

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO
DE *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KUNTZE**

ROBERTA INÁCIA DUARTE

Trabalho de conclusão de
curso apresentado como
requisito parcial para
obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo

**FLORIANÓPOLIS
DEZEMBRO, 2011**

ROBERTA INÁCIA DUARTE

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO
DE *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KUNTZE**

Orientador: MAURÍCIO SEDREZ DOS REIS

Supervisor: ALISON GONÇALVES NAZARENO

Trabalho de conclusão de
curso apresentado como
requisito parcial para
obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo

**FLORIANÓPOLIS
DEZEMBRO, 2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO
DE *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KUNTZE**

ROBERTA INÁCIA DUARTE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis
(Orientador)

Alison Gonçalves Nazareno
(Supervisor)

Prof. Rubens Onofri Nodari (Membro da
banca)

**FLORIANÓPOLIS
DEZEMBRO, 2011**

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho, especialmente:

A minha família, meus pais Antônio e Inácia, minhas irmãs Flávia e Maria Antônia, meu cunhado e irmão de coração, Lazanha e minha afilhada Maria Cecília, pelo carinho e apoio incondicionais e durante toda a realização da minha graduação e desse trabalho.

A todos meus familiares e amigos, pelo apoio e carinho.

Aos meus colegas do NPFT, pelo auxílio na coleta, avaliações, análises de dados, companheirismo e apoio durante todo meu trabalho, especialmente: Giovani, Montagna, Carol, Luis Guilherme, Fernando André, Fernando de Luca, Georg, Felipe, Alex, Glauco, Andrea, Samantha, Douglas, Caio, Zago e Ricardo.

Aos colegas do LFDGV, principalmente, Gustavo, Vini, Denise, Regina, Amanda, Sara, Karina, Domingas, Morgana, por todos os ensinamentos, auxílio e apoio incansáveis durante a realização do trabalho.

Aos colegas, Vanessa Almeida e Luiz Melgaço Bloisi, pelo auxílio nas extrações de DNA;

Ao meu supervisor e também colega de laboratório, Alison, pela supervisão e orientação, ensinamentos e auxílio durante o trabalho.

Ao meu orientador Maurício Sedrez dos Reis, pela orientação, por todo o apoio ensinamentos e confiança depositada durante esses dois anos de orientação.

Aos meus colegas da turma 2007-1 e agregados por todo o companheirismo durante a graduação, especialmente Morgana e Josiane, por todo carinho, companheirismo e paciência e momentos de alegria durante esses cinco anos.

Ao CNPq e a FAPESC, pelo auxílio financeiro concedido.

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DE *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KUNTZE

Autora: Roberta Inácia Duarte

Orientador: Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis

RESUMO

A espécie *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, o Pinheiro brasileiro, é a principal espécie da FOM. Foi a espécie florestal nativa mais importante no Brasil, em condição da qualidade da madeira e de sua abundância nas suas áreas de abrangência. Essa mesma característica de uma espécie economicamente vantajosa foi, porém que levou a redução da área original a níveis insignificantes. A redução no tamanho das populações nos fragmentos torna as futuras gerações mais comprometidas devido ao aumento do cruzamento entre aparentados e a perda de alelos pelo efeito de deriva genética, comprometendo a sustentabilidade da espécie e de organismos associados. Uma das principais preocupações dos programas de conservação, juntamente à preservação de habitats, é a manutenção de níveis adequados de diversidade genética. O uso de ferramentas para a interpretação dos efeitos da fragmentação dos remanescentes sobre a estrutura genética da população apresenta grande importância nesse cenário. Dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a diversidade genética de uma população de *Araucaria angustifolia* de Campo dos Padres–Urubici(SC). Foram genotipados 59 indivíduos adultos e 58 indivíduos jovens, com o uso de três locos microssatélites (Aang01, Ag20, Ag56). Desses locos genotipados foram detectados um total de 50 alelos. Foram estimados os índices de diversidade, índice de fixação e tamanhos efetivo. A heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,65 (Ag20) a 0,80 (Aang01), com média de 0,72. A heterozigosidade esperada (H_e) foi teve variação de 0,84 (Ag56) a 0,93 (Aang01), com média de 0,90. O valor encontrado para o índice de fixação (f) variou de 0,14 (Aang01) a 0,29 (Ag20), apresentando a média de 0,20 para os três locos. Os resultados encontrados para esses índices indicam a possível ocorrência de excesso de homozigotos na população. Comparando os dados entre as gerações, a diversidade genética (H_e) e a heterozigosidade observada foram semelhantes para os indivíduos jovens e adultos foi praticamente igual ($H_e \sim 0,90$ para ambos e H_o de 0,73 nos adultos e 0,71 nos jovens). O índice de fixação foi maior nos jovens (0,21) em relação aos adultos (0,18), ainda que a diferença tenha sido pouco expressiva. A obtenção desses índices sugere que haja cruzamento entre parentes e conseqüente aumento da endogamia nos jovens. Os valores de N_e encontrados sugerem que em longo prazo a população amostrada tem sua diversidade genética ameaçada. Dessa forma, as estratégias de conservação para a espécie devem priorizar o aumento dos tamanhos populacionais e viabilizar o fluxo gênico entre as populações.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Indivíduo adulto de *Araucaria angustifolia*. Foto de: Alexandre Mariot, capa journal of heredity, setembro de 2006. 15

Figura 2- Estruturas reprodutivas da *Araucaria angustifolia*: estróbilos masculinos (a); estróbilos femininos (b). Fotos de: Alex Zechini, 2010. 16

Figura 3- Deriva genética nas frequências alélicas em uma população de mico-leão-dourado. p , q e r são as frequências dos alelos A_1 , A_2 e A_3 , respectivamente. Frankham *et al.*, 2008. 19

Figura 4- Resultado de simulação de vinte réplicas de uma população finita de tamanho 25 ($2N=50$) para dez gerações, partindo de um conjunto gênico inicial com $p=0,5$. A distribuição das frequências alélicas é mostrada após 1, 2, 5, e 10 gerações de deriva genética. 20

Figura 5- Aumento do coeficiente de endogamia F em função do tempo em populações finitas de diferentes tamanhos (N). Frankham, 2008. 21

Figura 6- Mapa do estado de Santa Catarina, com destaque dos municípios de abrangência do Campo dos Padres. Alex Zechini, 2010. 26

Figura 7- Imagem de satélite da área de limites das Abrangências do Campo dos Padres e delimitação das áreas de coleta das amostras. NPFT-UFSC,2011. 28

Figura 8 - Imagem de satélite da área de coleta das amostras com os respectivos pontos de coleta para cada amostra(indivíduos jovens e adultos). NPFT-UFSC,2011. 28

Figura 9- Gel de acrilamida 4% com indivíduos de *Araucaria angustifolia* amplificados. LFDGV, 2011..... 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Locos microssatélites nucleares, suas sequências de amplitude alélica esperada (em pares de base, pb), a sequência dos iniciadores e os respectivos autores que os desenvolveram. 30

Tabela 2- Frequências alélicas nos três locos microssatélites para os indivíduos jovens e adultos de uma população de *Araucaria angustifolia*, localizada em Campo dos Padres- Urubici (SC). 37

Tabela 3- Índices de diversidade e de fixação para os locos analisados para a população de *A.angustifolia*, Campo dos Padres-Urubici (SC). 40

Tabela 4- Índices de diversidade e de fixação dos indivíduos jovens e adultos para a população de *A.angustifolia*, Campo dos Padres- Urubici (SC). 42

Tabela 5- Tamanho efetivo populacional (N_e) para valores de referência de 50, 500 e 1.000 44

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	11
2. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1. A espécie.....	14
3.2. Fragmentação Florestal e Diversidade Genética.....	17
3.3. FLUXO GÊNICO	22
3.4. MARCADORES MICROSSATÉLITES	23
4. OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo Geral	25
4.2. Objetivos Específicos	25
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1. Área de Estudo	25
5.2. COLETA DAS AMOSTRAS.....	29
5.3. EXTRAÇÃO DE DNA.....	29
5.4. QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS.....	29
5.5. PADRONIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	30
5.7. Genotipagem.....	32
5.8. Análise de Diversidade Genética	33
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6.1. Aplicação da Técnica	35

6.2. Frequências Alélicas.....	37
6.3. Índices de Diversidade Genética.....	39
6.4. Índices de Diversidade Genética nas Gerações	42
6.5. Tamanho efetivo populacional (N_e).....	44
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1. APRESENTAÇÃO

Esse trabalho tem o objetivo de apresentar as atividades desenvolvidas durante o estágio de conclusão no curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Catarina.

O estágio foi realizado durante o segundo semestre letivo de 2011, no Núcleo de Pesquisas em Florestas Tropicais (NPFT) / Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), no Centro de Ciências Agrárias/UFSC.

Este trabalho está inserido no contexto do projeto *Fundamentos para conservação e uso sustentável do pinhão*, financiado pela FAPESC, que tem como principais objetivos fundamentar ações para o uso sustentável do pinhão em remanescentes florestais, bem como estudar estratégias e modelos de conservação e domesticação da espécie. Mais especificamente, dentro do projeto, esse trabalho faz parte da *ação de pesquisa 4: Caracterização da Diversidade genética e fluxo gênico histórico e contemporâneo da Espécie* com enfoque na Meta 5, que pretende caracterizar a diversidade e estrutura genética em 10 populações de *A. angustifolia*, empregando marcadores microssatélites.

2. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Floresta Ombrófila Mista (FOM), também denominada floresta de pinheiros, mata de Araucária, faz parte do Domínio da Mata Atlântica e se encontra em uma região de clima pluvial subtropical, limitada pelas latitudes 19°15' S e 31°30' S e entre as longitudes 41°30' W e 54°30' W. Localiza-se em latitudes que vão de 500m a 1200m nos estados do sul do Brasil. Ainda apresenta ocorrências nos estados de São Paulo e Minas Gerais. No início do

século XX, cerca de 35% dos estados do sul do Brasil eram ocupados pela FOM, resumindo hoje a valores de 3% (GUERRA, 2002) a 13% (RIBEIRO *et al.*, 2009) da área original.

A espécie *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, o pinheiro brasileiro, é a principal espécie da FOM. É uma planta da família Araucariaceae, sendo a única espécie de seu gênero com ocorrência natural no Brasil (MANTOVANI *et al.*, 2004). Foi a espécie florestal nativa mais importante no Brasil, em condição da qualidade da madeira e de sua abundância nas suas áreas de abrangência. Essa mesma característica de uma espécie economicamente vantajosa foi, porém, que levou a redução da área original (HIGA *et al.*, 1992). A maioria dos remanescentes encontrados se resume a pequenos fragmentos de populações de variados tamanhos, quase sempre em formações mistas, com espécies folhosas, em densos sub-bosques, o que é um grande impasse para a regeneração natural da espécie (SHIMIZU *et al.*, 2000).

A excessiva fragmentação das populações leva a uma redução no seu tamanho efetivo, comprometendo a sustentabilidade tanto das populações da espécie em questão, quanto dos organismos, plantas ou animais associados (VIANA *et al.*, 1992). No caso da araucária, grande parte do remanescente pode estar se tornando inviável e sujeita ao desaparecimento, devido ao rompimento da dinâmica da sua regeneração, amadurecimento e reprodução. Mesmo que o ciclo se complete, o pequeno tamanho efetivo das populações nos fragmentos torna as futuras gerações cada vez mais comprometidas devido ao aumento da endogamia e perda de alelos pelo efeito da deriva genética (SHIMIZU *et al.*, 2000).

