior nos adultos do que nos juvenis (Tabela 7). Uma possível explicação para este resultado pode ser a presença de cruzamentos entre parentes, gerando endogamia nos juvenis e com isso uma redução na heterosigozidade observada. Contudo, a coorte adulta representa o produto de cumulativos eventos reprodutivos e de várias gerações, portanto pode ser esperada uma maior diversidade genética do que nos juvenis (Kettle *et al.*, 2007). Uma explicação alternativa pode estar associada a amostragem, pois para adultos fez-se um senso, enquanto que os indivíduos juvenis são uma amostra da parcela.

O fato de ter sido encontrado este declínio de diversidade entre as coortes sugere que os futuros indivíduos adultos desta população podem não ser suficientes para manter a diversidade e contrapor os efeitos naturais de perda de variabilidade por deriva genética. Bem como, possibilita uma redução na adaptação da população, que refletirá na viabilidade da população em longo prazo.

**Tabela 7.** Diversidade genética e endogamia em nove locos SSR de árvores adultas e juvenis de *A. angustifolia*.  $K$  é o número total de alelos nos locos;  $R_{58}$  é a riqueza alélica estimada por rarefação para p número mínimo de 58 genótipos diplóides;  $H_o$  é a heterozigosidade observada;  $H_e$  é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg;  $F$  é o índice de fixação;  $P_{Par-Parente}$  é probabilidades de não excluir o par de parentes.

Loco	Adultos (N=290)						Juvenis (N=223)				
	$K$	$R_{58}$	$H_o$	$H_e$	$F$	$P_{Par-Parente}$	$K$	$R_{58}$	$H_o$	$H_e$	$F_1$
Aang01	22	17,00	0,820	0,873	0,061	0,088	21	17,66	0,743	0,864	0,141 *
Ag20	8	6,71	0,548	0,676	0,190 *	0,365	8	7,06	0,494	0,654	0,199 *
Ag56	6	5,39	0,762	0,721	-0,057	0,353	6	6,16	0,714	0,734	0,154 *
Ag94	15	12,86	0,692	0,872	0,206 *	0,101	14	12,51	0,709	0,880	0,130 *
CRCA1	3	2,58	0,327	0,299	-0,092	0,784	4	3,08	0,092	0,089	0,242 *
CRCA2	12	9,26	0,716	0,706	-0,014	0,292	9	8,42	0,608	0,717	0,024
Ag45	3	3,00	0,378	0,442	0,144 *	0,670	3	3,00	0,416	0,460	0,121 *
Ag23	11	9,36	0,683	0,809	0,156 *	0,188	10	10,00	0,690	0,781	0,097 *
Ag62	4	3,44	0,277	0,425	0,348 *	0,645	3	3,00	0,290	0,440	0,353 *
<b>Média</b>	<b>9,33</b>	<b>7,71</b>	<b>0,580</b>	<b>0,647</b>	<b>0,096 *</b>	--	<b>8,67</b>	<b>7,85</b>	<b>0,534</b>	<b>0,624</b>	<b>0,163 *</b>
<b>IC inf. (95%)</b>	<b>9,07</b>	<b>7,51</b>	<b>0,572</b>	<b>0,638</b>	<b>0,048</b>	--	<b>8,42</b>	<b>7,65</b>	<b>0,525</b>	<b>0,614</b>	<b>0,138</b>
<b>IC sup. (95%)</b>	<b>9,60</b>	<b>7,92</b>	<b>0,589</b>	<b>0,656</b>	<b>0,143</b>	--	<b>8,91</b>	<b>8,06</b>	<b>0,544</b>	<b>0,635</b>	<b>0,197</b>
Total	84	--	--	--	-	0,0000217	78	--	--	--	--
Total geral	86	--	--	--	--		--	--	--	--	--

\*  $P < 0,05$ . IC: Intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade calculada por reamostragem *jackknife*. As médias dos parâmetros  $K$ ,  $H_o$  e  $H_e$  são significativamente diferentes entre adultos e juvenis, de acordo com o intervalo de confiança a 95% de probabilidade. 1: Índice de fixação intra-indivíduo, calculado usando as frequências alélicas dos adultos como referência pelo programa Spagedi. Baseado na mínima amostra de 58 indivíduos diplóides. O intervalo de confiança do índice de fixação nos adultos e nos juvenis foi calculado por 10.000 permutações, utilizando o programa Spagedi.

O índice de fixação foi positivo e significativamente diferente de zero em ambos adultos e juvenis, sugerindo endogamia (Tabela 7). Altos níveis de endogamia não são esperados em espécies dióicas ou predominantemente de cruzamento, devido ao fato de que a depressão endogâmica tende a eliminar plantas endogâmicas entre a fase de fertilização e a fase adulta (Gribel & Gibbs 2002; Hufford & Hamrick 2003; Naito *et al.* 2008). Entretanto o conceito de população é arbitrário e o fato de chamar os indivíduos de Araucária desta parcela de “população” pode ter consequências na estimativa do índice de fixação, já que, estará ocorrendo uma junção de várias subpopulações, devido a presença de estrutura genética espacial, é o chamado efeito Wahlund. Este efeito traz como consequência uma redução na heterozigosidade observada, resultando em altos valores de fixação de alelos. Portanto, este elevado índice de fixação encontrado pode não ser completamente devido ao sistema reprodutivo ou a cruzamento entre parentes e sim, parte dele, artefato devido ao efeito Wahlund. Índícios de atuação deste efeito neste trabalho podem ser denotados ao observar os índices de fixação em cada loco (Tabela 7). Nos juvenis o índice de fixação indica endogamia, visto que todos os locos apresentam valores positivos, altos e significativos. Ao passo que, o mesmo não é observado nos adultos, onde há grande variação entre os locos, ou seja, alguns locos apresentam valores positivos sugerindo endogamia e outros valores negativos sugerindo seleção a favor de heterozigotos. O cruzamento entre parentes, a única provável fonte de endogamia em espécies dióicas como Araucária é esperado afetar todos os locos de forma semelhante, ou seja, aumentando a homozigose para alelos idênticos por descendência. Em suma, estes resultados sugerem que o valor médio positivo observado nos adultos, parte tem como fonte o efeito Wahlund e o positivo nos juvenis tem como fonte apenas o cruzamento entre parentes e trata-se de endogamia. O índice de fixação intra-populacional pode ser corrigido pela eliminação do efeito Wahlund, utilizando uma relação entre estatísticas  $F$ :  $\hat{F} = 1 - \frac{1 - \hat{F}_p}{1 - \hat{\theta}_{xy}}$  (Bittencourt & Sebbenn, 2007), em que,  $F_p$  é o índice de fixação estimado nos adultos e  $\theta_{xy}$  é o coeficiente de coancestria médio da primeira classe de distância, estimado da análise de estrutura genética espacial. Substituindo estes valores na expressão  $(\hat{F} = 1 - \frac{1 - 0,093}{1 - 0,0119}) = 0,082$ , conclui-se que os indivíduos adultos possuem endogamia, porém menor do que havia sido

encontrado antes de se descontar o efeito Wahlund ( $F=0,096$ ). Esta endogamia é fruto de cruzamento entre parentes e como a endogamia em uma geração é igual ao coeficiente de coancestria entre os parentais cruzados, ela poderia ser explicada pelo cruzamento entre indivíduos primos de primeiro grau e meios-irmãos. Portanto, os valores de  $F$  foram significativamente maiores nos juvenis do que nos adultos.

Estes resultados confirmam a hipótese inicial deste trabalho. A hipótese era de que os juvenis possuísem índice de diversidade genética ( $H_e$ ) menor e de fixação ( $F$ ) maior do que os da geração parental. Conforme a questão histórica de que os adultos foram formados em uma condição onde quase não havia fragmentação nem superexploração e os juvenis foram formados após estes distúrbios. Este resultado esperado também foi encontrado para outras espécies de planta. Silva *et al.* (2010) avaliaram 127 indivíduos adultos e 450 sementes de *Theobroma cacao* na Amazônia, utilizando oito locos SSR, encontraram índice de diversidade genética significativamente maior nos adultos do que nas sementes e indicativo de endogamia apenas nas sementes. Kettle *et al.* (2007) caracterizaram na Nova Caledônia duas coortes (adultos e juvenis) de *Araucaria nemorosa*, utilizando sete locos SSR, em seis populações. Segundo os autores, a coorte juvenil apresentou maiores níveis de endogamia e menores níveis de diversidade genética em relação aos adultos. Outros trabalhos encontraram diferença apenas no índice de fixação. Bittencourt & Sebbenn (2009) comparam adultos e progênie de *A. angustifolia* em populações naturais no estado do Paraná, utilizando oito locos SSR. Os autores não encontraram diferença significativa para o índice de diversidade genética entre as coortes, porém encontraram índice de fixação significativo apenas em progênies. Gaino *et al.* (2010), utilizando cinco locos microssatélites, com uma amostra de 467 adultos, 149 juvenis e 514 sementes, também não encontraram significativa diferença no índice de diversidade genética entre estádios ontogênicos de *Myracrodruon urundeuva*. Contudo detectaram diferença no índice de fixação, sendo este mais baixo nos adultos do que nos juvenis e nas sementes. E, finalmente, para *Euterpe edulis* (em quatro populações em SC), Conte *et al.* (2008) encontraram, utilizando 10 locos SSR, índice de fixação significativamente diferente de zero apenas para o estágio plântulas. Para jovens e adultos o índice de fixação não foi significativamente diferente de zero.

