

Caroline Cristofolini

**DINÂMICA DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Araucaria  
angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE EM PAISAGEM DE CAMPO  
NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis

Coorientador: Prof. Dr. Adelar Mantovani

Florianópolis

2013

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

Cristofolini, Caroline  
Dinâmica da diversidade genética de *Araucaria  
angustifolia* (Bertol.) Kuntze em paisagens de campo no  
estado de Santa Catarina / Caroline Cristofolini ;  
orientador, Maurício Sedrez dos Reis ; co-orientador,  
Adelar Mantovani. - Florianópolis, SC, 2013.  
93 p.

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. Diversidade  
genética. 3. Fluxo gênico. 4. Taxa de cruzamento. I.  
Sedrez dos Reis, Maurício. II. Mantovani, Adelar. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Dinâmica da diversidade genética  
de *Araucaria angustifolia* (Bertol.)  
Kuntze em paisagem de campo no  
Estado de Santa Catarina

por

Caroline Cristofolini


Dissertação julgada e aprovada em 27/02/2013, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Márcio Sedrez dos Reis (Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Dr.ª. Maria Imaculada Zucchi (UNESP)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Miguel Pedro Zucchi (CCA/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª. Dr.ª. Mariana Pires de Campos Felles (UFG-GO)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2013



À Maria B. Cristofolini, Dacio Cristofolini e  
Leandro Cristofolini (*in memoriam*),  
meus exemplos de força, coragem e amor à vida.



## AGRADECIMENTOS

Não menos importante, é agradecer a todos que contribuíram de diversas formas para construção deste trabalho e principalmente, tornaram a trajetória mais feliz. Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram, em especial: Aos meus pais, Maria B. Cristofolini e Dacio Cristofolini, pelo apoio, compreensão nas ausências, incentivo e amor transmitido durante toda esta etapa. Ao meu irmão, Paulo Cristofolini, pelo apoio e empolgação pelo trabalho. Ao Georg Altrak, pelo amor e força nos momentos mais importantes sem medir esforços, além das valiosas contribuições neste trabalho. Ao amigo orientador, Maurício, não só pela confiança e presença constante durante todas as etapas, mas também pelo crescimento profissional e pessoal proporcionado. Ao meu co-orientador, Adelar Mantovani, pelo apoio fornecido desde a montagem da parcela e ao pessoal do CAV-UDESC, em especial ao Alison P. Bernardi e Miguel B. Lauterjung, pela ajuda sempre imediata. Ao amigo Alison G. Nazareno, pelo incentivo, força, ensinamentos e correções fundamentais. Ao amigo Glauco Schussler, pela força e pelas diversas madrugadas no laboratório, essenciais para realização do trabalho. À Karina V. Hmeljevski pelas preciosas dicas de laboratório, não medindo esforços para ajudar sempre. Ao Luiz G. U. Figueiredo pela preciosa ajuda no laboratório. Aos amigos guerreiros de campo, Felipe Steiner e Alex Zechini por toda a ajuda durante esses dois anos. À todos os amigos do Núcleo de Pesquisas em Florestas Tropicais (NPFT) pela acolhida nesses dois anos e apoio na realização deste trabalho: Alex Zechini, Alison G. Nazareno, Andréa Mattos, Felipe Steiner, Glauco Schussler, Giovanni F. Paludo, Juliano Zago, Luiz G.U. Figueiredo, Natália Adan, Natália G. Andrade, Roberta I. Duarte, Samantha Filippin, Tiago Montagna, Tiago Santos, Victor H. Buzzi e Wilian Vieira, foi um prazer trabalhar com todos vocês! À Liliana Q. Pila, Jenny P. Corredor, Francine L. Farias e Morgana Lopes, pelo apoio e amizade. Aos amigos Marja K. Wurmth, Eduarda T.B. Butzke, Luciana Brigati, Juliane Schmidt, Eder Caglioni, Annete Bonnet, pela constante torcida! Ao LFDGV pelo suporte oferecido e todo o pessoal que ajudou com ensinamentos e apoio, além do preparo dos combustíveis diários (*Coffea arabica* e *Ilex paraguariensis*). Pelo apoio financeiro agradeço ao NPFT, CAPES, FAPESC e RGV por tornarem possível a realização deste trabalho. Muito obrigada a todos!