Uma das principais preocupações dos programas de conservação, juntamente à preservação de habitats, é a manutenção de níveis adequados de diversidade genética. Com o contínuo processo de mudanças ambientais, a diversidade genética dentro de populações permite a continuidade da evolução da espécie e sua conseqüente adaptação a essas novas condições. No entanto, a perda de diversidade pode interferir e levar a processos de endogamia e redução na reprodução e sobrevivência (FRANKHAM *et al.*, 2008).

A fragmentação florestal é uma das principais preocupações e se caracteriza como uma ameaça presente em todos os ecossistemas florestais, constituindo-se como uma das principais causas de perda de diversidade genética dentro de populações. Com a fragmentação pode ocorrer uma redução no número de indivíduos, o declínio nos tamanhos populacionais e conseqüente separação de remanescentes florestais por áreas não florestadas (SEOANE *et al.*, 2005). Nessas populações pequenas pode ocorrer o processo de deriva genética, o que significa ocorrer um afastamento das freqüências de seus alelos comparados aos da população original (KAGEYAMA *et al.*, 1998).

A manutenção da diversidade genética frente à fragmentação, dessa forma, assume uma preocupação. Porém a associação de fatores longevidade do indivíduo, diversidade genética e potencial para o fluxo elevado de pólen e de sementes entre as populações, seriam os fatores essenciais na resistência a extinção e a perda de diversidade durante a mudança das condições ambientais (HAMRICK, 2004).

O uso de ferramentas moleculares para a interpretação dos efeitos da fragmentação dos remanescentes sobre a estrutura genética da população apresenta grande importância dentro desse cenário. Os microssatélites são utilizados hoje rotineiramente para a medida da diversidade genética em uma gama de espécies, muitas delas em risco de extinção. Apresentam a característica e vantagem de mostrarem altos níveis de polimorfismo e muitos alelos por loco (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Desta forma, este trabalho tem como perspectiva a geração de conhecimentos que possam potencializar este contexto, o que permitirá o delineamento de estratégias que favoreçam conservação da espécie. A proposta de inserção desse trabalho está baseada na necessidade de conhecimento e quantificação da real situação da araucária, em relação à estrutura e à diversidade genética da espécie, para uma possível geração de dados relacionados ao manejo sustentável, que permeiem tanto a produção sustentável de pinhão, quanto a conservação, a domesticação e o melhoramento genético da espécie. Esses fatores aliados a estudos de

distribuição de alelos dentro de populações podem proporcionar informações para o desenvolvimento de estratégias apropriadas para o manejo e para a conservação dos recursos genéticos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A espécie

A *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. Kuntze é uma espécie caracterizada por seu porte elevado e formato peculiar. Atinge, quando adulta, de 20 a 50 metros de altura e de um a dois metros de diâmetro. O seu tronco é de forma cilíndrica e raramente ramificado. Os ramos são dispostos em verticilos que diminuem a distância entre si a medida que se aproximam da copa. Quando jovens, possuem a copa em um formato cônico e à medida que envelhecem o formato se apresenta em forma de umbela terminal. É conhecida popularmente como pinheiro brasileiro, pinheiro do Paraná, pinho, e pelos indígenas chamada de Curi e Curiúva. (Reitz & Klein, 1966).



Figura 1- Indivíduo adulto de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. Fonte: Alexandre Mariot, Journal of Heredity, setembro de 2006.

É uma espécie dióica, raramente monóica, com sexos separados em cones ou estróbilos (Reitz & Klein, 1966). As inflorescências masculinas (figura 2-a) são cones cilíndricos de 10 a 15 cm de comprimento e com 2,5 a 3 cm de espessura, dispostos lateralmente em galhos novos. Os cones femininos (figura 2-b) formam-se no ápice dos galhos laterais novos. São constituídos por várias escamas dispostas em espiral em torno de um eixo. Após a fecundação, o estróbilos assume um formato arredondado e quando maduro chega a medir de 15 a 18 cm e produzir de 100 a 120 sementes (HUECK, 1972).

O amadurecimento do pólen e o evento da polinização ocorrem geralmente no mês de setembro. Podem estar maduras de fevereiro a dezembro, dependendo da variedade, porém, geralmente maduras entre abril e maio (REITZ *et al.*, 1978).



Figura 2- Estruturas reprodutivas da *Araucaria angustifolia*: estróbilo masculino (a); estróbilo feminino (b). Fonte: Alex Zechini, 2010.

A ocorrência natural da espécie está limitada as abrangências da fitofisionomia Floresta Ombrófila Mista (FOM) pertencente ao Bioma Mata Atlântica. Pertence à família das Araucariáceas, é a única espécie do gênero de ocorrência natural no Brasil (MANTOVANI *et al.*, 2004). O gênero Araucária 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). A sua área de abrangência está principalmente na parte leste e central do planalto meridional do Brasil, nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e, ainda, nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro na forma de manchas esparsas (REITZ *et al.*, 1978).

A área de abrangência da *Araucaria angustifolia* era de cerca de 200.000 Km² no Brasil (REITZ *et al.*, 1978). No início do século XX, cerca de 35% dos estados do sul do Brasil eram ocupados pela FOM, resumindo hoje a valores de 3% (GUERRA, 2002) a 13% (RIBEIRO *et al.*, 2009) da área original. Esse histórico de exploração está diretamente relacionado à qualidade madeireira de espécie, que a fez ser considerada a espécie florestal nativa mais importante do Brasil (HIGA, 1992). Nos anos 60, por exemplo, sua madeira chegou a ser 92% da madeira exportada pelo país (HUECK, 1972). Na região sul do país, a intensificação da exploração na floresta de araucária ocorreu apenas após a década de 1910, com a construção da rodovia São Paulo-Rio Grande, a chegada da companhia Lumber e a crescente demanda por madeira no Sudeste brasileiro, na Argentina e no Uruguai. Antes disso, a demanda era destinada a pequenas fábricas de tecnologia rudimentar voltadas as necessidades locais como madeira serrada, construção de casas e de pontes (Carvalho e Nodari, 2008).

3.2. Fragmentação Florestal e Diversidade Genética

A fragmentação de *habitats* contínuos que levam a formação de remanescentes isolados espacialmente é uma ameaça para a manutenção da diversidade de muitos ecossistemas terrestres (YOUNG *et al.*, 1996). A fragmentação florestal é uma das principais preocupações e se caracteriza como uma ameaça presente em todos os ecossistemas florestais, constituindo-se como uma das principais causas de perda de diversidade genética dentro de populações. Com a fragmentação, pode haver uma redução no número de indivíduos, um declínio nos tamanhos populacionais e conseqüente separação de remanescentes florestais por áreas não florestadas (SEOANE *et al.*, 2005). Em plantas, ainda, os efeitos da fragmentação se tornam mais agravados devido às características de habito séssil, grande variedade de sistemas reprodutivos sexuais e assexuais, possibilidade de fluxo gênico tanto por

pólen como por sementes, às interações de polinização e dispersão com animais vetores, que podem ser afetados por eventos de fragmentação. (YOUNG *et al.*, 1996).

Fatores relacionados à ação humana frequentemente atuam na redução das populações, levando-as a tamanhos nos quais as espécies ficam susceptíveis a efeitos acidentais ou estocásticos. Essas flutuações são sentidas em pequenas populações e podem ter origens ambientais, catastróficas, demográficas ou genéticas. Mesmo que a causa original do declínio seja removida, tendência é que em pequenas populações os problemas surgidos persistam a menos que os números sejam restabelecidos (FRANKAM *et al.*, 2008).

Com a redução do tamanho populacional a fragmentação leva à formação de gargalos genéticos, pois os indivíduos remanescentes contêm apenas uma pequena amostra do conjunto genético original (YOUNG *et al.*, 1996) e a população remanescente passa a ter um tamanho menor que o mínimo adequado (N_e mínimo) para que o mesmo possa ter sua normal continuidade e evolução. Como consequência, a diversidade genética nessas populações é geralmente perdida levando assim a um processo de deriva genética, o que significa ocorrer um afastamento das frequências de seus genes comparados aos da população original, podendo levar a perda de alelos. (KAGEYAMA *et al.*, 1998). Tais efeitos podem interferir na persistência da espécie. Em curto prazo, a perda de heterozigosidade pode reduzir a aptidão individual da espécie, inviabilizando o remanescente populacional. Em longo prazo, porém, a diminuição da riqueza alélica pode limitar a capacidade da espécie a responder às mudanças relacionadas às forças seletivas (YOUNG *et al.*, 1996).

O impacto do tamanho populacional reduzido ocorre a cada geração e as perdas se acumulam com o tempo. Em pequenas populações, alguns alelos, principalmente os raros, podem não ser transmitidos devido ao acaso. Dessa forma, a frequência dos alelos nas gerações seguintes tende a diferir

daquela dos parentais (Figura 3), e ao longo de várias gerações a frequência dos alelos flutuam de uma geração para outra, num processo de deriva genética (FRANKAM *et al.*, 2008).

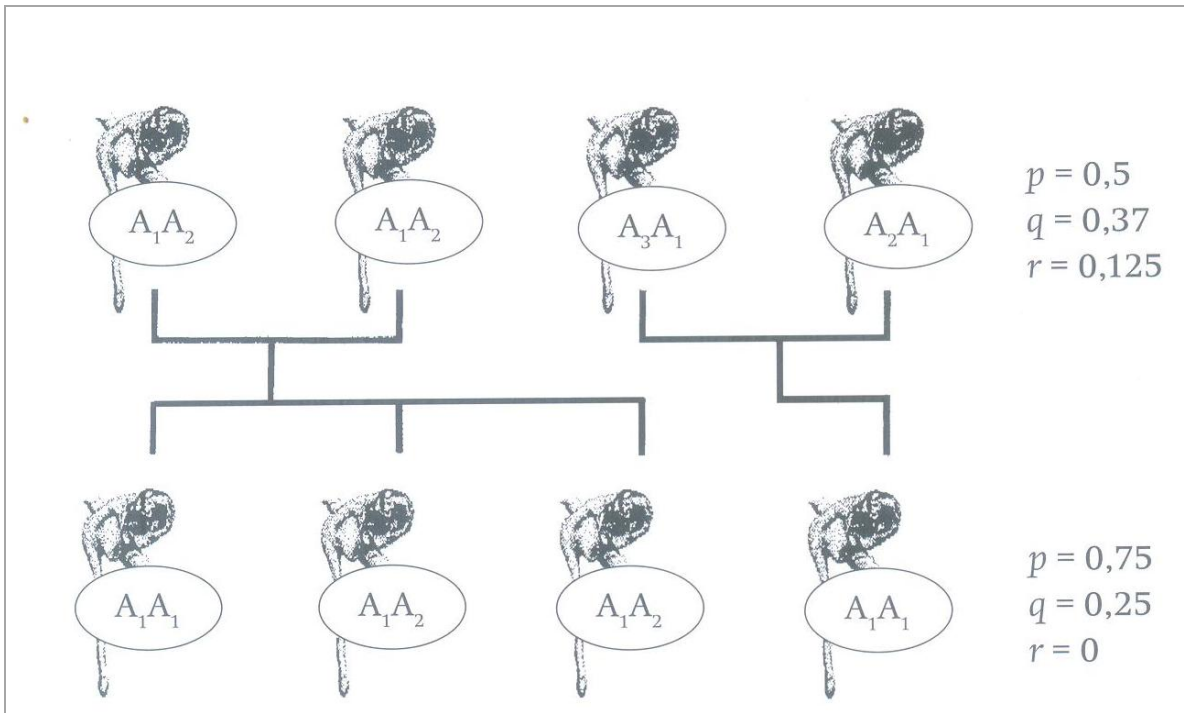


Figura 3- Deriva genética nas frequências alélicas em uma população de mico-leão-dourado. p , q e r são as frequências dos alelos A_1 , A_2 e A_3 , respectivamente. Frankham *et al.*, 2008.