Todavia, alguns trabalhos da literatura que compararam os índices de diversidade e de fixação entre estádios ontogênicos não encontraram diferença significativa. Nakanishi *et al.* (2008) genotiparam 111 indivíduos adultos e 247 juvenis de *Quercus salicina* no Japão

utilizando 10 locos SSR. Neste trabalho não foi encontrado indicativo de endogamia em nenhuma das coortes estudadas e o  $H_e$  foi similar em ambos os estádios ontogênicos. Hardesty *et al.* (2005) caracterizaram geneticamente três coortes (adultos, juvenis e plântulas) de *Simarouba amara* em Barro Colorado, Panamá, em um total de 300 indivíduos, utilizando cinco locos microssatélites, não foi encontrada diferença significativa no índice de fixação tampouco no índice de diversidade genética entre as coortes. Ferreira *et al.* (submetido) também avaliaram a diversidade genética em diferentes coortes para *A. angustifolia*, em Três Barras – SC. Utilizando isoenzimas como marcador genético. Os autores não encontraram diferenças nos índices de diversidade genética e índice de fixação entre adultos, juvenis e progênies. Conte *et al.* (2003) também não encontraram diferença nos índices de diversidade e fixação entre cinco estádios ontogênicos caracterizados (com isoenzimas) para *Euterpe edulis* em Santa Catarina. Algumas hipóteses são levantadas a respeito disto, como por exemplo, para efeitos genéticos apenas uma geração é muito pouco para que sejam denotados tais efeitos de perda de diversidade e aumento da endogamia. Isto pode ser explicado pela deriva genética. Quanto mais gerações se passam, devido ao processo natural de amostragem do conjunto gênico durante a reprodução, maior será a perda de diversidade genética. Fato este que se torna ainda mais relevante no que se refere a Araucária, espécie longeva e que além de ter poucas gerações após os processos de fragmentação e superexploração, segundo Klein & Reitz (1966), tem uma história natural de colonização peculiar, conquistando novas áreas e depois sendo gradativamente substituída por outras espécies climáticas. Tal processo é sintetizado pelos autores como Invasão, Maturação e Substituição. O que sugere ocorrer naturalmente um efeito fundador nas populações da espécie. As consequências da colonização de habitats vazios (pela dispersão de sementes e imigração de pólen) ou para populações já estabelecidas são diferentes. No primeiro caso pode ocorrer uma alteração da estrutura genética espacial da espécie, com a formação de colônias, conduzindo muitas vezes a um aumento da heterogeneidade e das diferenças nas frequências alélicas entre populações. No segundo caso, é o nível de variação dentro da população tende a aumentar e a diferença genética entre as populações tendem a diminuir (Martins, 1987). Portanto, ao detectar os efeitos genéticos da degradação ambiental no presente trabalho e conforme estas considerações, a tendência, com o passar do tempo é que as próximas gerações apresentem estes efeitos ainda mais acentuados.

Outra questão a ser discutida é o tamanho da população antes e após o distúrbio. Quanto maior a redução, mais provável que os efeitos de perda de diversidade genética por deriva genética e aumento da endogamia (devido a maior chance de cruzamento entre aparentados) sejam deflagrados, é o chamado efeito gargalo da garrafa (Ricklefs, 2003; Hartl & Clark, 2010). Além do tamanho da população, o grau de isolamento é outro fator, já que havendo fluxo gênico, uma pequena população pode funcionar como um componente de uma metapopulação com as demais em volta (Thrall *et al.*, 2000), não refletindo de imediato os efeitos da fragmentação e da superexploração. Contudo, ao contrário disto, em uma população isolada ao sofrer os distúrbios, é esperado que apresente os efeitos de deriva e endogamia mais acentuados.

Ademais as populações têm relações dinâmicas evolutivas com seus ambientes, particularmente com os componentes biológicos (competidores, predadores e patógenos) que estão também evoluindo em resposta a outros organismos. Portanto, as interações entre as diferentes espécies podem exercer efeitos tanto na demografia quanto na genética de populações, influenciando a evolução e a dinâmica populacional das espécies (Ricklefs, 2003).

Finalmente, há de se considerar que além do código genético, há um longo percurso em nível de ambiente e até mesmo relacionado a questões do desenvolvimento embriológico e epigenéticos que definem as características dos indivíduos. Além do que, pouco se sabe sobre as questões de adaptação, sobrevivência, estabelecimento, seleção entre outros (Wolpert, 2000). Devido a isto, há de se ressaltar a importância de que apenas os dados genéticos e principalmente de apenas uma geração são insuficientes para atestar que a espécie encontra-se em bom estado de conservação e garantir persistência da população em longo prazo.

### **Estrutura genética espacial intrapopulacional**

A estrutura genética espacial foi significativa até a distância aproximada de 20 m nos adultos e nos juvenis (Figura 7), sugerindo que árvores que ocorrem distantes entre si até esta distância possam ser parentes. O coeficiente de coancestria estimado na primeira classe para os adultos foi de 0,0119 e para os juvenis de 0,0477. Esta estrutura genética espacial pode ser causada pela dispersão de sementes próximas a árvore materna ou devido a curta dispersão de pólen.

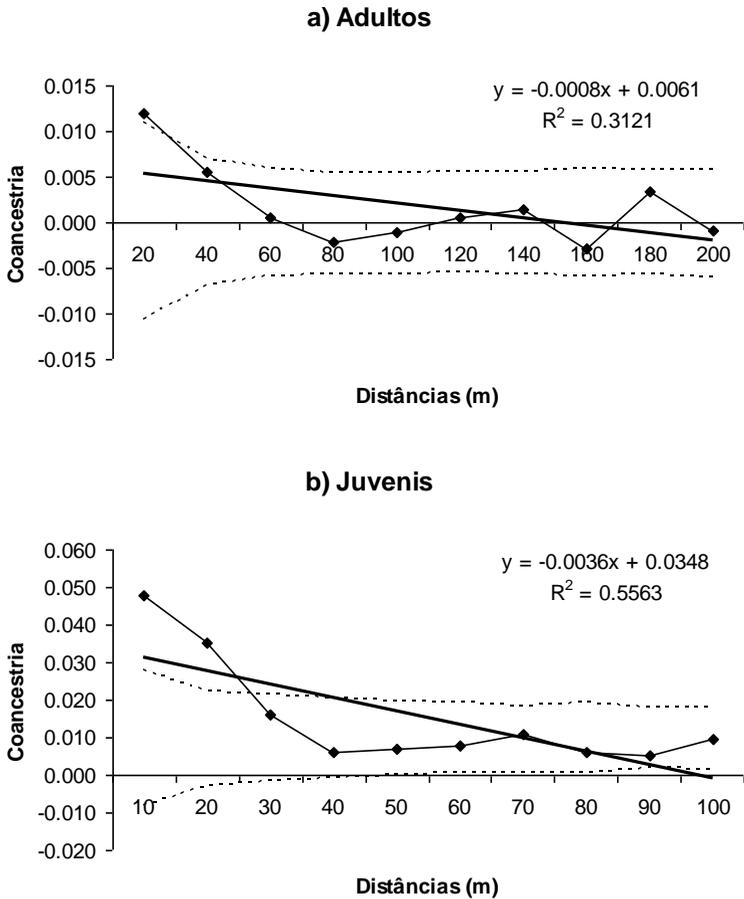


Figura 7. Estrutura genética espacial nos indivíduos adultos e nos juvenis de *Araucaria angustifolia* na RGF de Caçador. A linha contínua refere-se a estimativa do coeficiente de coancestry médio e as linhas pontilhadas referem-se a estimativa do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade da hipótese de ausência de estrutura genética espacial ( $H_0: \theta_{xy} = 0$ ).