Já vi os quadros do Louvre, bem como os de muitos outros museus da Europa e dos Estados Unidos. Acho que tenho um razoável senso de apreciação das artes plásticas, mas ainda não tive, em nenhum museu, experiências que satisfaçam o meu senso estético com a intensidade com que isso acontece quando caminho pela natureza, parando aqui e ali para admirar uma montanha rochosa cujo pico se ergue em meio à floresta de um vale, ou quando sento à beira de um riacho que corre por sobre pequenas pedras cobertas de musgo, ao lado de samambaias gigantes que crescem à sombra da cobertura da mata. Não acho que sou o único a pensar assim; para muitas pessoas, as florestas são a fonte dos maiores sentimentos de plenitude estética, uma coisa que quase chega a uma intensidade espiritual.

(Peter Singer, 1993)



## RESUMO

Ao longo de toda a faixa do Planalto, onde campos e Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária) se interpenetram, é frequente a ocorrência de manchas florestais em meio à matriz campestre, os denominados capões, estes, são formados por desde pequenos agregados de vegetação arbóreo/arbustiva, até grandes fragmentos de Floresta com Araucária. Os capões são importantes núcleos de manutenção dos processos florestais, bem como fornecedores de alimento e refúgio à fauna silvestre, no contexto da paisagem campestre com ocorrência de Araucária. Assim, com o objetivo de compreender aspectos da dinâmica da diversidade genética de *Araucaria angustifolia* nesta importante e ameaçada paisagem, nunca antes estudada quanto a sua diversidade genética, foram realizados estudos sobre diversidade genética em diferentes gerações (progênies, plântulas, jovens e adultos), abordando aspectos do sistema reprodutivo, estrutura genética e fluxo gênico. A amostragem (adultos, jovens, plântulas e progênies) foi realizada em uma parcela de 9 ha (gride de 10 x 10 m) em uma área de paisagem de campo com presença de capões de Araucária na região da Coxilha Rica (Lages, SC). Os indivíduos amostrados foram genotipados empregando-se oito locos microssatélites. Foram encontrados 87 alelos na população (486 indivíduos), presença de alelos nulos em 3 locos e alelos exclusivos em todos as gerações, em maior número nos adultos. A heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) foi 0,59 e a heterozigosidade média observada foi 0,53 para a população. Os oito locos não apresentaram desequilíbrio de ligação. O valor de FIS (corrigido a partir da presença de alelos nulos) foi baixo, indicando ausência de endogamia em todas as gerações. O FST (0,006) foi também foi baixo, indicando inexistência de divergência entre as gerações. A taxa de cruzamento multilocos foi  $t_m=1$  e uniloco  $t_s=0,966$ . A geração de adultos apresentou estrutura genética até 37m, os jovens até 11m e as plântulas não apresentaram. A média da dispersão de pólen foi de 125m e de sementes foi 109 metros. Os resultados para paisagem de campo foram diferentes dos encontrados na maioria dos estudos em floresta contínua e fragmentos florestais, a densidade de indivíduos é menor e a polinização é, possivelmente, facilitada pela abertura entre os capões, ocasionando em fluxo gênico suficiente para não ocorrer cruzamentos entre parentais, favorecendo a manutenção da diversidade genética na paisagem, bem como de fragmentos florestais próximos. Além da importância da

criação de UC's nesta paisagem ímpar, é importante ressaltar a possibilidade de uso das áreas associadas à conservação, com pastejo e roçadas com frequência e intensidade realizadas de forma sustentável.