Os efeitos da deriva podem ser percebidos, ainda, pela mudança do conjunto genético populacional e o possível afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg e a sua esperada estabilidade para as frequências alélicas diminuídos com o processo de redução populacional (fragmentação). Em uma simulação com a frequência de alelos com o decorrer das gerações (Figura 4), pode-se perceber a mudança da frequência desses alelos ocorrida pelo processo de deriva. Considerando um conjunto gênico inicial de $p=0,5$, observa-se claramente a tendência do afastamento dessa frequência em

diferentes direções e magnitudes, sendo conformadas frequências alélicas distintas a cada geração. Os alelos ainda podem ser perdidos ou fixados (homozigosidade), e uma vez isso aconteça assim permanecerá ao menos que fluxo gênico com outra população e fenômenos de mutação ocorram (TEMPLETON, 2011)

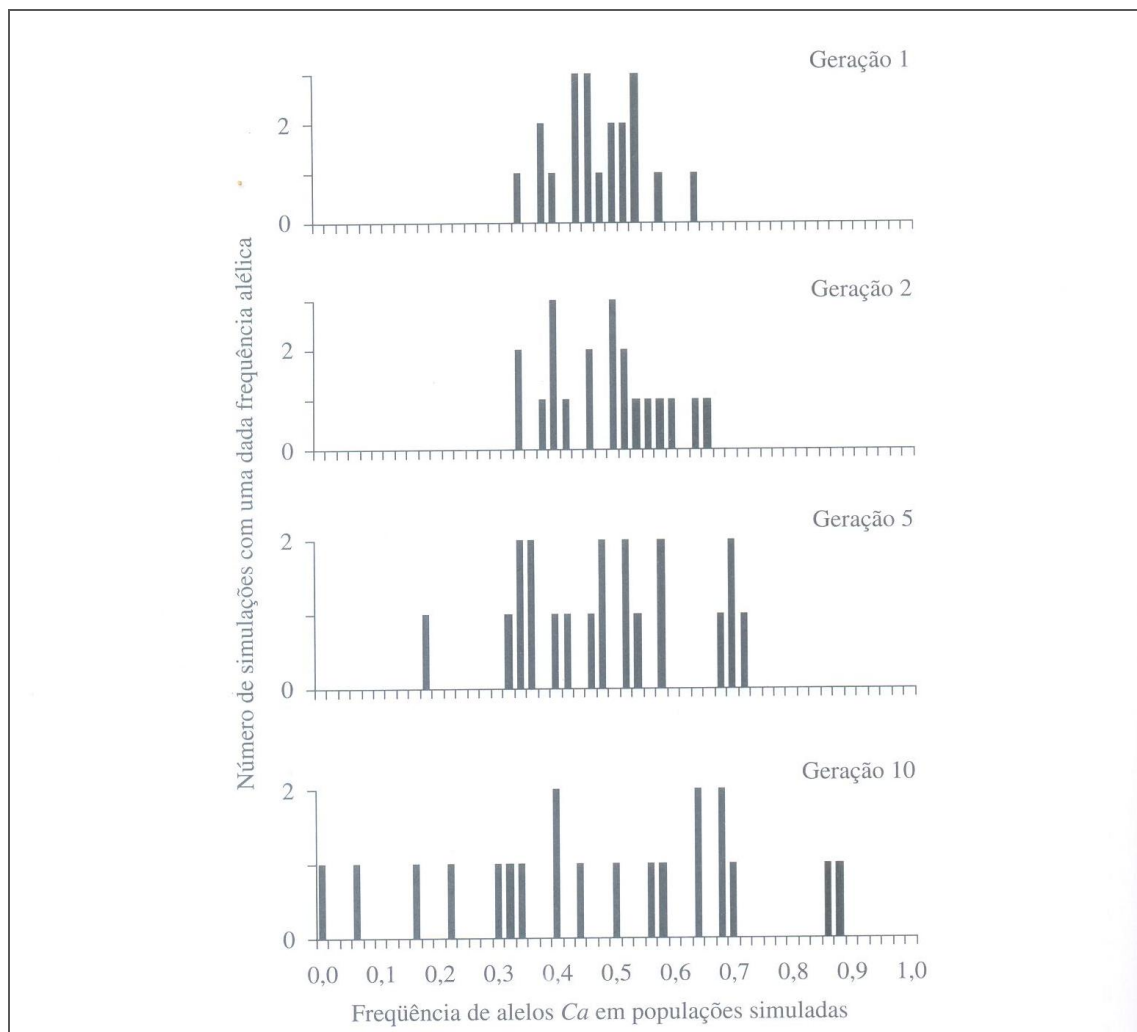


Figura 4- Resultado de simulação de vinte réplicas de uma população finita de tamanho 25 ($2N=50$) para dez gerações, partindo de um conjunto gênico inicial com $p=0,5$. A distribuição das frequências alélicas é mostrada após 1, 2, 5, e 10 gerações de deriva genética. Templeton, 2011.

O tamanho populacional reduzido pode ainda apresentar outros riscos. Em longo prazo, pode haver um aumento da endogamia, decorrente da maior probabilidade de autofecundação e acasalamento entre indivíduos aparentados (Kageyama e Gandara, 1998). Em populações pequenas, a endogamia se torna inevitável e quanto maiores os níveis de parentesco, maior será o grau de endogamia. Um dos maiores problemas é o aumento da probabilidade de se gerar genótipos homozigotos de alelos letais, semi-letais ou deletérios idênticos por descendência. Na maioria das espécies florestais, existe uma frequência considerável de alelos recessivos de efeito deletério e letais que, quando combinados em homozigose resultam numa baixa viabilidade de sobrevivência e reprodução (SHIMIZU, 2007). Com a ocorrência da endogamia há uma redução na heterozigosidade, redução/perda do vigor de reprodução (depressão endogâmica) e aumento dos riscos de extinção. Da mesma forma, a endogamia é acumulada com o tempo e mais evidenciada em pequenas populações (Figura 5).

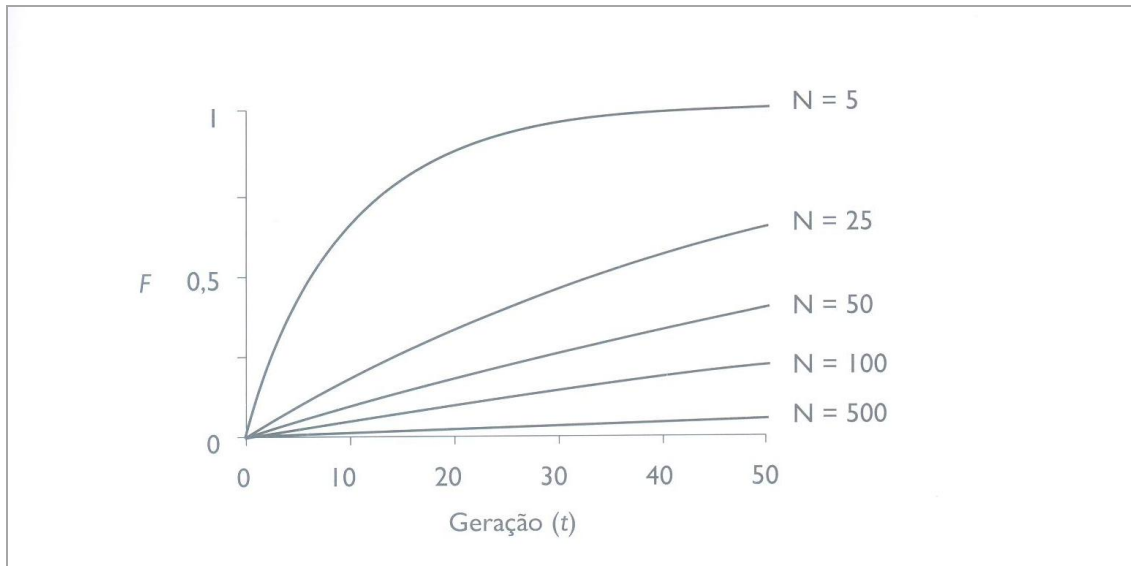


Figura 5- Aumento do coeficiente de endogamia F em função do tempo em populações finitas de diferentes tamanhos (N). Frankham, 2008.

3.3. Fluxo gênico

Ao partir da premissa que uma espécie se encontra em isolamento, se assume que todos os indivíduos que contribuem para a próxima geração vêm da mesma população sem nenhuma contribuição de indivíduos de outra população. Embora a maioria dos cruzamentos possa ocorrer dentro da mesma população local existe a possibilidade de ocorrer troca gênica com indivíduos de populações distintas, o que é caracterizado como fluxo gênico. (TEMPLETON, 2011).

O fluxo gênico em populações de plantas pode ocorrer através da dispersão do pólen e de semente (MARTINS, 1987). Para a espécie *Araucaria angustifolia* a polinização é feita pelo vento e os principais autores da dispersão são aves e roedores tais como a gralha azul (*Cyanocorax chrysops*), o papagaio do peito roxo (*Amazona vinacea*), a cutia (*Dasyprocta azarae*), o rato-do-mato (*Oryzomys ratticeps*), a paca (*Agouti paca*), o ouriço (*Coendu villosus*) e o esquilo brasileiro (*Sciurus aestuans*) (CARVALHO, 2003). Junto à diminuição de áreas florestadas, a fragmentação pode interferir na dinâmica de dispersão do pólen e das sementes. A interrupção por áreas não florestadas pode acarretar na defaunação, truncando assim, a curva de dispersão de sementes próxima à planta materna, o que diminui o fluxo gênico entre populações e, ainda, dificulta a dispersão de pólen devido à grande distância entre os fragmentos (JORDANO, *et al.*,2006).

A existência de fluxo gênico entre populações, dessa forma, faz-se de grande importância para a sustentabilidade da espécie. Com a ocorrência de fluxo gênico, novos alelos podem ser introduzidos dentro da população e a diferença nas frequências alélicas entre as populações locais, dessa forma, se tornará menor. Conseqüentemente serão diminuídas a variabilidade genética entre as populações locais e a variabilidade genética em uma população aumentará. Dessa forma, os efeitos do fluxo gênico na variabilidade genética intra e interespecífica tem efeito contrário aos da deriva genética (TEMPLETON, 2001). O fluxo gênico, dessa forma, atua como um fator

evolutivo responsável pela homogeneização das populações, restringindo os efeitos da deriva genética e seleção (SEOANE *et al.*, 2000).

3.4. Marcadores Microssatélites

A genética de populações lida com a distribuição e manutenção da variação genética no espaço e no tempo. Certas técnicas permitem medir variações e trazer informações, como as de diversidade e de estrutura genética dessas populações, por exemplo. Essas técnicas são baseadas no uso de marcadores genéticos que se caracteriza por serem capazes de identificar diferenças entre dois ou mais indivíduos ou organismos. Do ponto de vista molecular, um marcador genético (ou loco marcador) serve para identificar um local ou uma região de um cromossomo, e se caracteriza por ser capaz de identificar entre dois ou mais indivíduos ou organismos. Para ser eficaz, um marcador genético deve ser capaz de identificar altos níveis de polimorfismo, apresentar estabilidade em diferentes ambientes, detectar grande número de locos não ligados (NODARI, *et al.*, 2008; TEMPLETON, 2011).