A análise da estrutura genética espacial evidencia a presença de uma estruturação dos genótipos dentro da população não tão expressiva (o que é esperado para espécies dióicas), no entanto, diferente de uma completa distribuição panmítica. Estruturação também foi encontrada em outros trabalhos com esta espécie, Mantovani *et al.* (2006) encontraram estrutura genética até 70 m para uma população natural em Campos do Jordão com isoenzimas. Patreze & Tsai (2010), para a mesma área em Campos do Jordão encontraram estrutura genética até 25 m com marcadores microssatélites. Bittencourt & Sebbenn (2008) estudando uma população de *A. angustifolia* também com microssatélites encontraram uma distância com autocorrelação significativa em torno de 75 metros para a espécie no Paraná.

Autocorrelações positivas e significativas encontradas neste estudo, nas primeiras classes de distância, indicam que as plantas, dentro destes limites (até 20 m), compartilham alelos comuns com frequência maior que ao acaso, mostrando uma tendência de que os indivíduos mais próximos sejam aparentados. Segundo Sebbenn (2006), as populações de espécies arbóreas são muitas vezes estruturadas em família, formando subpopulações. A medida que aumenta a distância entre os indivíduos, os valores de autocorrelação não foram significativos, ou seja os genótipos estão distribuídos aleatoriamente no espaço.

Esta similaridade genética entre os indivíduos mais próximos pode ser um resultado da polinização anemofílica, onde indivíduos mais próximos tendem a receber um maior volume de pólen. Além disso, a dispersão primária de sementes da Araucária ocorre por barocoria, favorecendo o estabelecimento de plântulas ao redor da planta-mãe. Fato este corroborado por Moraes *et al.* (2004) quando afirmam que uma das possíveis causas da existência de estruturação a curtas distâncias é a dispersão de diásporos por gravidade sob a planta-mãe gerando um recrutamento de indivíduos aparentados a curta distância.

A possibilidade de cruzamentos entre indivíduos aparentados também pode contribuir para a existência desta maior semelhança entre os indivíduos mais próximos e formação de estrutura familiar nesta população. Bem como, a sobreposição de gerações também pode estar contribuindo para tal fato, já que *A. angustifolia* é uma espécie longeva, há possibilidade de indivíduos que se estabeleceram perto da planta-mãe cruzarem com sua genitora ou outros parentes próximos.

### Dispersão gênica histórica

O coeficiente médio de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) para todos os pares de adultos dentro da primeira classe de distância (0-20 m) foi baixo ( $\theta_{xy}=0,00119$ ) e menor do que o observado nos juvenis para a classe de distância entre 0 e 10 m ( $\theta_{xy}=0,0477$ ) (Tabela 8). A inclinação da linha de regressão  $b_k$  dos pares de coancestria sobre o logaritmo da distância espacial (0-100 m) foi significativamente negativa para ambos adultos e juvenis (Tabela 8), confirmando a presença de isolamento por distância. A intensidade da estrutura genética espacial, medida pela estatística  $S_p$  foi menor nos adultos ( $S_p=0,00263$ ) do que nos juvenis ( $S_p=0,01397$ ).

A estimativa da distância de dispersão gênica histórica, baseada no restrito  $b_k$  (0-100 m) produziu um tamanho de vizinhança nos adultos de 371 indivíduos (variando de 131 indivíduos a infinito) em uma distância média de dispersão de 140 m ( $\sigma_g$ ), assumindo  $D_e = D/2$  e 312 m assumindo  $D_e = D/10$ . Nos juvenis, o tamanho da vizinhança foi estimado em 73 indivíduos (variando de 49 a 136) para uma distância média de dispersão de 61 m ( $\sigma_g$ ), assumindo  $D_e = D/2$  e 137 m assumindo  $D_e = D/10$ .

**Tabela 8.** Estimativas de parâmetros da estrutura genética espacial para adultos e juvenis de *Araucaria angustifolia*.

Amostra	$\theta_1$	$b_k$ (0-160)	$S_p$ (SE)	$Nb$ (SE)	$\sigma_g$ SE (m) ( $D_e = D/2$ )	$\sigma_g$ SE (m) ( $D_e = D/10$ )
Adultos	0,00119*	-0,0026*	0,00263 (0,00249)	381 (131- $\infty$ )	140 (82- $\infty$ )	312 (190- $\infty$ )
Juvenis	0,0477*	-0,0133**	0,01397 (0,00330)	73 (49-136)	61 (50-84)	137 (112-187)

$\theta_1$ , é o coeficiente de coancestria na primeira classe de distância;  $b_k$ , é a inclinação da linha de regressão do valor do coeficiente de coancestria sobre o logaritmo da distância especial entre indivíduos na distância entre 0 a 100 m;  $S_p$ , é a estatística que mede a extensão da estrutura genética espacial na primeira classe de distância (0 a 20 m nos adultos e 0 a 10 m nos juvenis);  $Nb$  é o tamanho da vizinhança;  $\sigma_g$  é a distância histórica de dispersão gênica para duas estimativas de densidade efetiva ( $D_e = D/2$  e  $D_e = D/10$ ); \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

### **Poder de exclusão**

A probabilidade de exclusão em um teste de parentesco indica o poder de um loco ou um conjunto de locos de excluir um indivíduo erroneamente determinado como parental. A probabilidade de exclusão de parentesco tende a aumentar com o aumento do número de locos analisados. O poder de não exclusão deste trabalho foi de 0,00002 (para o par de pais), ou seja, o conjunto dos nove locos analisados apresentou um poder de exclusão de 0,99998. Este resultado encontrado mostra que os locos microssatélites utilizados neste estudo permitem estimativas estatisticamente precisas de vínculo genético entre os indivíduos, com alto poder informativo para discriminação individual o que possibilita análises confiáveis de parentesco (Weir, 1996; Pena, 2009). Demais estudos com *A. angustifolia* obtiveram poder de exclusão para o segundo parente (quando se conhece o genótipo de um parental) de 0,9999 na combinação de nove locos microssatélites (Schmidt, 2005). Patreze & Tsai (2010) obtiveram um poder de exclusão de 0,975 em seis locos microssatélites e Bittencourt & Sebbenn (2008) obtiveram 0,988 em oito locos SSR. Trabalhos com outras espécies de plantas apresentaram poder de exclusão para o par de parentes de 0,993 para a espécie *Myracrodruon urundeuva* utilizando cinco locos SSR (Gaino *et al.*, 2010) e 0,995 utilizando 10 locos SSR para a espécie *Quercus salicina* (Nakanishi *et al.*, 2008). Comparando os resultados destes trabalhos com o poder de exclusão do presente estudo, verifica-se que aqui o poder é superior e pode-se esperar maior precisão nas análises de parentesco.

Como o teórico poder de não exclusão foi baixo, a estimativa de fluxo gênico crítico foi igualmente baixa, 0,0057, ou seja, a probabilidade de ter erroneamente determinado um parental materno ou paterno dentro da parcela, quando na verdade o verdadeiro parental estava fora, foi menor do que 1%. Este resultado confirma que a bateria de nove locos utilizados no presente estudo é adequada para análise de parentesco, visto que cada adulto apresenta um genótipo multiloco único.

### **Dispersão realizada de sementes e pólen**

Dois dos 223 juvenis amostrados foram excluídos da análise porque foram genotipados para menos de três locos. Dos 221 juvenis amostrados, foi encontrado o parental materno de quase todos (95%), indicando uma baixa taxa de imigração de sementes na parcela em

estudo ( $m_{sementes} = 5\%$ ; Tabela 9). No caso dos sub-adultos, o parental materno foi encontrado para 52 (91%) dos 57 indivíduos amostrados, indicando uma taxa de imigração de sementes de 9%. Já o parental paterno foi encontrado para 208 dos 221 juvenis, o que indica uma taxa de imigração de pólen ( $m_{pólen}$ ) de 5,9% (Tabela 9). Para sub-adultos o parental paterno foi encontrado para 49 dos 57 indivíduos, o que indica uma taxa de imigração de pólen de 14% (Tabela 9). Estas taxas de imigração tanto de pólen quanto de sementes podem ter três origens: i) podem ser atribuídas a pólen e sementes advindo de árvores localizadas fora da parcela; ii) podem ter origem em árvores atualmente mortas e, que portanto, não foram genotipadas neste estudo, mas que quando vivas, foram os parentais maternos ou paternos dos respectivos juvenis e sub-adultos; iii) Pode ainda, ser advindo de árvores que foram cortadas no passado, visto que a área tem um histórico de corte seletivo.