## ABSTRACT

Throughout the range of the southern plateau, where fields and Araucaria Forest intertwine, the occurrence of forest patches amid a grassland mosaic is frequent, which are denominated “capões”, these are formed beginning from small clusters of tree/shrub vegetation to large fragments of Araucaria Forest. Capões are important centers for the maintenance of forest processes, as well as providers of food and shelter to wildlife, in the context of a country landscape in occurrence with Araucaria. Thus, in order to understand aspects of the genetic diversity dynamics of *Araucaria angustifolia* in this specific landscape of species occurrence, studies were conducted on genetic diversity in different generations (progeny, seedlings, juveniles, and adults), addressing aspects of the reproductive system, genetic structure and gene flow. Sampling (adults, juveniles, seedling, and progenies) was performed in a 9 ha plot (grid of 10 x 10 m) in a field landscape with the presence of Araucaria capões in the region of Coxilha Rica (Lages, SC). The sampled individuals were genotyped employing eight microsatellite loci. In this study 87 alleles were found in the population (486 individuals), with the presence of null alleles at three loci and rare alleles across all generations, in greater numbers of adults. The average expected heterozygosity ( $H_e$ ) was 0.59 and the average observed heterozygosity was 0.53 for the population. The value of  $F_{IS}$  (corrected from null alleles) was low, indicating the absence of inbreeding in all generations. The  $F_{ST}$  (0.006) was also low, indicating lack of divergence between the generations. The multilocus outcrossing rate was  $t_m=1$  and single locus outcrossing rate was  $t_s=0.966$ . The generation of adults showed genetic structure until 37m, juveniles until 11m, and was not present in seedlings. The average pollen dispersion was 125m and seed dispersion was 109 meters. The results for the field landscape are different from those found in most studies in forest fragments and continuous forest. In the field landscape the density of individuals is low and pollination is possibly facilitated by the opening between capões, resulting in enough gene flow so inbreeding does not occur, favoring the maintenance of genetic diversity in the landscape, as well as nearby forest fragments. Besides the importance of creating protected areas in this unique landscape, it is important to emphasize the possibility of use of conservation areas for grazing and frequent mowing with a sustainable intensity.



## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. ÁREA DE ESTUDO DEMARCADA (GRIDE DE 300 X 300 M, COM QUADRÍCULAS DE 10X 10 M) INDICANDO OS CAPÕES (A, B, C, D E E) COM TODOS OS INDIVÍDUOS GENOTIPADOS DA PARCELA (ADULTOS - MACHOS E FÊMEAS, JOVENS E PLÂNTULAS).  
.....36
- FIGURA 2. ASPECTOS DA ÁREA DE ESTUDO, COM PAISAGEM DE CAMPO E CAPÕES NA REGIÃO DA COXILHA RICA (LAGES, SC), MOSTRANDO PARCIALMENTE OS CAPÕES D, E E A (CÍRCULOS VERMELHOS) E O CAPÃO B.....37
- FIGURA 3. SEMENTES DE ARAUCÁRIA COLETADAS PARA AMOSTRAGEM DE PROGÊNIES (A), PLÂNTULA IDENTIFICADA COM PLACA (B), INDIVÍDUO JOVEM COM 1,5 METROS DE ALTURA (C) E INDIVÍDUO ADULTO REPRODUTIVO (D), NA PAISAGEM DE CAMPO, COXILHA RICA-LAGES, SC.....39
- FIGURA 4. ASPECTOS DA COLETA DE PINHAS POR ESCALADA (A) E DA COLETA DE ACÍCULAS COM ESTILINGUE (B) NA ÁREA DE ESTUDOS, REGIÃO DA COXILHA RICA, LAGES.....39
- FIGURA 5. DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS INDIVÍDUOS GENOTIPADOS DA PARCELA, POR CATEGORIA (ADULTOS : MACHOS E FÊMEAS, JOVENS E PLÂNTULAS), IDENTIFICADOS POR CAPÃO (A, B, C, D E E) NA PAISAGEM DE CAMPO DA COXILHA RICA. PPG RGV, UFSC (2013).....46
- FIGURA 6. DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS PARA DIÂMETRO À ALTURA DO PEITO (DAP) DOS INDIVÍDUOS ADULTOS, DIÂMETRO A ALTURA DO COLO (DAC) EM INDIVÍDUOS JOVENS E ALTURA DE PLÂNTULAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* NA PAISAGEM DE CAMPO DA COXILHA RICA, LAGES. PPG RGV, UFSC (2013).....49
- FIGURA 7. ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL NOS INDIVÍDUOS ADULTOS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* NA COXILHA RICA. A LINHA CONTÍNUA REFERE-SE A ESTIMATIVA DO COEFICIENTE DE COANCESTRIA 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. ( $H_0: \theta_{XY} = 0$ ).....62

FIGURA 8. ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL NOS INDIVÍDUOS MACHOS E FÊMEAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* NA COXILHA RICA. A LINHA CONTÍNUA REFERE-SE A ESTIMATIVA DO COEFICIENTE DE COANCESTRIA 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.....63