Uma das técnicas amplamente utilizada se baseia na análise de repetições curtas em *tandem* (*short tandem repeats*). Tais repetições são denominadas de microssatélites, também conhecidos por SSR (simple sequence repeats) ou STR (short tandem repeats), e são regiões normalmente não codificantes de DNA repetitivo, compostas por curtos motivos de 1 a 6 nucleotídeos (Oliveira *et al.*, 2006). Dessa forma, cada região genômica que contenha um determinado número de repetições de uma destas sequências, constitui-se num loco genético altamente variável entre indivíduos e multialélico, portanto, altamente informativo (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Podem ser aplicados para diversas finalidades, como, por exemplo, mapeamento genético, análises populacionais diagnóstico de doenças, investigações forense, estudos ecológicos, análise de paternidade.

Porém, existem algumas limitações desses marcadores que devem ser consideradas nos estudos de genética de populações. Uma delas se refere a alta taxa de mutação em microssatélites, que é muito maior do que no restante do genoma (Oliveira *et al.*, 2006). A explicação mais aceita para a mutação dos locos microssatélites é a de “slippage” da DNA polimerase (Li *et al.*, 2002), ou seja, erros durante a replicação do DNA. Nesse processo, quando na reassociação das fitas podem ocorrer erros de posicionamento, levando a uma adição no número de repetições, se o erro ocorreu na fita complementar, ou a uma deleção, caso o erro ocorra na fita molde (Oliveira *et al.*, 2006). Dessa forma, alelos de locos microssatélites com o mesmo número de repetições não necessariamente possuem um ancestral comum, isto é, podem ser idênticos por simples acaso (homoplasia). A homoplasia de microssatélites pode causar distorções nas estimativas a respeito da conectividade entre populações e espécies (fluxo gênico, filogenias) (Estoup *et al.*, 2002). Além disso, apesar de que a maioria dos locos microssatélites se encontrarem em regiões não-codificadoras sendo seletivamente neutros, uma boa parte podem estar em regiões codificadoras ou regulatórias, podem estar envolvidos na organização da cromatina, regulação de processos metabólicos do DNA e regulação da expressão de alguns genes (Li *et al.*, 2002)

Microssatélites estão presentes em genomas eucariotos e procariotos. Porém, a frequência de microssatélites e os tipos de repetição variam entre táxons (Oliveira *et al.*, 2006). Dessa forma, para a utilização de marcadores microssatélites é necessário o desenvolvimento de marcadores específicos para cada gênero/espécie, já que os iniciadores devem anelar nas regiões que flanqueiam as sequências repetidas. Para Araucariaceae, a primeira descrição de microssatélites em foi publicada por Scott *et al.* (2003), onde foram desenvolvidos marcadores para a espécie *Araucaria cunninghamii*. Em sequência, Salgueiro *et al.* (2005) e Schmidt *et al.* (2007) desenvolveram SSR específicos para *A. angustifolia* e *A. araucana*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Caracterizar a diversidade de uma população de *Araucaria angustifolia* visando dar suporte para a elaboração de estratégias e modelos de conservação da espécie.

4.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar a diversidade genética dos indivíduos adultos da população existente na região do Campo dos Padres (Urubici SC), utilizando marcadores microssatélites;
- Caracterizar a diversidade genética dos indivíduos jovens da população existente na região do Campo dos Padres (Urubici SC), com uso de marcadores microssatélites;
- Obter informações relativas às possíveis taxas de fluxo gênico, endogamia e deriva genética, oriundos da fragmentação populacional;
- Conhecer e aplicar técnicas de extração e quantificação de DNA, bem como de genotipagem por meio de marcadores SSR.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Área de Estudo

A região do Campo dos Padres está situada na borda oriental do Planalto Catarinense numa faixa de Campos de Altitude que pertence aos municípios de Urubici, Bom Retiro, Alfredo Wagner, Anitápolis, Santa Rosa de Lima, Rio

Fortuna e Grão Pará. A área, de aproximadamente 63.000 hectares, está inserida nas abrangências da Serra Geral, o que a faz um importante elemento geográfico, atuando como divisor de águas (vertente Atlântica e vertente do interior). Nessa região se encontram nascentes de importantes rios de Santa Catarina (exemplo do Rio Canoas) e os picos mais altos do estado: Morro Bela Vista do Guizoni (1823m), Morro da Boa Vista (1827m), Morro do Campo dos Padres (1790m) (MMA, 2006).

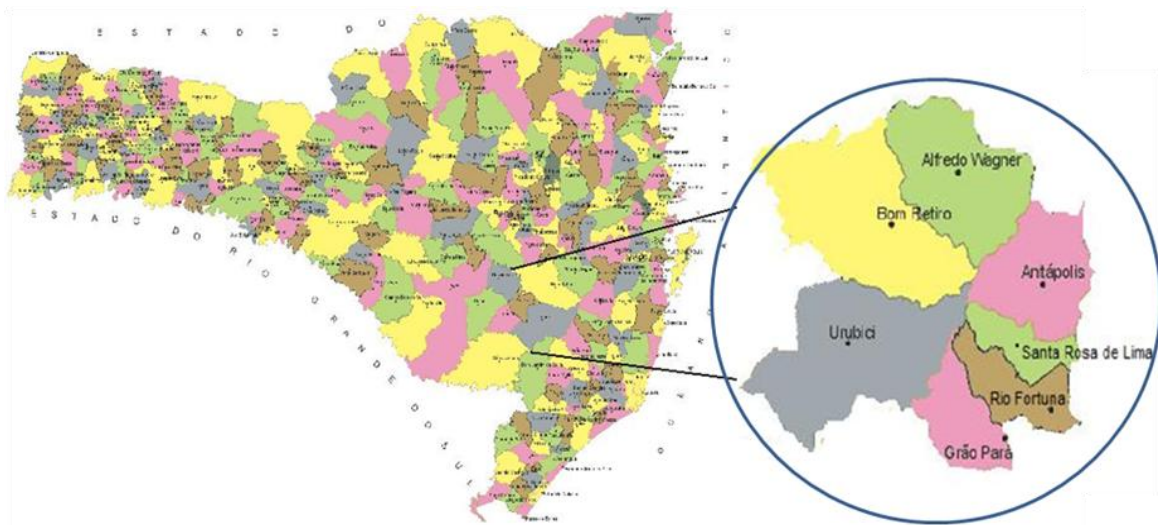


Figura 6- Mapa do estado de Santa Catarina, com destaque dos municípios de abrangência do Campo dos Padres. Alex Zechini, 2010.

Na região predominam solos rasos com comuns afloramentos do material de origem e ocorrência de solos orgânicos-hidromórficos juntos as nascentes e turfeiras (GOMES, 2009). Segundo a EMBRAPA (2004), a área possui um relevo fortemente ondulado com presença de pedras com substrato oriundo de rochas efusivas da Formação Serra Geral. Os solos possuem pequena espessura e baixa fertilidade destacando as classes dos Cambissolos, Neossolos Litólicos e Argissolos.

Para o período de 2002 a 2008, as estações meteorológicas da CIDASC localizadas no centro dos municípios de Bom Retiro e Urubici, indicaram,

respectivamente, as temperaturas: média de 15,7 e 15,4°C, mínima de -5,2 e - 5,3°C e máxima de 34,2°C. Neste mesmo período a precipitação média anual foi de 1.511 mm para Bom Retiro e, 1.384 mm para Urubici (GOMES, 2009).

A região comporta um mosaico vegetacional onde se inserem os Campos de Altitude. Segundo Klein (1978), no mapa fitogeográfico do Estado de Santa Catarina, onde ele descreve cobertura vegetal desse estado, a área comporta as seguintes fisionomias:

Floresta de Araucária da Bacia Pelotas-Canoas: constituída de pinhais densos, agrupados em manchas, muitas vezes interrompidas pelos campos. As suas maiores concentrações se encontram ao longo dos grandes rios, vales e encostas, enquanto nos terrenos ondulados predominam os campos e os capões;

Campos de Altitude na borda oriental do Planalto Catarinense: associados às matilhas nebulares que cobrem grande parte da crista da Serra Geral e Serra do Mar. Nestes campos, as ervas pertencentes às famílias Poaceae, Cyperaceae, Xyridaceae, Asteraceae e Verbenaceae desempenham papel preponderante. O aparecimento de turfeiras não é raro, formadas pelos musgos, onde predomina o gênero *Sphagnum*.

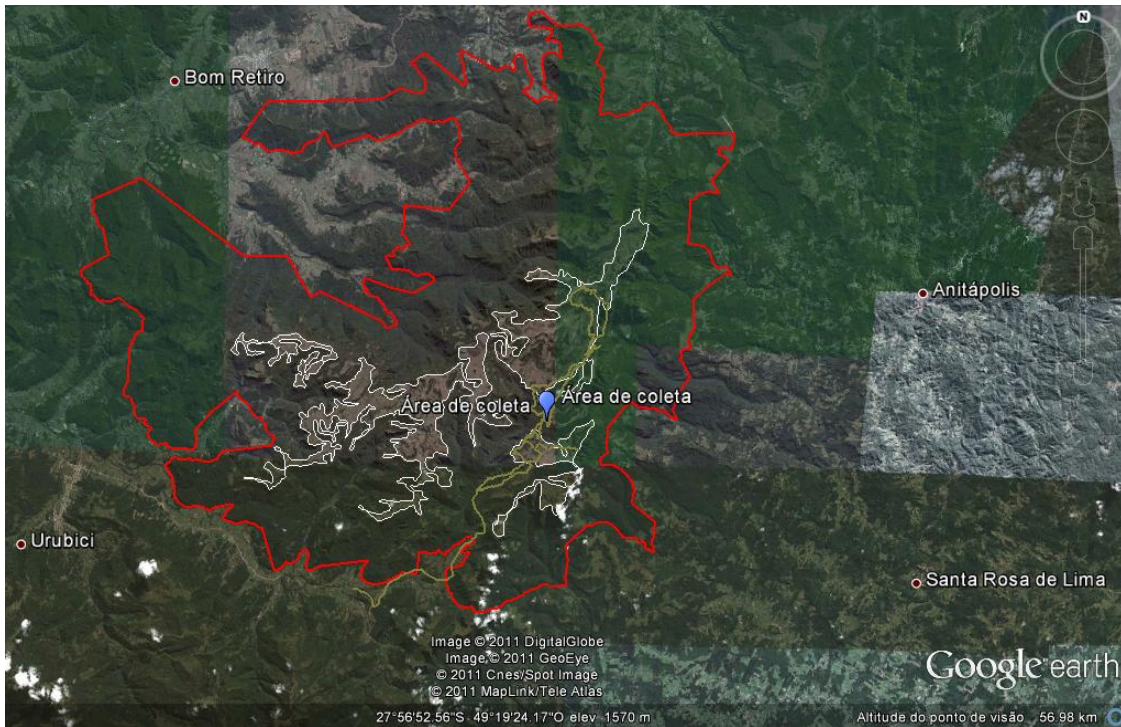


Figura 7- Imagem de satélite da área de limites das Abrangências do Campo dos Padres e delimitação das áreas de coleta das amostras. NPFT-UFSC,2011.