Bittencourt & Sebbenn (2007) caracterizaram uma população e um pequeno grupo de árvores de Araucária isoladas na paisagem, no estado do Paraná. Foram caracterizados indivíduos adultos, jovens, plântulas e sementes. Com a análise de parentesco, os autores conseguiram encontrar todas as mães dentro do fragmento florestal de 5,4 ha, sugerindo a ausência de imigração de sementes. Porém encontraram taxa de imigração de pólen de 10% advinda do grupo isolado e, além disto, 6% das sementes estudadas foram polinizadas por pólen advindo de fora destas duas áreas estudadas. Estes resultados, juntamente com o do presente estudo, sugerem que na espécie a dispersão de sementes é mais limitada do que a de pólen.

Os 210 juvenis que tiveram a mãe determinada dentro da parcela foram gerados aparentemente por 98 (80%) das 123 árvores femininas da população. Trinta e quatro destas 98 árvores femininas foram responsáveis pela produção de 58% dos juvenis. Já os 52 sub-adultos foram gerados por 34 (42%) das 80 árvores femininas com DAP > 50 cm. Apenas quatorze, destas 34 árvores femininas, foram responsáveis pela produção de 71% dos sub-adultos. Estes resultados evidenciam a variação individual na fertilidade feminina. Além disso, os 208 juvenis que o parental paterno foi determinado dentro da parcela, foram gerados por 107 (76%) das 141 árvores masculinas da população. Trinta destas 107 árvores masculinas foram responsáveis pela produção de 50% dos juvenis. Já os 49 sub-adultos foram gerados por 39 (51%) das 76 árvores masculinas com DAP > 50 cm, sendo que apenas doze destas 39 árvores masculinas foram responsáveis pela produção de 77% dos sub-adultos. Isso sugere que também existe variação individual na

fertilidade masculina, bem como, sugere que ocorreu deriva genética durante o processo de reprodução, visto que nem todas as plantas em fase reprodutiva efetivamente deixaram descendentes. Mantovani *et al.* (2006a) estudaram a fenologia reprodutiva de uma população de Araucária em Campos do Jordão, São Paulo, durante dois anos e observaram que árvores masculinas e femininas florescem aparentemente em sincronismo, mas a fenologia de árvores masculinas mostrou variações individuais no tempo e na intensidade, e algumas árvores produziram mais estróbilos que outras, indicando que algumas produzem mais pólen que outras.

Em uma população idealizada, cada indivíduo reprodutivo tem igual chance de deixar descendentes para a próxima geração, fenômeno este conhecido como panmixia. Contudo, o pressuposto de que cada indivíduo tenha a mesma distribuição para o tamanho da prole é normalmente pouco realista, porque, em organismos reais, os indivíduos reprodutivos podem apresentar uma grande diferença no tamanho de sua prole, devido a fatores genéticos e aleatórios, como predação, mortalidade, etc. Uma variância grande no número de descendentes reduz o tamanho populacional efetivo, acelerando assim o processo de deriva genética (Hartl & Clark, 2010). Este fato, mesmo sendo um mecanismo natural, pode representar um agravante na situação de risco de extinção da espécie.

Para verificar se a fertilidade das árvores maternas e paternas ou capacidade de gerar mais descendentes estava associada ao seu DAP, aplicou-se uma análise de correlação. Esta correlação entre o DAP das árvores maternas e o seu respectivo número de filhos não foi significativa para juvenis ( $R^2=0,0012$ ,  $P>0,05$ ) e tampouco para sub-adultos ( $R^2=0,0295$ ,  $P>0,05$ ), sugerindo que o número de filhos gerados por uma árvore materna não está associado ao tamanho do seu DAP. Igualmente, esta correlação entre o DAP das árvores paternas e o seu respectivo número de filhos para ambos juvenis ( $R^2=0,001$ ,  $P>0,05$ ) e sub-adultos ( $R^2=0,0014$ ,  $P>0,05$ ) também não foi significativa, sugerindo que o número de filhos gerados por uma árvore masculina não está associado ao tamanho do DAP. Esta ausência de associação entre os maiores DAPs, supostamente árvores mais velhas, tanto femininas quanto masculinas, com o maior número de descendentes deixados, pode ser explicada pelo fato de que a maioria dos organismos de vida longa experimenta um aumento gradual na mortalidade e um declínio da fecundidade como resultado da deterioração das funções metabólicas, fenômeno conhecido como senescência (Ricklefs, 2003).

### **Distância de dispersão de pólen e sementes**

A distância realizada de dispersão de pólen foi medida nos juvenis (Tabela 9 e Figura 8) através da distância entre as árvores determinadas como maternas e as determinadas como paternas. Esta distância variou entre 5 e 343 m, com média de 134 m, e 50% do pólen sendo disperso até 124 m (mediana), 77% até 200 m e 93% até 250 m.

Para os sub-adultos, a distância realizada de dispersão de pólen (Figura 8a, Tabela 9) variou entre 27 e 291 m, com média de 136 m, e 50% do pólen sendo disperso até 130 m e 84% até 200 m e 96% até 250 m. Existe uma significativa e negativa correlação entre o número de juvenis ( $r = -0,64$ ,  $P < 0,05$ ) e sub-adultos ( $r = -0,49$ ,  $P < 0,05$ ) e a distância entre os seus respectivos parentais maternos e paternos (Figura 8), o que sugere que os cruzamentos tendem a ocorrer mais frequentemente entre árvores próximas do que árvores localizadas espacialmente distantes.

**Tabela 9.** Dispersão de pólen e sementes medida nos juvenis e sub-adultos de *Araucaria angustifolia* na Reserva Genética Florestal de Caçador - SC.

Amostra	N	Dispersão		Distância de dispersão (m)		
		Dentro	Fora	Média	Mediana	Min/Máx
Pólen-juvenis	221	94,1% (208)	5,9% (13)	134 ± 76	124	5/343
Pólen-sub-adultos	57	86% (49)	14% (8)	136 ± 66	131	27/291
Sementes-Juvenis	221	95% (210)	5% (11)	131 ± 83	133	6/318
Sementes-Sub-adultos	57	91,2% (52)	8,8% (5)	135 ± 86	117	9/334

Min/Max: Mínima e máxima distância de dispersão.

N é o tamanho da amostra, (média ± desvio padrão).

Os trabalhos na literatura com espécies polinizadas pelo vento trazem evidências diretas de altos níveis de polinização a grandes distâncias e grandes taxas de imigração. Dow & Ashley (1998) estudaram uma população de *Quercus macrocarpa*, nos Estados Unidos, utilizando quatro locos SSR. A taxa de imigração de pólen foi estimada em 57% e a distância mínima de dispersão de pólen foi de 100 m. Ao avaliar três populações de *Fraxinus excelsior*, com cinco locos SSR, Bacles *et al.* (2008) encontraram uma taxa de imigração de 43 a 68% de pólen. A área de estudo foi de aproximadamente 300 ha e a maior parte (85%) das distâncias de dispersão de pólen encontradas ocorreu até 100 m, porém foi detectado até 2009 m de fluxo de pólen. Contudo, vale ressaltar que estes trabalhos tratam de fluxo gênico efetivo, analisando apenas as sementes. Gaino *et al.* (2010), utilizando cinco locos microssatélites, estudou o fluxo gênico realizado em *Myracrodruon urundeuva*, num fragmento de 436 ha em São Paulo. Esta espécie também é dióica e pode ser polinizada além do vento, por abelhas. Os autores encontraram distâncias de dispersão de pólen de 2,9 até 863 m e a taxa de imigração foi de 2,7%.

Para Araucária, Bittencourt & Sebbenn (2007) estudaram duas populações no Paraná, distantes a 1,7 Km. Os autores caracterizaram indivíduos adultos, jovens, plântulas e sementes. Foi encontrada distância de polinização de até 2006 m. A longa distância de dispersão de pólen encontrada por estes autores pode ser devido a alta intensidade de vento e ausência de barreiras entre as populações estudadas, já que se tratava de uma paisagem com uma matriz agrícola. Estes mesmos autores estudaram também uma população de Araucária em uma floresta contínua no Paraná. Eles genotiparam 108 indivíduos adultos e 190 sementes. Os autores encontraram taxa de imigração de pólen de 54%, sendo que a distância média de polinização foi de 102 m. Este estudo sugere que o pólen viaja a longas distância chegando a 344 m, embora a maior parte da dispersão ocorreu a curtas distâncias (Bittencourt & Sebbenn, 2008).