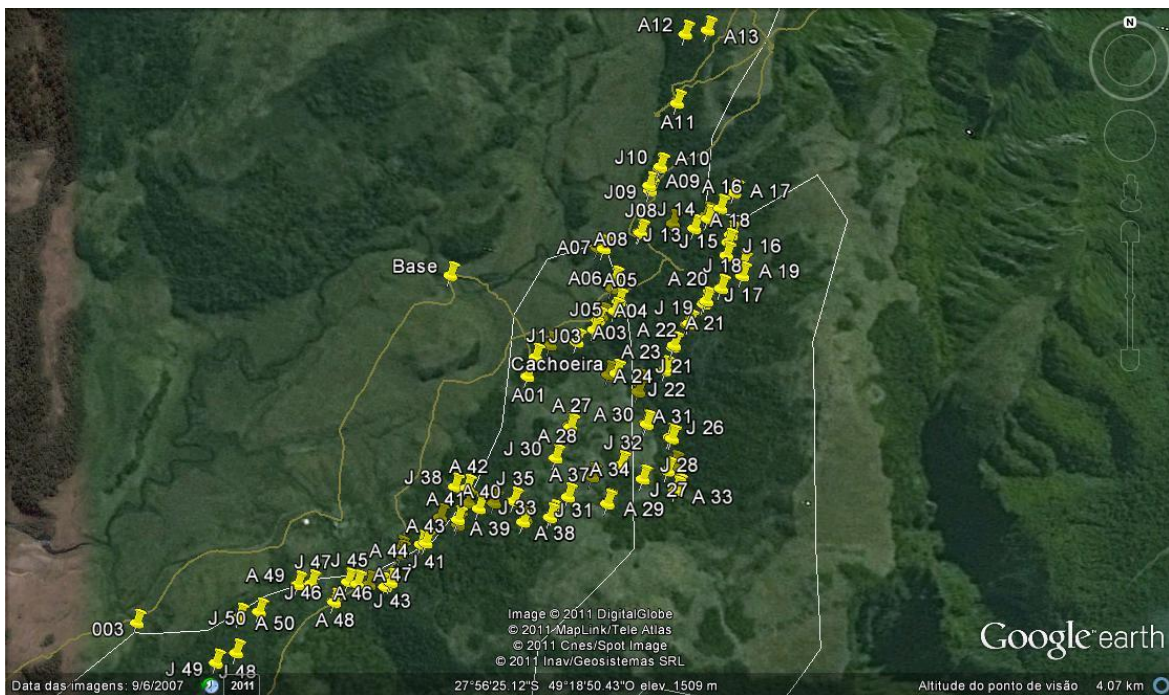


Figura 8- Imagem de satélite da área de coleta das amostras com os respectivos pontos de coleta para cada amostra (indivíduos jovens e adultos). NPFT-UFSC,2011.

5.2. Coleta das Amostras

Foram coletados o total de 60 indivíduos jovens e 60 indivíduos adultos, respeitando uma distância mínima de 50m entre os indivíduos. Considerou-se adultos plantas com DAP (diâmetro a altura do peito-1,3m) igual ou superior a 20 cm e jovens plantas com altura até 3,0 m.

A amostragem foi feita coletando-se um ramo dos indivíduos selecionados. Para auxiliar a coleta das amostras, utilizou-se estilingues em função do porte elevado de algumas plantas. Após a coleta, as folhas (acículas) foram acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados e mantidos sob baixa temperatura, para evitar a degradação do material. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Genético Vegetal (LFDGV) da Universidade Federal de Santa Catarina onde ficaram armazenadas sob refrigeração até o momento da extração de DNA.

5.3. Extração de DNA

O procedimento utilizado para a extração do DNA da folha (acículas) 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, as amostras foram acondicionadas em freezer -20°C.

5.4. Quantificação e Diluição das Amostras

Posteriormente foi feita a quantificação de cada amostra utilizando-se o espectrofotômetro *NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)*. Cada amostra foi quantificada e novamente as amostras foram acondicionadas em freezer -20°C.

As amostras foram, então, diluídas, utilizando como base os dados da quantificação. Todas as amostras foram padronizadas a uma concentração de 10 ng/μl.

5.5. Padronização das Amostras

Da mesma forma que nas amostras de DNA, também se realizou a diluição dos iniciadores, deixando-os a uma concentração de 100μM. A solução trabalho foi criada a partir dos primers diluídos, e foram padronizados a uma concentração de 10μM.

Para a padronização das amostras se realizou, primeiramente, amplificação exponencial de fragmentos gênicos de interesse contidos na amostra através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram utilizados para a realização desse trabalho três locos microssatélites de acordo com a tabela 1.

Tabela 1 - Locos microssatélites nucleares, suas sequências de amplitude alélica esperada (em pares de base, pb), a sequência dos iniciadores e os respectivos autores que os desenvolveram.

Loco	Motivo	Sequência (5' para 3')	Tamanho esperado (pb)	Referência
Aang01	F	(CT) ₂₂ TGACGGGTTCACTCCTACCT	202 - 252	Schmidt <i>et al.</i> 2007
	R	TAGGAACCCCATTCATTTG		
Ag20	F	(GA) ₁₂ ACTAGGAATGGATGTTGGTG	256 - 270	Salgueiro <i>et al.</i> 2005
	R	AAGGTATGGCATCATGTCTC		
Ag56	F	(TC) ₁₁ CCACACTCAAACAATAGCAGTTC	166 - 176	Salgueiro <i>et al.</i> 2005
	R	TGAAGTTGGCCAATCAGATAC		

Para a amplificação do iniciador Aang01, o seguinte conjunto de ciclos e temperaturas foi utilizado: 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 55 °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 dos iniciadores Ag20 e Ag56, utilizou-se de um programa *touchdown* PCR (DON, *et al.*, 1991) com o seguinte conjunto de temperaturas: 94°C por 2 min; duas vezes o ciclo de 94° por 1 min, 57°C por 1 min (-1°C a cada ciclo), 72°C por 2 min, repetido 9 vezes. Em seguida 94°C por 1 min, 48°C por 1 min, 72°C por 2 min, repetido 12 vezes. Para finalização da reação, utilizou-se a temperatura de 72°C por 20 min. A reação da PCR foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research).

Para a amplificação dos iniciadores foi utilizado o seguinte protocolo de mix de reagentes (para um total de 12 µl de reação): 1x Taq *buffer* (Fermentas), 0,25 U de taq DNA polimerase (Fermentas), 0,1 µM de cada iniciador (F e R), 1,0 mM de cada dNTP (Fermentas), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio (fermentas) e 10 ng de DNA.

5.6. Corrida Eletroforética

Para a visualização do produto da PCR para testar as temperaturas de anelamento (T_a °C) de cada um dos três locos microssatélites, utilizou-se a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para o preparo do gel a solução padrão foi de 3,0 g de agarose em 200 ml de tampão TBE (tris-borato-EDTA) 1x (tris-Cl 20 mM, ácido bórico 2M, EDTA). A mistura preparada foi dissolvida e aquecida em forno microondas. Após o aquecimento e diluição, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente e despejada em cuba de acrílico horizontal, com o uso de pentes de acrílico para a formação de poços para a aplicação das amostras. Em sequência à polimerização do gel, adicionou-se o gel sob imersão em tampão TBE 1x. Em cada poço, aplicou-se 5 µL de de uma solução com 12 µL de amostra mais 4 µL de corante GelRed (Biotium).

O princípio da eletroforese se baseia na migração por repulsão do pólo negativo para o pólo positivo. Ocorre, dessa forma, separação de moléculas em função de suas cargas elétricas de seus pesos moleculares e de suas conformações (NODARI et al, 2008). Os fragmentos de DNA por serem eletronegativos migram para o pólo positivo. Para a identificação do peso molecular das amostras foi utilizado uma solução de fragmentos de tamanho conhecido de 100 pb DNA Ladder (Introgen). Na cuba eletroforética, as corridas foram realizadas a uma corrente elétrica de 100 volts, e após aproximadamente 45 minutos de corrida eletroforética e o resultado visualizado por transiluminação com luz ultravioleta.

5.7. Genotipagem

A genotipagem e a leitura dos alelos foram feitas através da revelação dos microssatélites em gel de poliacrilamida 4%. Para a confecção do gel foram utilizados 60 ml de acrilamida 4% 1x (Uréia 7M, TBE 0,5X, Bis-acrilamida 4%, água mili-Q deionizada), 40 µL TEMED e 400 µl de APS (persulfato de amônio 10%). (Sambrook, 1989).

Para revelação das bandas amplificadas foi realizada uma corrida de eletroforese na voltagem de 1800 V e potência constante de 70 W, com aproximadamente 50 minutos corrida. Após a corrida, o gel foi fixado em álcool etílico 10% e ácido acético 1% durante 10 min, pré-tratado com ácido nítrico 1,5% durante 3 min, corado com nitrato de prata 0,2% durante 30 min, e revelado em solução de carbonato de sódio 3,0% contendo 0,54 ml de formaldeído, de acordo com a metodologia empregada por Creste *et al.* (2001), e deixado secar a temperatura ambiente por 24 horas. Após isso, o gel foi avaliado com auxílio de transluminador de luz branca.

Os produtos amplificados das reações de PCR foram avaliados em gel desnaturante de poliacrilamida a 4%. Nas linhas de extremidade e na metade de cada gel foi utilizado como marcador, uma solução de fragmentos de tamanho conhecido, de 10 bp DNA Ladder (Invitrogen).

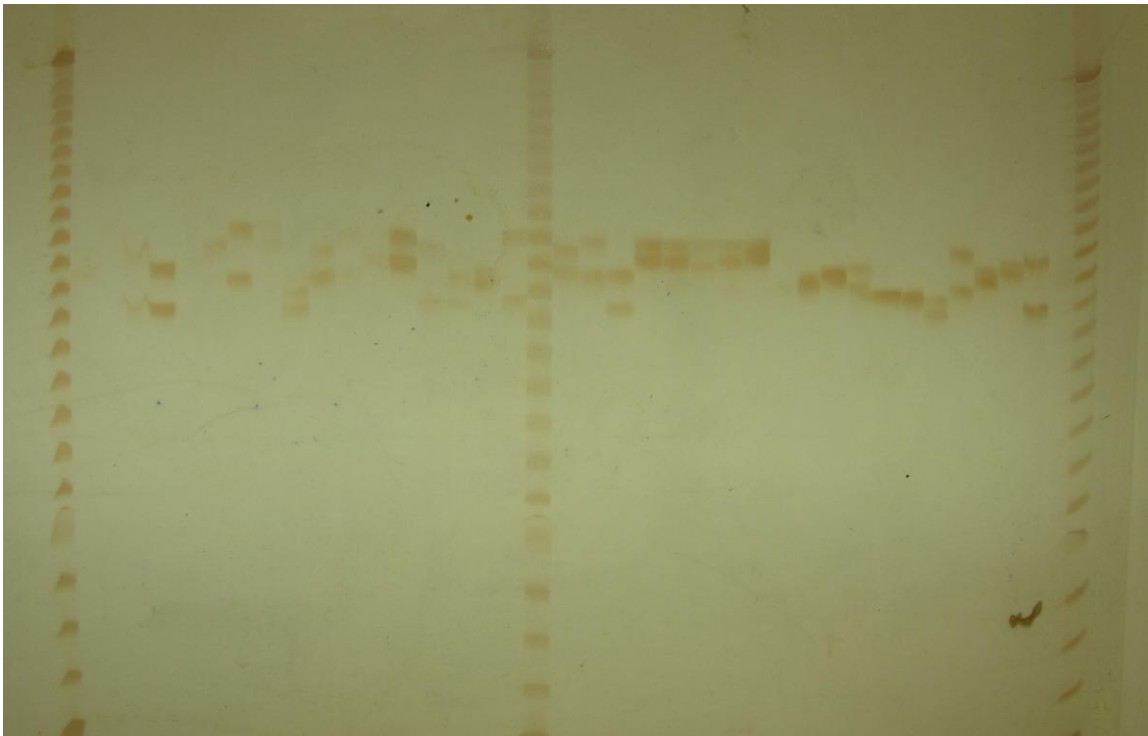


Figura 9- Gel de acrilamida 4% com indivíduos de *Araucaria angustifolia* amplificados. LFDGV, 2011.