Portanto, no geral, pode-se notar que na população avaliada foram obtidas menores taxas de imigração de pólen e sementes, bem como, menores distâncias de dispersão. Uma razão para a curta distância de dispersão de pólen pode ser a baixa capacidade de flutuação do pólen devido ao seu peso. Além do que a típica alta densidade nas Florestas de Araucária pode criar barreiras para o movimento de pólen, limitando a distância de dispersão de pólen dentro da floresta (Sousa & Hattemer, 2003). Devido a isto, a liberação de pólen pode ocorrer na forma de

“nuvens” que caem a curtas distâncias. Estas “nuvens” contribuem para a estrutura genética espacial da espécie.

Já a distância realizada de dispersão de sementes foi medida nos juvenis através da distância entre os juvenis e as árvores determinadas como maternas. Esta distância de dispersão de sementes variou de 6 a 318 m, com média de 131 m (Tabela 9 e Figura 8) e para os sub-adultos variou de 9 a 334 m, com média de 135 m. Cinquenta por cento das sementes (mediana) foram dispersas até a distância de 133 m nos juvenis (Tabela 9), 76% até 200 m e 91% até 250 m. Já nos sub-adultos, 50% das sementes foram dispersas até a distância de 117 m (Tabela 9), 84% até 200 m e 96% até 250 m. Detectou-se uma alta negativa e significativa correlação entre o número de juvenis ( $r = -0,82$ ,  $P < 0,01$ ) e sub-adultos ( $r = -0,59$ ,  $P < 0,05$ ) e a distância da árvore materna, confirmando que os filhos se regeneram predominantemente nas vizinhanças na árvore materna. Este resultado ajuda a explicar a estrutura genética espacial intra-populacional observada nesta população.

A distância máxima de dispersão tanto de pólen quanto de sementes encontrada neste trabalho pode ser atribuída também ao tamanho da parcela. Possivelmente se fosse adotada uma parcela maior na RGF, a distância de dispersão encontrada poderia ser maior.

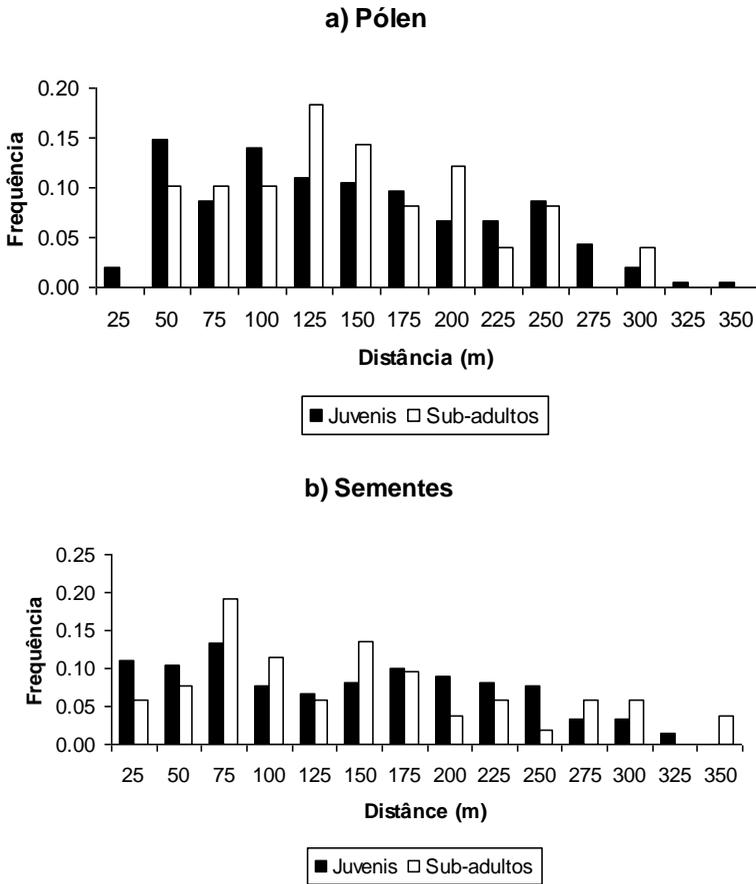


Figura 8. Distância de dispersão de pólen (a) e sementes (b), determinada por análise de parentesco nos juvenis e sub-adultos em *Araucaria angustifolia*.

Ao descrever a dispersão de sementes da Araucária, Reitz & Klein (1966) afirmam que:

Motivados pelo tamanho e peso do pinhão queremos crer que os fenômenos naturais de vento e gravidade são os que menos contribuem para a disseminação do Pinheiro Brasileiro. É nos seres vivos, especialmente nas aves e nos roedores que vamos encontrar os principais agentes da disseminação do pinhão, para não falar no índio que tendo no pinhão um grande alimento, involuntariamente deixa cair, cá ou lá, um pinhão.

Os autores afirmam ainda que entre as aves se sobressai a gralha (cerca de seis espécies diferentes) e a família dos Psitacídeos. Entre os mamíferos, destaque para os roedores (cutia, ratos, preás, ouriços, pacas e quatis), todavia os macacos também desempenham o papel de disseminadores do pinheiro. A área da Reserva Genética Florestal de Caçador possui uma rica avifauna. Bem como, de acordo com um relatório técnico de monitoramento de mamíferos da RGF de Caçador, desenvolvido pela Embrapa (Tortato, 2009), todos estes mamíferos citados por Reitz & Klein (1966), além de outros, ainda ocorrem na área da Reserva nos dias de hoje. Denotando, mais uma vez, o grau de conservação que possui esta área. A confirmação da presença da fauna também permite algumas especulações em relação as distâncias de dispersão medidas no presente estudo. Visto que, macacos, cutias, pacas e quatis são animais que percorrem de médias a grandes distâncias, assim, provavelmente, são os responsáveis pelas maiores classes de distância de dispersão encontradas.

Conforme o estudo de Bittencourt & Sebbenn (2007) a distância de dispersão de sementes de Araucária variou de 0,35 até 291 m sendo que 47% ficaram dentro de um raio de 60 m ao redor da planta-mãe. Como forma de comparativo, a seguir serão descritos resultados da literatura de alguns trabalhos com plantas com dispersão primária por barocoria. Nakanishi *et al.* (2008) estudaram a planta *Quercus salicina* no Japão. Utilizando 10 locos SSR os autores genotiparam 111 indivíduos adultos e 226 juvenis, caracterizando portanto, fluxo gênico realizado. A taxa de imigração de sementes foi estimada em 15% (fluxo este advindo de fora da parcela de 11,56 ha), portanto a maior parte do fluxo de sementes ocorre a curtas distâncias. Além disso, Asuka *et al.* (2005), com 11 locos SSR, também estudaram fluxo gênico realizado para *Fagus crenata*, uma planta monóica, avaliando 57 indivíduos adultos e 702 juvenis. Segundo os autores a taxa de imigração foi de 21,9% para as duas parcelas de estudo. As distâncias de dispersão de sementes foram estimadas em no máximo 20 ou 30 m da planta-mãe.

Estes resultados sugerem que a curta distância de dispersão encontrada neste trabalho é esperada para espécies com dispersão primária por gravidade.

Contudo, também a fim de comparar, a seguir serão descritos trabalhos com espécies zoocóricas. Sebbenn *et al.* (2011), com oito locos SSR, caracterizaram a distância de dispersão de uma população isolada de *Copaifera langsdorffii*, avaliando todos os indivíduos de uma área de 4,8 ha, sendo 112 adultos e 128 plântulas. Apesar de ser zoocórica, as estimativas de distância de dispersão de sementes encontradas foram baixas, variando de 1 a 170 m, sendo que aproximadamente 50% das plântulas foram encontradas dentro de um raio de 52 m da planta-mãe e 82% dentro dos 100 m de raio. Além disso, a análise de parentesco revelou ausência de imigração de sementes. Os autores atribuem esta baixa taxa de imigração e a curta distância de dispersão ao fato de que a população está isolada em uma matriz composta de plantação de cana-de-açúcar e área urbana, dificultando o deslocamento da fauna dispersora. O trabalho de Jordano *et al.* (2007), ao estudar *Prunus mahaleb*, traz estimativas diretas de que mamíferos e aves de médio e grande porte podem transportar grandes quantidades de sementes e a grandes distâncias (50% dos mamíferos dispersaram a distâncias maiores que 495 m, e 50% dos pássaros dispersaram a distâncias maiores que 110 m), conectando populações distantes. Em contraste, animais de pequeno porte tendem a depositar sementes próximas a planta-mãe (50% dispersaram a uma distância menor que 51 m da árvore-mãe). Portanto, um declínio nas populações dos animais dispersores pode representar um sério impacto no fluxo gênico de algumas espécies de árvores, principalmente no que se refere a dispersão a longas distâncias, ficando as sementes restritas a locais próximos a planta-mãe.

Entretanto, ainda pouco se sabe sobre a nuance entre dispersão e predação de sementes, sobretudo no que se refere a Araucária, já que não possui fruto, ao ser ingerida, o embrião é automaticamente destruído. Normalmente seus predadores são seus dispersores, os quais a partir de um processo acidental de desperdício ou proposital de reserva, dispersam a semente. Um experimento de remoção de pinhão, no RS, com sistema de carretel nas sementes mostrou que do total de sementes utilizadas no estudo, 13 foram predadas no próprio local e 205 foram removidas. Destas 205, seis foram perdidas, 180 foram predadas e apenas 19 foram estocadas (Lamberts, 2003). O autor identificou três grupos de animais, as gralhas foram os dispersores de maiores distâncias. Os pequenos roedores chegaram a remover as sementes a

uma distância de até 26,7 m (com uma média de  $4,7 \pm 0,42$  m). Entretanto, 99,3% das sementes removidas estavam predadas. Já as cutias dispersaram a uma distância de até 50 m (com média de  $6,50 \pm 1,65$ ). O percentual de predação por cutias foi de 67,7% e, portanto, 32,3% foram estocadas, mostrando-se uma dispersora mais eficiente do que os pequenos roedores. Neste sentido, Job (2007) também avaliou a distância de dispersão do pinhão. Das 320 sementes, 222 foram removidas a uma distância máxima de 30 m e média de  $3,14 \pm 5,05$ , contudo 213 sementes do total foram predadas. Estes trabalhos trazem dados relevantes no que se refere a dispersão de pinhão, embora sejam trabalhos de curto prazo, o ideal seria um maior tempo de acompanhamento, visto que, como discutido anteriormente, a Araucária apresenta variações na fertilidade e produção de pinhão. Além do mais são trabalhos que tratam de fluxo gênico efetivo e não realizado.

Técnicas moleculares como a análise de parentesco são estudos refinados no que diz respeito a cálculo de distância tanto de dispersão quanto de polinização, muito mais do que métodos indiretos de observação e vestígios de fauna, porém estes são importantes para identificar quais são os agentes dispersores. O ideal é a combinação destas técnicas para ajudar a responder estas questões relacionadas aos eventos de dispersão (Jordano *et al.*, 2007). Maiores estudos neste sentido são relevantes, pois, a medida em que se cerca cada vez mais a auto-ecologia da Araucária, mais fundamentos serão construídos para melhor desenvolver estratégias de conservação da espécie.

## 6. SÍNTESE DOS RESULTADOS

- As árvores adultas encontram-se aleatoriamente distribuídas dentro da parcela, enquanto os juvenis apresentam distribuição agregada;
- Os nove locos utilizados neste estudo encontram-se em equilíbrio de ligação;
- A população apresentou alta diversidade genética e alto índice de fixação;
- Os níveis de diversidade genética foram diferentes entre os estádios ontogênicos, sendo maior nos adultos do que nos juvenis;
- A endogamia também diferiu entre as coortes estudadas e foi substancialmente maior nos juvenis do que nos indivíduos adultos;
- Existe estrutura genética espacial em ambos os estádios ontogênicos, adultos e juvenis;
- O conjunto dos nove locos microssatélites utilizados neste trabalho permitiu as análises de parentesco com precisão devido ao alto poder de exclusão;
- O número de descendentes deixados foi variável tanto para as fêmeas quanto para os machos;
- Não existe associação entre o número de descendentes deixados com o DAP das árvores parentais;
- A análise de parentesco indicou que a grande maioria dos parentais está dentro da parcela, revelando uma baixa taxa de imigração de sementes e de pólen;
- Este estudo também revelou uma distância realizada de dispersão de sementes e pólen restrita.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um feito importante deste trabalho foi detectar os efeitos genéticos da superexploração e da fragmentação. Já que, os indivíduos adultos caracterizados geneticamente refletiram uma condição histórica de menor pressão antrópica. No entanto, caracterizar a diversidade genética dos indivíduos jovens permitiu medir o resultado da pressão ecológica que a população vem sofrendo, avaliando o que está sendo passado geneticamente para as gerações mais recentes e revelando uma condição atual e potencial de estado de conservação da população. Isto evidencia ainda mais a necessidade de se estabelecer estratégias mais eficientes de conservação e manejo da Araucária. Entretanto, o fato de esta população se comportar deste modo, não implica que todas as populações de Araucária se comportem do mesmo modo - a característica desta população pode ser particular de um tipo de microhabitat, microclima, topografia e até mesmo do tipo de fauna existente na região da Reserva Genética Florestal de Caçador.

Estes resultados de efeitos genéticos da fragmentação e superexploração sofridos pela Araucária mostram a tendência da perda de diversidade genética em uma população contínua e considerada em bom estado de conservação. Esta tendência é ainda mais esperada para remanescentes isolados e com maior histórico de exploração. Não obstante, este estudo sugere que trabalhos que caracterizam a diversidade genética somente de indivíduos adultos podem estar subestimando o risco de extinção e superestimando o estado de conservação das populações.

Esta população é indicada para coleta de sementes já que apresentou altos índices de diversidade genética e baixa endogamia nos adultos. Contudo por apresentar estrutura genética espacial, sugere-se que as sementes não sejam coletadas aleatoriamente na população, mas sim evitando-se distâncias menores do que 20 m entre uma árvore e outra.

O fato desta população, considerada em bom estado de conservação, revelar um baixo fluxo gênico (baixa taxa de imigração e maior parte da dispersão a curtas distâncias) demonstra a importância em se ter um *continuum* florestal para que a espécie siga a sua dinâmica natural dos processos reprodutivos principalmente no que se refere aos processos de herança genética. E com isso revela que em populações isoladas (cenário atual da Floresta Ombrófila Mista) a tendência é que sejam mais intensos os efeitos do gargalo genético (maior atuação dos efeitos da deriva e da endogamia). Estes padrões de distribuição

geográfica e de variabilidade, que refletem a dinâmica dos genes tanto dentro como entre populações, têm que ser considerados na definição e no manejo de áreas de conservação. Além do mais, a Araucária apresenta estrutura genética espacial, encontrada neste e demais trabalhos citados anteriormente. Desse modo é importante que estratégias que promovam a conectividade sejam implantadas nos remanescentes de Floresta Ombrófila Mista. Através da conectividade, o fluxo gênico pode contrapor os efeitos da deriva genética e da endogamia. Haja vista que, populações com altos níveis de endogamia e deriva genética podem sofrer aumento da depressão endogâmica, perda de diversidade genética e maiores probabilidades de fixação de alelos deletérios e, com isso, apresentarem um incremento na taxa de extinção (Frankham, 2005). Entretanto, embora estejam disponíveis cada vez mais informações consistentes sobre o nível de variabilidade genética e fluxo gênico em populações naturais, ainda há necessidade de maiores investigações em relação a diversas questões como: adaptação, sobrevivência, estabelecimento, seleção entre outros. Estes estudos são importantes para a compreensão dos processos a que as populações naturais estão submetidas.

Finalmente, a *Araucaria angustifolia* é a espécie-chave da formação Florestal Ombrófila Mista, além do mais, tem um forte significado cultural. Por ser uma espécie-chave, conservar a Araucária resulta em conservar várias espécies associadas tanto da flora quanto da fauna que depende dela para se alimentar. Ao passo que, o inverso também é essencial, conservar espécies associadas principalmente no que se refere a fauna dispersora é de fundamental importância para a manutenção da *A. angustifolia*. Esta complexidade revela a importância da integração de diversos tipos de estudos a fim de fundamentar estratégias que reflitam num sistema como um todo e não em atitudes isoladas de conservação. Portanto, espera-se que os resultados encontrados aqui contribuam na fundamentação de ações de manejo, de programas de restauração de áreas degradadas, na implantação de corredores ecológicos, na definição de tamanhos mínimos de reservas, entre outras estratégias para a conservação da Araucária e sua formação florestal.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asuka, Y; Tomaru, N; Tunebara, Y; Tani, N; Tsumura, Y. & Yamamoto, S. 2005. Half-sib family structure of *Fagus crenata* saplings in an old-growth beech–dwarf bamboo forest. **Molecular Ecology**, 14, 2565–2575.
- Auler, N. M. F.; Reis, M. S.; Guerra, M. P.; Nodari, R. O. 2002. The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: I. Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptive variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 25, (3) 329-338.
- Bacles, C.F.E.; Ennos, R.A. 2008. Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior*. L. in a chronically fragmented landscape. **Heredity**, 101: 368–380.
- Bittencourt, J.M.; Sebbenn, A.M. 2007. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, 99: 580-591.
- Bittencourt, J.M.; Sebbenn, A.M. 2008. Pollen movement in a continuous forest of *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. **Conservation Genetics**. Publisher. SPRINGER. 10.1007/s10592-007-9411-2.
- Bittencourt, J.M.; Sebbenn, A.M. 2009. Genetic effects of forest fragmentation in high-density *Araucaria angustifolia* populations in Southern Brazil. **Tree Genetics & Genomes** 5:573–582.
- Burczyk, J.; Adams, W.T.; Shimizu, J.Y. 1996. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon) stand. **Heredity**, 77: 251-260.
- Burczyk, J.; Difazio, S.P.; Adams, W.T. 2004. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel. **Forest Genetic**, 11: 1-14.
- Clark, D.A.; Evans, F.C. 1954. Distance to nearest neighbour as a measure of spatial relationship in populations. **Ecology** 35: 445-456.