5.8. Análise de Diversidade Genética

A partir dos genótipos observados no gel foram calculadas, para os indivíduos jovens e para os indivíduos adultos, as frequências alélicas e os índices de diversidade: número total de alelos (n° alelos), número médio de alelos efetivos (A_e), heterozigotidade observada (H_o) e esperada (H_e), e índice de fixação(f). As frequências alélicas foram obtidas através do programa Fstat (Goudet, 2002). Os índices de diversidade (n° alelos, A_e , H_e , H_o e f) foram obtidos através do programa GDA (Lewis & Zaykin, 2002).

O número de alelos foi obtido através do somatório de todos os alelos encontrados na população. A média de alelos efetivos (A_e) foi obtida com a divisão do total de alelos da população pelo total de locos da mesma.

A heterozigosidade média observada (H_O) foi obtida pela média entre os locos do número de indivíduos heterozigotos dividido pelo número de indivíduos amostrados.

$$H_O = [(\sum P_{ij}) / n] / l$$

Onde:

$(\sum P_{ij})$ = somatório dos heterozigotos ($i \neq j$);

n = número de indivíduos total;

l = número de locos.

A heterozigosidade esperada (H_E) foi obtida empregando-se o estimador não viesado de Nei (1978):

$$H_E = 2n(1 - \sum \hat{p}_i^2) / (2n - 1)$$

Sendo:

\hat{p}_i = frequência do alelo i ;

n = número de indivíduos amostrados.

Os índices de fixação (f) foram estimados pelos desvios da heterozigosidade esperada, sendo:

$$f = (H_E - H_O) / H_E$$

A significância dos índices de fixação foi obtida através de intervalo de confiança (95%) através do programa GDA (Lewis & Zaykin, 2002).

O tamanho efetivo populacional foi estimado com base na fórmula

$N_e = n / (1 + f)$ (Li, 1976), onde:

n = número de indivíduos da população;

f = índice de fixação da população.

Os resultados de N_e para valores de referência de 50 (Frankel & Soulé, 1981), 500 (Franklin & Frankham, 1998) e 1.000 (Lynch & Lande, 1998) foram obtidos pela multiplicação de n / N_e pelo valor de referência em questão.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Aplicação da Técnica

As atividades relativas à análise da diversidade genética foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal- LFDGV/CCA/UFSC.

Parte da pesquisa foi iniciada no mês de dezembro de 2010, com a extração de DNA das amostras. No mês de fevereiro de 2011 foi feita a quantificação das amostras que ficaram armazenadas a -20°C até o início do estágio.

Os processos realizados durante a realização do estágio abrangeram a realização das diluições das amostras e dos iniciadores; padronização das temperaturas de anelamento dos iniciadores através da realização dos processos de PCR e eletroforese em gel de agarose; eletroforese no gel de poliacrilamida para a genotipagem dos indivíduos e análise dos géis para obtenção das informações de diversidade genética dos indivíduos genotipados.

Durante todo o período de estágio dentro do laboratório foi possível acompanhar os trabalhos de outros estudantes de graduação e pós-graduação, destacando entre eles as rotinas de preparação de reações de PCR, de géis de agarose e poliacrilamida (assim como suas análises e interpretações), que serviram de base para a realização desse trabalho.

O uso de marcadores microssatélites para a obtenção de informações de diversidade genética, foco desse trabalho, assim como para outros fins, exige a realização que muitos processos minuciosos. Para isso, é preciso comprometimento, perseverança e atenção nas etapas de ajuste de protocolos e realização das etapas rotineiras exigidas pelo processo, para alcance do sucesso na obtenção das informações esperadas. Além disso, muitas das técnicas demandam tempo e exigem o uso de equipamentos para sua realização. Dessa forma, as atividades ficam condicionadas também à rotina do laboratório, respeitando a necessidade de todos os trabalhos concomitantes.

Durante a realização do estágio, que possui um curto tempo de duração, quando se tem como referência o exposto no parágrafo anterior, algumas etapas foram comprometidas. Inicialmente a pretensão era utilizar nove locos microssatélites para uma maior consistência dos dados. Porém, devido o curto tempo e dificuldade de ajuste de protocolo, a utilização ficou restrita a três locos microssatélites para a análise da diversidade genética. O principal empecilho foi encontrado na padronização das temperaturas de anelamento, que deve ser testada e ter conseqüente anelamento em cada um dos iniciadores utilizados. Além disso, para a genotipagem foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida. Essa é uma técnica que também tem a exigência de tempo e dificuldade de realização, além de ser dependente do sucesso de atividades anteriores (padronização, PCR, desnaturação). Outro item de relevância é nessa etapa são as falhas de amostras que freqüentemente são observadas no gel, o que exige que repetições sejam feitas, demandando maior tempo para a obtenção dos resultados. Mesmo assim, todas as atividades realizadas no laboratório durante o estágio tiveram um saldo muito positivo, proporcionaram grande aprendizado e serviram para o contato e aplicação com as técnicas, além de proporcionarem o conhecimento das verdadeiras dificuldades e exigência das técnicas aplicadas nesse trabalho.

6.2. Frequências Alélicas

A tabela 2 traz as frequências alélicas nos indivíduos jovens e adultos nos os três locos microssatélites analisados.

Tabela 2- Frequências alélicas nos três locos microssatélites para os indivíduos jovens e adultos de uma populações de *Araucaria angustifolia* de Campo dos Padres- Urubici (SC).

Aang 01			Ag 20			Ag 56		
alelos	adultos	jovens	alelos	adultos	jovens	alelos	adultos	jovens
194	0.009	0.000	234	0.009	0.000	144	0.027	0.036
200	0.017	0.009	236	0.000	0.010	146	0.191	0.027
202	0.000	0.009	238	0.000	0.069	148	0.127	0.054
204	0.009	0.009	240	0.027	0.020	150	0.218	0.054
206	0.060	0.019	242	0.063	0.029	152	0.255	0.054
208	0.034	0.046	244	0.143	0.069	154	0.100	0.018
210	0.095	0.065	246	0.152	0.098	156	0.045	0.054
212	0.095	0.028	248	0.063	0.088	158	0.018	0.205
214	0.095	0.074	250	0.080	0.118	160	0.009	0.223
216	0.103	0.028	252	0.071	0.108	162	0.009	0.080
218	0.078	0.074	254	0.071	0.176	164	0.000	0.196
220	0.103	0.148	256	0.116	0.078			
222	0.103	0.056	258	0.027	0.010			
224	0.078	0.111	260	0.054	0.039			
226	0.026	0.093	262	0.098	0.039			
228	0.009	0.065	264	0.009	0.000			
230	0.026	0.056	266	0.018	0.029			
232	0.043	0.056	270	0.000	0.020			
234	0.009	0.037						
236	0.000	0.009						
238	0.009	0.009						

A partir da análise das frequências alélicas (Tabela 2) é possível notar que na maioria dos locos (Aang01, Ag23) ocorreu a presença de alelos exclusivos aos adultos. Em todos os três locos ocorreram alelos exclusivos aos jovens. A frequência dos alelos exclusivos foi variável. Em sua maioria os alelos apresentaram baixa frequência, porém, alguns apresentaram uma frequência mais alta como o alelo 152 do loco Ag56, que apresentou cerca de 0,25 de frequência nos indivíduos adultos.

A presença de alelos exclusivos aos adultos pode indicar que eles podem ter participado da reprodução, mas seus descendentes (e seus alelos por consequência) não foram representados dentro da amostra de jovens desse trabalho. Outra hipótese é que nem todos estes indivíduos participaram do processo reprodutivo e por consequência deixaram descendentes. Ainda, como efeito da fragmentação e a formação de pequenas populações, alguns alelos, principalmente os raros podem não ter sido transmitidos devido os efeitos da deriva genética (FRANKHAM, 2008). A presença de alelos nos jovens pode ser indicativa da possível ocorrência de imigração de sementes ou pólen de outras populações ou oriundos de indivíduos adultos não capturados na amostragem desse trabalho.

A população de *A. angustifolia* analisada apresentou um alto nível de polimorfismo e diversidade genética para os três locos microssatélites analisados. Do total de três locos em 117 indivíduos foram observados 50 alelos, indicando um alto nível de polimorfismo. O número de alelos por loco variou de 11 alelos (Ag 56) a 21 (Aang 01), com uma média de 16,67 alelos por loco. Sant' Anna (2011) na caracterização de uma população natural de *A. angustifolia*, utilizando três locos coincidentes com esse trabalho (Aang01, Ag20, Ag56) encontrou um número de alelos de 22, 8 e 6, respectivamente. Os valores encontrados são nesse trabalho (21, 18 e 11) valores diferentes para os locos Ag20 e Ag56 apresentaram valores que foram maiores nesse trabalho enquanto o valor para o loco Aang01 foi similar ao trabalho de Sant'Anna. Possivelmente os valores encontrados sejam devido ao fato de se tratarem de populações diferentes, portanto, com efeito de deriva, fluxo gênico diferenciados. Além disso, a amostragem e as técnicas utilizadas nos trabalhos também são diferentes, o que justifica os valores encontrados. Stefenon *et al.* (2007), utilizando dois locos microssatélites coincidentes com este trabalho (Aang01, Ag20) encontram um número de alelos para estes locos de 21, 18, respectivamente, num total de seis populações naturais de *A. angustifolia*, valores iguais aos encontrados nesse trabalho. Porém, especificamente para a população localizada em SC, o número de alelos foi de 13, 11 alelos para os

respectivos locos. 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 117 indivíduos de *A.angustifolia*.

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. O loco Ag56 também foi utilizados por Patreze & Tsai (2010). Estes autores detectaram 9 alelos, ou seja, encontraram menos 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 dois locos coincidentes com este trabalho (Ag20 e Ag 56). Os autores encontraram 8 e 6 alelos por loco respectivamente.

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 dois são coincidentes ao presente estudo (Ag20 e Ag56). Conforme os autores, os locos apresentaram os números de alelos 12 e 13 respectivamente.

6.3. Índices de Diversidade Genética

A tabela 3 traz os Índices de diversidade e índice de fixação para os três locos analisados.

Tabela 3- Índices de diversidade e índice de fixação para os três locos analisados para a população de *A.angustifolia* Campo dos Padres-Urubici (SC).

Locos	<i>n</i>	Nº alelos	A_e	H_E	H_o	<i>f</i>
Aang01	112	21	19,50	0,93	0,80	0,14
Ag20	107	18	15,50	0,91	0,65	0,29
Ag56	111	11	10,50	0,84	0,70	0,17
Média		16,67	15,17	0,90	0,72	0,20
Total	117	50				
S	2,65	5,13	4,51	0,05	0,08	0,08

Nº alelos = número total de alelos; *n* = número de amostras; A_p = alelos por loco polimórfico; H_E = heterozigiosidade média esperada; H_o = heterozigiosidade média observada; *f* = índice de fixação; S = desvio padrão.