Connell, J.H. 1971. **On the role of natural enemies in preventing competitve exclusion in some marine animals and in rain forest trees.** *In:* Dynamics of populations (P. den Boer and G. Gradwell *eds.*). Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, The Neterlands. P. 298-313.

Conte, R. Nodari, R.O. Vencovsky, R. Reis, M.S. 2003. Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity** 91, 401-406.

Degen, B.; Petit R.; Kremer, A. 2001. SGS – Spatial Genetic Software: a computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structure of individuals and populations. **Journal of Heredity** 92: 447-448.

Degen, B., Bandou, E.; Caron, H. 2004. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. **Heredity**, 93: 585-591.

Dow, B.D.; Ashley, M.V. 1998. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. **Journal of Heredity**, 89: 62-70.

Fahrig, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.** 34: 487–515.

Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1996. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2a. Ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN. 220 p.

Ferreira, D.K.; Nazareno, A. G.; Mantovani, A.; Bittencourt, R.; Sebbenn, A.M. & Reis, M.S. 2011. Can 50-year old Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) plantations contribute to genetic conservation programs? (Submetido).

Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. **Biological Conservation**, 126, 131–140.

Gaino, A.P.S.C; Silva, A.M.; Moraes, M.A.; Alves, P.F.; Moraes, M.L.T.; Freitas, M.L.M.; Sebbenn, A.M. 2010. Understanding the

effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree species *Myracrodruon urundeuva*. **Conservation Genetics**, 11:1631–1643.

Geng, Q.; Lian, C.; Goto, S.; Tao, J.I.; Kimura, M.; Islam, M.D.S. & Hogetsu, T. 2008. Mating system, pollen and propagule dispersal, and spatial genetic structure in a high-density population of the mangrove tree *Kandelia candel*. **Molecular Ecology**, 17, 4724–4739.

Goudet, J. 1995. FSTAT. (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate *F*-statistics. **J. Heredity**, 86: 485-486.

Gubert Filho, F.A. 1989. **Proposta para a criação de um sistema de unidades de conservação de *Araucaria angustifolia* no Estado do Paraná**. Curitiba: Instituto de Terras, Cartografia e Florestas, 36p.

Guerra, M.P.; Silveira, V.; Reis, M.S.; Schneider, L. 2002. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. (org.) **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: Editora SENAC. p. 85-101.

Hamilton, M.B. 1999. Tropical tree gene flow and seed dispersal. **Nature**, 401: 129-130.

Hamrick, J.L. & Godt, M.J.W., 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L.E.; & Weir, B.S. (eds.) **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, MA. 43-63.

Hamrick, J.L.; Godt, M.J.W. & Sherman-Broyles, S.L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forests**, 6:95-124.

Hamrick, J.L. 2004. Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management**, 197: 323-335.

Hardesty, B.D.; Dick, C.W.; Kremer, A.; Hubbell, S. & Bermingham, E. 2005. Spatial genetic structure of *Simarouba amara* Aubl. (Simaroubaceae), a dioecious, animal-dispersed Neotropical tree, on Barro Colorado Island, Panama. **Heredity**, 95, 290–297.

Hardesty, B.D.; Hubbell, S.; Bermingham, E. 2006. Genetic evidence of frequent long-distance recruitment in a vertebrate-dispersed tree. **Ecological Letters**, 9: 516-525.

Hardy, O.; Vekemans, X. 2002. SPAGeDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Mol. Ecol. Notes** 2: 618-620.

Hardy, O.J., Maggia, L., Bandou, E., Breyne, P., Caron, J., Chevallier, M.H., Doligez, A., Dutech, C., Kremer, A., Latouche-Hallé, C., Troispoux V., Veron, V., Degen, B. 2006. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 neotropical tree species. **Molecular Ecology**, 15: 559-571.

Hartl D.L & Clark A.G. 2010 **Princípios de Genética de Populações**. Artmed. 660p.

Holsinger, K.E. 2000. Demography and extinction in small populations. In: YOUNG, A.G. & CLARKE, G.M. (editores) **Genetis, demography and viability of fragmented populations**. Cambridge University Press.

Job, G. 2007. Influência de frutos e sementes na abundância de pequenos mamíferos e a relação com a predação e a dispersão de sementes da Araucária (*Araucaria angustifolia*). Dissertação (mestrado em ecologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 53p.

Janzen, D.H. 1970. Herbivores and the number of tree species in tropical forests. **American Naturalist**, 104:501-528.

Jordano, P.; García, C.; Godoy, J.A. & García-Castaño, J.L. 2007. Differential contribution of frugivores to complex seed dispersal patterns, **PNAS**. Volume 104, número 9. 3278–3282.

Kageyama, P.Y.; Gandara, F.B. & Souza, L.M.I. 1998. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, 12, (32), 65-70.

Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, 16: 1099-1106.

- Kettle, J.C.; Hollingsworth, M.; Jaffré, T.; Moran, B.; Ennos, A. 2007. Identifying the early genetic consequences of habitat degradation in highly threatened tropical conifer, *Araucaria nemorosa* Laubenfels. **Molecular Ecology**, 16: 3581-3591.
- Klein, R.M. 1960. Aspectos dinâmicos do pinheiro brasileiro. **Sellowia**, n.12, p.17-44.
- Lamberts, A.V.D.H. 2003. **Predação e sobrevivência de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze em áreas de mata nativa e plantação de *Pinus eliotti* na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS**. Dissertação (Mestrado em ecologia), Unicamp. 76p.
- Leal, C.G; Câmara, I.G. Status do *hotspot* Mata Atlântica: uma síntese In: LEAL, C.G; CÂMARA, I.G, 2005. **Mata Atlântica: Biodiversidade, ameaças e perspectivas**. p. 3-11.
- Litt, M. & Luty, J.A., 1989. A hipervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, 44: 397-401.
- Loiselle, B.A.; Sork, V.L.; Nason, J.; Graham, C. 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis*. **American Journal of Botany**, 82: 1420-1425.
- Mantovani, A; Morellato, L.P.C & Reis, M.S. 2006a. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica** 27: 787-796.
- Mantovani, A; Morellato L.P.C & Reis, M.S. 2006b. Internal genetic structure and outcrossing rate in a natural population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Journal of Heredity** 97: 466-472.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B.; Pemberton, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, 7: 639-655.
- Martins, P.S. 1987. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação *in situ*. **IPEF**, 35, p.71-78.