A heterozigiosidade observada (H_o) variou de 0,65(Ag20) a 0,80 (Aang01), com média de 0,72. A heterozigiosidade esperada (H_E) foi maior em todos os locos, variando de 0,84(Ag56) a 0,93(Aang01), com média de 0,90. Em outros trabalhos utilizando marcadores microssatélites em populações de *A. angustifolia*, obtiveram valores de H_e menores que o encontrado no presente estudo ($H_e=0,90$). Sant'Anna (2011) em uma população com 513 indivíduos em Caçador-SC obteve o valor $H_e=0,64$. Patreze & Tsai (2010) em uma população em Campos do Jordão de 105 indivíduos, obtiveram $H_e=0,74$ utilizando seis locos SSR. Stefenon *et al.* (2007) encontraram $H_e=0,65$ para seis populações *A. angustifolia*, empregando cinco locos microssatélites. Bittencourt & Sebbenn (2008), utilizando oito locos SSR em uma floresta contínua no Paraná encontraram para uma população de 298 indivíduos da espécie $H_e=0,59$. Schmidt (2005), utilizando sete locos SSR encontrou $H_e=0,88$ para o total de 94 indivíduos da espécie no planalto serrano de Santa Catarina. Salgueiro *et al.* (2005) encontraram $H_e=0,34$ em uma amostra total de 60 indivíduos para três populações.

Outros trabalhos ainda avaliaram a diversidade genética em populações de *Araucaria angustifolia* utilizando marcadores isoenzimáticos. Apesar de ser também um marcador co-dominante como os marcadores SSR, os índices encontrados para diversidade genética tende a ser menor devido ao menor grau de polimorfismo dos marcadores isoenzimáticos em relação aos utilizados nesse trabalho. Zechini *et al.*(2011), encontraram um valor de $H_e=0,124$ para

31 populações naturais da espécie em Santa Catarina. Ferreira (2008) encontrou uma diversidade genética de $H_e=0,127$ para uma população da espécie na Floresta Nacional de Três Barras. Mantovani *et al.* (2006) em Campos do Jordão obteve $H_e=0,170$. Shimizu *et al.* (2000) encontraram $H_e=0,248$ para uma população no Parque Nacional do Iguaçu.

Os resultados encontrados nesse trabalho indicam a possível ocorrência de excesso de homozigotos na população, que acabam por diminuir a diversidade genética dentro da população afastando os valores de heterozigosidade dos valores esperados em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. É importante também que algumas ressalvas sejam feitas. A comparação entre populações de tamanhos diferentes é dificultada, pois o aumento no número de alelos tende a aumentar com o aumento do tamanho da amostra. A comparação entre diferentes marcadores também se torna dificultada, devido os níveis de polimorfismo diferentes, como já mencionado. Além disso, esse trabalho utilizou apenas três locos microssatélites, o que dificulta uma comparação consistente com os dados obtidos nos demais trabalhos, que empregaram entre 12 e 5 locos.

O valor encontrado para o índice de fixação (f) foi positivo em todos os locos, variando de 0,14 (Aang01) a 0,29 (Ag20), apresentando a média de 0,20 para os três locos. Alguns trabalhos estudando a com a mesma espécie encontraram valores variáveis para essa característica. Ferreira *et al.* (2008) (utilizando isoenzimas), obteve o valor de $f=0,40$, valor alto, caracterizando endogamia na população. Schmidt (2005) encontrou o valor de $f=0,30$, valor considerado muito alto. Nas 30 populações analisadas por Zechini *et al.* (2011) o índice médio foi de $f=0,245$, valor também considerado alto. Sant'Anna (2011) encontrou $f=0,125$, um valor considerado médio. Mantovani *et al.* (2006) (utilizando isoenzimas) na mesma população em Campos do Jordão obtiveram $f=0,006$, valores baixos nesses dois últimos trabalhos, descaracterizam a presença de endogamia nessa população.

Os valores de f encontrados nesse trabalho evidenciam que as frequências genóticas observadas desviam das frequências esperadas

segundos o equilíbrio de Hardy-Weinberg, e quanto maiores os valores de f encontrados, menos da diversidade potencial está sendo realizada. Além disso, o índice de fixação médio (f) foi igual a 0,2, valor elevado de fixação, o que caracteriza um possível excesso de indivíduos homozigotos. É importante, ainda, ressaltar que vários fatores podem ter influência sobre o índice de fixação. A região de ocorrência, seu estado de conservação o tipo de marcador utilizado são alguns desses fatores. Além disso, para esse trabalho em especial, o número de locos reduzido (3 locos) o que dificulta uma comparação consistente com os dados obtidos nos demais trabalhos, como já mencionado.

6.4. Índices de Diversidade Genética nas Gerações

A tabela 4 contém as informações relativas aos Índices de diversidade e índice de fixação dos indivíduos jovens e adultos para os três locos analisados na população.

Tabela 4- Índices de diversidade e índice de fixação dos indivíduos jovens e adultos para os três locos analisados para a população de *A.angustifolia* Campo dos Padres- Urubici (SC).

ADULTOS							JOVENS						
Locos	n	Nº alelos	A_e	H_E	H_o	f	Locos	n	Nº alelos	A_e	H_E	H_o	f
Aang01	58	19	19,00	0,93	0,81	0,13	Aang01	54	20	20,00	0,93	0,80	0,15
Ag20	56	15	15,00	0,91	0,66	0,28	Ag20	51	16	16,00	0,91	0,65	0,29
Ag56	55	10	10,00	0,83	0,71	0,15	Ag56	56	11	11,00	0,86	0,70	0,19
Média		14,67	14,67	0,89	0,73	0,18	Média		15,67	15,67	0,90	0,71	0,21
Total	59						Total	58					
S	1,53	4,51	4,51	0,05	0,08	0,08	S	2,52	4,51	4,51	0,04	0,08	0,08

Nº alelos = número total de alelos; n = número de amostras; A_p = alelos por loco polimórfico; H_E = heterozigosidade média esperada; H_o = heterozigosidade média observada; f = índice de fixação; S = desvio padrão.

Foram encontrados altos níveis de polimorfismo e diversidade genética para os três locos microssatélites analisados, tanto para os indivíduos jovens como para os adultos. Os jovens apresentaram um número maior de alelos

(47) em relação aos adultos (44), onde seis alelos foram exclusivos aos jovens e três aos adultos. Como já mencionado anteriormente, isso levanta a hipótese de que nem todos os indivíduos adultos, por deriva genética, passaram seus alelos ou deixaram descendentes na amostra coletada. A presença de alelo exclusivos nos jovens sugere que houve migração de pólen e /ou sementes oriundas de outra população ou de outros indivíduos adultos não amostrados.

A heterozigosidade esperada para os indivíduos jovens e adultos foi praticamente igual (~0,90). Porém, a heterozigosidade observada para os jovens foi também semelhante nos adultos (0,73) e nos jovens (0,71). O índice de fixação foi maior nos jovens (0,21) em relação aos adultos (0,18), ainda que a diferença tenha sido pouco expressiva. A obtenção desses índices sugere que haja cruzamento entre parentes e conseqüente endogamia nos jovens, que acaba por diminuir a heterozigosidade observada para essa classe. Além disso, a perda de heterozigosidade é cumulativa e a cada geração é esperada uma menor diversidade genética nos jovens comparada aos adultos (FRANKHAM, 2008), caso não haja mudança no tamanho dessa população e não exista a ocorrência de fluxo gênico com outras populações.

A pequena diferença encontrada entre as heterozigosidades observadas das populações de jovens e adultos pode também ser devido à diferença de gerações ser de provavelmente apenas uma geração. Mesmo os efeitos sendo cumulativos com o decorrer das gerações, grandes mudanças/ maiores diferenças serão observadas nas próximas gerações. Mesmo assim, esse declínio da diversidade já é uma evidência, ainda que incipiente, de que os futuros indivíduos adultos dessa população (agora representado pelos jovens) possam não ter diversidade suficiente para garantir a adaptação da população em longo prazo.

Alguns trabalhos também buscaram observar as diferenças entre indivíduos adultos e jovens. Sant'Anna (2011) obteve também valores menores de f nos adultos (0,096) em relação aos jovens (0,163). Seoane *et al.* (2005) estudando uma população de *E. edulis* obtiveram, da mesma forma, índice de fixação na geração jovem, seguido em relação as adultas. Gaiotto *et al.* (2001),

também com *E. edulis*, detectaram maiores indícios de endogamia na geração de indivíduos jovens.

Em alguns trabalhos, porém não foram encontradas diferenças significativas entre adultos e jovens. Bittencourt & Sebbenn (2009) comparam adultos e progênie de *A. angustifolia* não encontraram diferença significativa para o índice de diversidade genética entre as coortes. Conte (2004) estudou três gerações de *E. edulis* em quatro populações no Estado de Santa Catarina também não observou diferenças significativas no índice de fixação entre gerações. Como hipótese para esses resultados pode se atribuir o fato de que apenas uma geração é muito pouco para que sejam percebidos os efeitos de perda de diversidade e aumento da endogamia, com já mencionado.

6.5. Tamanho efetivo populacional (N_e)

Os resultados de N_e para valores de referência de 50 (Frankel & Soulé, 1981), 500 (Franklin & Frankham, 1998) e 1.000 (Lynch & Lande, 1998) para os adultos são apresentados na tabela a seguir.

Tabela 5- Tamanho efetivo populacional (N_e) para valores de referência de 50, 500 e 1.000

Pop.	n	F	N_e	n/N_e	N_e 50	N_e 500	N_e 1000
Adultos	59	0,18	50	1,18	59	590	1.180

n = número de indivíduos amostrados; f = índice de fixação.

O tamanho amostral para os adultos foi de 59 indivíduos (Tabela 5), entretanto o tamanho efetivo foi de 50 indivíduos, o que evidencia o efeito do índice de fixação na população. Quanto menor forem os valores de f , mais representativas são as amostras e maior será o tamanho efetivo. Da mesma forma, no cálculo dos valores de referência, quanto menor o f , menor o número de indivíduos necessários para alcançar o valor de referência.

O valor encontrado para o N_e50 (Frankel & Soulé, 1981) foi de 59 indivíduos, para o foi de 590 e para o $N_e1.000$ (Lynch & Lande, 1998) foi de 1180 indivíduos.

O valor encontrado para N_e50 (Frankel & Soulé, 1981) foi 59, o que sugere que em curto prazo a população amostrada não tem sua diversidade genética ameaçada, visto que a população de plantas adultas na região excede este valor.

Analisando, porém, para o valor de referência N_e500 (Franklin & Frankham, 1998), que se trata da conservação genética em médio prazo, foi encontrado o valor de 590 indivíduos. Esse valor sugere que a população amostrada, em médio prazo pode ter sua diversidade genética ameaçada, uma vez que a mesma foi alvo de intensa exploração madeireira no passado recente (segunda metade do século passado, principalmente).

A população amostrada possivelmente (devido a exploração sofrida no passado, associada a topografia local) não alcança o valor de referência $N_e1.000$ (Lynch & Lande, 1998) encontrado (1180). Dessa forma, em longo prazo essa população não teria condições de fornecer diversidade genética adequada para sua sustentabilidade.

Porém, é importante a ressalva de que esses indivíduos não são representados pelo censo da população. Dessa forma, a inferência de que só esses indivíduos poderiam representar os eventos reprodutivos do fragmento em que estão inseridos pode não ser uma informação consistente. Por isso, uma melhor observação da área, com informações de densidade/ha possibilitaria melhores inferências. Além disso, o valor de f é representado nesse trabalho pela análise de apenas três locos, o que pode estar interferindo na consistência dos dados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quanto aos dados, de acordo com os resultados obtidos, mesmo com a limitação da utilização de um número reduzido de micros satélites para uma análise consistente dos dados, pôde-se perceber uma tendência dos dados para o possível risco da população de *A. angustifolia* analisada. A presença de alelos exclusivos aos adultos pode ser indicio de um processo de deriva genética e acarretar no comprometimento da sustentabilidade da população. Porém, para melhor inferência dos dados, é necessária uma continuidade dos trabalhos nessa população, assim como de outras populações da espécie, que compilados com outros dados de estrutura, demografia, fenologia, proporcionarão a geração de conhecimentos para a elaboração de planos de conservação e domesticação da espécie.

Quanto à realização do estágio em si, todas as atividades desenvolvidas foram válidas e proporcionaram grande aprendizado e crescimento pessoal. Além da caracterização da diversidade genética da população de *A. angustifolia* realizada no LFDGV, no NPFT, o envolvimento com outras atividades contribuíram também para esse processo durante o desenvolvimento do estágio.

Houve o envolvimento efetivo com atividades desenvolvidas por graduandos, mestrandos e doutorandos e orientadores integrantes do Núcleo de Pesquisas em Florestas Tropicais (NPFT). Em maior escala, a participação nas atividades referentes ao *projeto Fundamentos para a Conservação da Araucária e Uso Sustentável do Pinhão*. Além disso, semanalmente, a participação nas reuniões do NPFT, com discussão de assuntos relacionados aos projetos de todos os estudantes, bem como temas de relevância para a ampliação de conhecimentos dentro do grupo, como discussão de textos, de artigos e apresentação de seminários.

Ainda como atividades complementares, houve durante o estágio a participação em alguns eventos. Em destaque estão a participação no 57°

Congressos Nacional de Genética, nos mês de setembro em Águas de Lindóia-SP, com apresentação de resumo relativo as atividades com *Araucaria angustifolia* desenvolvidas durante as atividades desenvolvidas durante a iniciação científica. Presença no Workshop do Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina, no mês de setembro em Florianópolis-SC, com a apresentação de resultados relativos ao levantamento socioambiental do projeto Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina. Participação também do 2º Workshop sobre a lista de espécies ameaçadas de extinção de Santa Catarina, no mês de outubro em Florianópolis-SC, onde foi discutida a elaboração da lista das espécies de conservação prioritária no estado. Ainda, no mês de outubro, apresentação de forma oral e na forma de pôster, no Seminário de Iniciação Científica – SIC/CNPq/UFSC, com trabalho relativo a atividades com *Araucaria angustifolia* desenvolvidas durante as atividades desenvolvidas durante a iniciação científica.

O estágio de conclusão, dessa forma, tem como papel primordial a ampliação e produção de conhecimentos. Através da prática investigativa que a pesquisa proporciona, o aluno deixa de ser apenas um receptor de informações, contribuindo diretamente na produção de novos conhecimentos. Além disso, um processo de enriquecimento na formação universitária é estabelecido, possibilitando ao estudante o contato maior com a área de atuação, não resumindo seus horizontes apenas aos conhecimentos teóricos adquiridos em sala de aula. Esse processo potencializa também uma maior autonomia na criação de desenvolvimento crítico, ético e cultural, preparando o aluno com excelência para aos passos seguintes à graduação, sendo esses vinculados ou não ao meio acadêmico. Além disso, novos horizontes são abertos e, dessa forma, há uma ampliação de conhecimentos e um aumento da capacidade crítica e poder de inferência dentro dos assuntos estudados. Isso proporciona um crescimento intelectual e permite a formação de profissionais com excelência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BITTENCOURT, J.M.; SEBBENN, A.M. Genetic effects of forest fragmentation in high-density *Araucaria angustifolia* populations in Southern Brazil. *Tree Genetics & Genomes*. 2009.

BITTENCOURT, J.M.; SEBBENN, A.M.. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. *Heredity*, 99: 580-591. 2007

BITTENCOURT, J.M.; SEBBENN, A.M.. Pollen movement in a continuous forest of *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. *Conservation Genetics*. Publisher. SPRINGER.. 2008

CARVALHO, M.M. X.; NODARI, E.S. As origens da indústria madeireira e do desmatamento da floresta de araucária no Médio Vale do Iguaçu. *Cadernos do CEOM*. n.29. 2008.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v.1, 1039p.

CONTE, R. Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites. 2004. 124 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

DEAN, Warren. **A ferro e fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira**. São Paulo: Companhia das Letras, 1997. 484p.

DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* v. 19, p. 4008, 1991.

EMBRAPA. 2004. Solos do Estado de Santa Catarina. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa Solos. n.46, 745p.

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

FERREIRA, Diogo Klock. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. **Caracterização genética e estrutura populacional de diferentes origens de *Araucaria angustifolia* na flona de Três Barras**. Florianópolis, SC, 2008. x, 83 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

FERREIRA, M.A.; Dario GRATTAPAGLIA. D **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética** . Documentos. Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia , n. 20; EMBRAPA-CENARGEN. Documento, n. 20, Brasília, 1995.

FRANKEL, O.H. & SOULÉ, M.S. 1981. **Conservation and Evolution**. London: Cambridge University Press. 327 p.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. SBG, Ribeirão Preto, SP. 2008.

FRANKLIN, I.R. & FRANKHAM, R. 1998. How large must populations be to retain evolutionary potential? **Anim. Conserv.** 1: 69-70.

GAIOTTO, F. a Genetic Structure, Mating System, and Long-Distance Gene Flow in Heart of Palm (*Euterpe edulis* Mart.). *Journal of Heredity* **94**, 399-406,2003.

GOMES, Mônica Araújo de Miranda. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. **.Caracterização da vegetação de campos de altitude em unidades de paisagem na região do Campo dos Padres, Bom Retiro/Urubici, SC**. xi, 103 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Florianópolis, 2009.

GOUDET, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).

GUERRA, M.P.; SILVEIRA, V.; REIS, M.S.; SCHNEIDER, L. 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, 2002.

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

HIGA, A.R.; RESENDE, M.D.V.; CARVALHO, P.E.R. Pomar de sementes por mudas: um método para conservação "ex situ" de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. In: 2º Congresso Nacional sobre essências nativas, 1992. Anais,1992, pg. 1217-1224.

HUECK, Kurt. **. As florestas da America do Sul; ecologia, composicao e importancia economica..** São Paulo (SP): Editora da Universidade de ..., 1972.

JORDANO, P., M. GALETTI, M.A, PIZO, W .R. SILVA. 2006. Ligando Frugivoria e Dispersão de sementes à biologia da conservação. In: DUARTE, C.F., BERGALLO, H.G., DOS SANTOS, M.A. *Biologia da conservação: essências*. Editorial Rima, São Paulo, Brasil.

KAGEYAMA, P Y.; GANDARA, F.B.; SOUZA, L.M.I. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. SÉRIE TÉCNICA IPEF. v. 12, n. 32, p. 65-70, dez, 1998.

LEWIS, P.O & ZAYKIN,D. 2001. **Genetic Data Analysis** (GDA): Computer program for the analysis of allelic data. Versão 1.0.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, P.C.; REIS, M.S. Fenologia reprodutiva e produção de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. Revista Brasil. Bot., v.27, n.4, p. 787-796, 2004.

LI, Y.C., KOROL, A.B., FAHIMA, T.. et al.. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology, v.11, p.2453–2465, 2002

LI, C.C. **Population genetics**. 1976. Chicago: University Chicago Press, 366 p.

LYNCH, M. & LANDE, R. 1998. The critically effective size for a genetically secure population. **Anim. Conserv.** 1: 70-72.

MANTOVANI, A; MORELLATO L.P.C .;REIS, M.S.. Internal genetic structure and outcrossing rate in a natural population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. Journal of Heredity 97: 466–472. 2006.

MARTINS, P.S. Estrutura populacional , fluxo gênico e conservação “ in situ ”. IPEF, n.35, p.71-78, abr.1987.

NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proc Natl Acad Sci USA**. 70:3321–3323.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P.; STEFENON, V.M. 2008. **Apostila de Biotecnologia**. Disponível em: <www.lfdgv.ufsc.br> Acesso em: 20 de setembro de 2011.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G, ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology v.29, p.294-307, 2006.

PATREZE, C.M. ; TSAI, S.M.. Intrapopulational genetic diversity of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is different when assessed on the basis of chloroplast or nuclear markers. **Plant Syst Evol**, 284: 111-122. 2010

Reitz, R. & Klein, R.M.. **Araucariáceas**. Flora Ilustrada Catarinense, 1-62 p. 1966

Reitz, R.; Klein, R.M. & Reis, A. 1978. **Projeto Madeira de Santa Catarina**. Sellowia 28-30, 1-320 p.

RIBEIRO, M.C., METZGER, J.P., MARTENSEN, A.C., PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. Biological Conservation.2009

- 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.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.Cold**. Spring Harbor, Nova Iorque, 1989.
- 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**. 89 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2011
- SCHMIDT, A.B.. 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. 2005.
- SCHMIDT, A.B; CIAMPI A.Y.; GUERRA, M.P. ;NODARI, R.O. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites (SSRs) para *Araucaria angustifolia* (Bert.), O. Kuntze. **Molecular Ecology Notes**, 7, 340–342. 2007.
- SCOTT, L. J.; SHEPHERD, R.; HENRY, R.J. 2003. Utility and evolution of microsatellites in the Araucariaceae. **Plant Systematics and Evolution** 236: 115-123.
- SEOANE, C.E.S. ; KAGEYAMA, P.Y.; RIBEIRO, A.; MATIAS, R.; REIS, M.S.; BAWA, K.; SEBBENN, A.M. Efeitos da Fragmentação Florestal sobre a Imigração de Sementes e a Estrutura Genética Temporal de Populações de *Euterpe edulis* Mart. Rev. Inst. Flor., São Paulo, v. 17, n. 1, p. 25-43, jun. 2005.
- SEOANE, C.E.S.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Efeitos da fragmentação florestal em populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Scientia Forestalis, Piracicaba, n. 57, p. 123-139, 2000.
- SETOGUCHI, H.; OSAWA, T.A.; PINTAUD, J.; JAFFRE, T.; VEILLON, J. Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on rbcL gene sequences. **American Journal of Botany**, v.85, p.1507, 1998.
- SHIMIZU JY, JAEGER P & SOPCHAKI SA. Variabilidade Genética em uma População Remanescente de *Araucaria* no Parque Nacional do Iguacu, Brasil. Boletim de Pesquisa Florestal 41:18-36, 2000.
- SHIMIZU, J.Y. Estratégia complementar para conservação de espécies florestais nativas: resgate e conservação de ecótipos ameaçados. Pesq. Flor. bras., Colombo, n.54, p.07-35, jan./jun. 2007.
- SHIMIZU, J.Y.; JAEGER, P.; SOPCHAKI, S.A. Variabilidade genética em uma população remanescente de *Araucária* no Parque Nacional do Iguacu, Brasil. Bol. Pesq. Fl., Colombo, n. 41, p.18-36. 2000.

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

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.

TEMPLETON, A.R. **Genética de populações e teoria microevolutiva**.Ribeirão Preto, SP. SBG, 2011.

VIANA, V.M.; TABANEZ, A.J.A.; MARTINEZ, J.L.A. Restauração e manejo de fragmentos florestais. Revista do Instituto Florestal, São Paulo, v.4, n. único, p.400-406, 1992.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T.. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. Trends in Ecology and Evolution, 11: 413-418. 1996

ZECHINI, A.A.; SCHUSSLER, G.; CRISTOFOLINI, C.; BITTENCOURT, R.; MONTAGNA, T.; MANTOVANI, A.; REIS, M.S. 2011. Geographic distribution of genetic diversity of *Araucaria angustifolia* populations in Santa Catarina State: conservation perspectives to a threatened species from Atlantic Rainforest. In: **Resumos do 57º Congresso Brasileiro de Genética**.

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais / Fundação SOS Mata Atlântica. Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica – Período 2000 a 2005. Disponível em: <http://www.portalodm.com.br/atlas-dos-remanescentes-florestais-da-mata-atlantica-periodo-2000-2005--bp--147--np--1.html>, acesso em 16 de maio de 2010.