- Mattos, J.R. 1994. **O Pinheiro Brasileiro**. 2<sup>o</sup> edição, Lages, SC, p. 226.
- Meagher, T.R.; Thompson, E. 1987. Analysis of parentage for naturally established seedlings of *Chamaelirium luteum* (Liliaceae). **Ecology** 68:803–812. doi:10.2307/1938351
- Metzger, J.P. 1999. Estrutura da Paisagem e fragmentação: análise bibliográfica. **Anais da academia brasileira de Ciências**. 71: 445-463.
- Moore, G.E., In: Leal, C.G; Câmara, I.G, 2005. **Mata Atlântica: Biodiversidade, ameaças e perspectivas**. p. 103-118.
- Moraes, P.L.R. & Derbyshire, M.T.V.C. 2003. Diferenciação genética e diversidade em populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez. **Biota Neotropica**. v. 3, n. 1.
- Naito, Y.; Kanzaki, M.; Iwata, H.; Obayashi, K.; Lee, S.L.; Muhammad, N.; Okudo, T.; Tsumura, Y. 2008. Density-dependent selfing and its effects on seed performance in a tropical canopy tree species, *Shorea acuminata* (Dipterocarpaceae). **Forest Ecology and Management**, DOI 10.1016/j.foreco.2008.04.031.
- Nakanishi, A.; Tomaru, N.; Yoshimaru, H.; Manabe, T.; Yamamoto, S. 2006. Effects of seeds- and pollen-mediated gene dispersal on genetic structure among *Quercus salicina* samplings. **Heredity**, 96: 79-84.
- Neel, M.C. & Ellstrand, N.C., 2003. Conservation of genetic diversity in the endangered plant *Eriogonum ovalifolium* var. *vineum* (Polygonaceae). **Conservation Genetics** 4: 337-352.
- Oyama, K., 1993. Conservation biology of tropical trees: demographic and genetic considerations. **Environment Update** 1: 17-32.
- Paludo, G.F.; Mantovani, A.; Klauberg C. & Reis M.S. 2009. Estrutura demográfica e padrão espacial de uma população natural de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae), na reserva genética florestal de Caçador, estado de Santa Catarina. **Revista Árvore**, (33), n.6, p.1109-1121.

- Patreze, C.M. & Tsai, S.M. 2010. Intrapopulational genetic diversity of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is different when assessed on the basis of chloroplast or nuclear markers. **Plant Syst Evol**, 284: 111-122.
- Pena, S. D. J. 2009. O DNA como (única) testemunha em determinação de paternidade. **Revista Bioética**, v. 5, número 2, p. 231-241.
- Pinto, L.R.; Vieira, M.L.C.; Souza, A.P. & Junior, C.L. 2001. Isoenzimas e microssatélites em Plantas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 4(20): 16-19.
- Primack, R.; Rozzi, R.; Feinsinger, P.; Dirzo, R.; Massardo. 2001. **Fundamentos de conservación biológica: perspectivas latinoamericanas**. Ciudad de México. 797 p.
- Puchalski, A. 2006. **Variações edafo-climáticas e ocorrência natural da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze no estado de Santa Catarina**. Dissertação (mestrado em recursos genéticos vegetais) Universidade Federal de Santa Catarina. 75 p.
- Reis, M.S. 1996. Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais em plantas. **Revista Brasileira de Genética**. v.19, n.4, p.37-47.
- Reis, M.S.; Mariot, A. Conte, R.; Guerra, M.P. 2002. Aspectos do manejo de recursos da Mata Atlântica no contexto ecológico, fundiário e legal. In: SIMÕES, L.L. & LINO, C.F. **Sustentável Mata Atlântica a exploração de seus recursos florestais**. p. 103-118.
- Reitz, R. & Klein, R.M. 1966. **Araucariáceas**. Flora Ilustrada Catarinense, 1-62 p.
- Reitz, R.; Klein, R.M. & Reis, A. 1978. **Projeto Madeira de Santa Catarina**. Sellowia 28-30, 1-320 p.
- Ricklefs, R.E. 2003. **A Economia da Natureza**. Quinta edição. Editora Guanabara Koogan.
- Salgueiro, F.; Caron, H.; Souza, M.I.F.; Kremer, A. & Margis, R. 2005. Characterization of nuclear microsatellite loci South American Araucariaceae species. **Molecular Ecology**, 5, 256-258 p.

Schmidt, A.B. 2005. **Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites (SSRs) para *Araucaria angustifolia* (Bert.), O. Kuntze.** Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 98 p.

Schmidt, A.B; Ciampi A.Y.; Guerra, M.P. & Nodari, R.O. 2007. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites (SSRs) para *Araucaria angustifolia* (Bert.), O. Kuntze. **Molecular Ecology Notes**, 7, 340–342.

Schueler, S.; Tusch, A.; Scholz, F. 2006. Comparative analysis of the within-population genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.) at the self-incompatibility locus and nuclear microsatellites. **Molecular Ecology**, 15: 3231-3243.

Sebbenn, A.M. 2002. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, 14: 115-132.

Sebbenn, A.M.; Pontinha, A.A.S.; Freitas, S.A.; Freitas, J.A. 2004. Variação genética em cinco procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. no sul do Estado de São Paulo. **Rev. do Inst. Flor.**, v. 16, n. 2, p. 91-99.

Sebbenn, A.M. 2006. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. *In*: Higa, A.R; Silva, L. **Pomares de sementes de espécies nativas.** Curitiba: FUPEF, pp. 193-138.

Sebbenn, A.M; Carvalho, A.C.M; Freitas, M.L.M; Moraes, S.M.B; Gaino, A.P.S.C; Silva, J.M; Jolivet, C. & Moraes, M.L.T. 2011. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, 106, 134–145.

Scott, L. J.; Shepherd, R.; Henry, R.J. 2003. Utility and evolution of microsatellites in the Araucariaceae. **Plant Systematics and Evolution** 236: 115-123.

Setoguchi, H.; Osawa, T.A.; Pintaud, J.C.; Jaffré, T. & Veillon, J.M. 1998. Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on rbcL gene sequences. **American Journal of Botany** 85 (11): 1507-1516.

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

Silva, C.R.S.; Albuquerque, P.S.B.; Ervedosa, F.R.; Mota, J.W.S.; Figueira, A. & Sebbenn, A.M. 2010. Understanding the genetic diversity, spatial genetic structure and mating system at the hierarchical levels of fruits and individuals of a continuous *Theobroma cacao* population from the Brazilian Amazon. **Heredity**, 1–13.

Smouse, P.E.; Sork, V.L. 2004. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. **Forest Ecol Manage**, 197: 21-38.

Sousa, V.A.; Hattemer, H.H. 2003. Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**, 51, 309–317.

Stefenon, V.M.; Nodari, R.O. & Guerra, M.P. 2004. 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** 17: 47-63.

Stefenon, V.M.; Gailing, O. & Finkeldey, R. 2007. Genetic Structure of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) Populations in Brazil: Implications for the in situ Conservation of Genetic Resources. **Plant Biology**. 9 (2007): 516–525.

Stefenon, V.M.; Caprestano, C. 2009. Monoicy in *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae): I. Morphological aspects of the reproductive structures. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** (2009) 81(4): 701-705.

Tabanez, A.A.J. & Virgílio, M.V. 2000. Patch structure within Brazilian Atlantic rain forest fragments and implications for conservation. **Biotropica**. 32 (4b): 925-933.

Thrall, P.H.; Burdon, J.J. & Murray, B.R. 2000. **The metapopulation paradigm: a fragmented view of conservation biology**. In: Young, A.G. & Clarke, G.M. (eds.) *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. Cambridge University Press.

Tortato, M.A. 2009. Mamíferos da Reserva Florestal da Embrapa/Epagri Caçador – Santa Catarina. **Relatório técnico de atividades de campo**. EMBRAPA.

Viana, V.M. & Pinheiro, L. A. F. V. 1998. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. **Série técnica IPEF**, São Paulo, v.12, n. 32, p.25-42.

Vieira da Silva, C; Reis, M.S. 2009. Produção de pinhão na região de Caçador SC: Aspectos da obtenção e sua importância para comunidades locais. **Ciência Florestal**, v. 19, p. 365-376.

Vekemans, X & Hardy, O.J. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analysis in plant populations. **Molecular Ecology**, 13: 921–935.

Weir, B.S. 1996. *Genetic Data Analysis II*. Sunderland: Sinauer Associates, p. 445.

Weber, J. L. & Wong, C., 1993. Mutation of human short tandem repeats. **Hum. Mol. Genet.** 2: 1123-1128.

Wolpert, L. 2000. **Princípios de Biologia do desenvolvimento**. Artes Médicas Sul, Porto Alegre. 576p.

Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. **Genetics**, 16: 97-159.

Young, A.; Boyle, T. Forest Fragmentation. *In*: Young, A.; Boshier, D.; Boyle, T. (Eds) 2000. **Forest Conservation Genetics: principles and practice**. Collingwood: CSIRO Publishing. 352.

Young, A.; Boyle, T.; Brown, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, 11: 413-418.

## Apêndice



Eletoferogramas demonstrando inferências de tamanhos de alelos (pb) nos nove locos microssatélites (Aang01, Ag20, Ag23, Ag45, Ag56, Ag62, Ag94, CRCA1 e CRCA2, respectivamente) em indivíduos de *Araucaria angustifolia* gerados pelo programa Fragment Profiler. O eixo vertical indica a intensidade de fluorescência mensurada pelo sequenciador de DNA (MegaBACE 1000).