FIGURA 9. ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL NA GERAÇÃO DE JOVENS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* NA COXILHA RICA. A LINHA CONTÍNUA REFERE-SE A ESTIMATIVA DO COEFICIENTE DE COANCESTRIA 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.....65

FIGURA 10. ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL NA GERAÇÃO DE PLÂNTULAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* NA COXILHA RICA. A LINHA CONTÍNUA REFERE-SE A ESTIMATIVA DO COEFICIENTE DE COANCESTRIA 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.....66

FIGURA 11. FREQUÊNCIAS DAS DISTÂNCIAS DE DISPERSÃO DE PÓLEN OBTIDAS ATRAVÉS DOS GENÓTIPOS DAS MÃES E DOS PAIS DA GERAÇÃO DE PROGÊNIES DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* NA PAISAGEM DE CAMPO DA COXILHA RICA (LAGES-SC).....68

FIGURA 12. DISTÂNCIAS DE DISPERSÃO DE PÓLEN OBTIDAS ATRAVÉS DAS PROGÊNIES. M1(MATRIZ COM 17 PROGÊNIES), M2 (MATRIZ COM 14 PROGÊNIES), M3 (MATRIZ COM 14 PROGÊNIES), M4 (MATRIZ COM 14 PROGÊNIES), M5 (MATRIZ COM 15 PROGÊNIES), M6 (MATRIZ COM 17 PROGÊNIES), M7 (MATRIZ COM 12 PROGÊNIES), M8 (MATRIZ COM 17 PROGÊNIES), M9 (MATRIZ COM 14 PROGÊNIES), M10 (MATRIZ COM 9 PROGÊNIES) E M11 (MATRIZ COM 11 PROGÊNIES).....69

FIGURA 13. LOCALIZAÇÃO DAS 11 MATRIZES DENTRO DA PARCELA COM OS RESPECTIVOS PAIS DAS PROGÊNIES. EM VERMELHO AS MATRIZES E EM AZUL OS PAIS.....70

FIGURA 14. FREQUÊNCIAS DAS DISTÂNCIAS DE DISPERSÃO DE PÓLEN OBTIDAS ATRAVÉS DOS GENÓTIPOS DAS MÃES E DOS PAIS DAS GERAÇÕES DE PROGÊNIES, PLÂNTULAS E JOVENS DE *ARAUCARIA*



*ANGUSTIFOLIA* NA PAISAGEM DE CAMPO DA COXILHA RICA (LAGES-SC).....72

FIGURA 15. FREQUÊNCIAS DAS DISTÂNCIAS DE DISPERSÃO DE SEMENTES OBTIDAS ATRAVÉS DOS GENÓTIPOS DAS MÃES E DAS GERAÇÕES PLÂNTULAS E JOVENS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* NA PAISAGEM DE CAMPO DA COXILHA RICA (LAGES-SC).....73

FIGURA 16. EXEMPLO DE DISTÂNCIA MAIOR E MENOR DE DISPERSÃO DE PÓLEN E DE SEMENTE ENTRE O TRIO: MÃES, PLÂNTULAS E PAIS DENTRO DA PARCELA DA COXILHA RICA (LAGES-SC). A PRIMEIRA SETA PRETA REPRESENTA MAIOR DISTÂNCIA DO PÓLEN (258,40 METROS) ATÉ A MÃE E A SEGUNDA SETA, DISTÂNCIA DA SEMENTE ATÉ O LOCAL DE ESTABELECIMENTO DA PLÂNTULA (200 METROS). A PRIMEIRA SETA ROXA REPRESENTA UMA DISTÂNCIA MENOR DO PAI ATÉ A MÃE (59,70 METROS) E A OUTRA SETA MENOR A DISTÂNCIA DA MÃE ATÉ O ESTABELECIMENTO DA PLÂNTULA (7,20 METROS).....75

FIGURA 17. EXEMPLO DE DISTÂNCIA MAIOR E MENOR DE DISPERSÃO DE PÓLEN E DE SEMENTE ENTRE O TRIO: MÃES, JOVENS E PAIS DENTRO DA PARCELA DA COXILHA RICA (LAGES-SC). A PRIMEIRA SETA PRETA REPRESENTA MAIOR DISTÂNCIA DO PÓLEN (183,60 METROS) ATÉ A MÃE E A SEGUNDA SETA, DISTÂNCIA DA SEMENTE ATÉ O LOCAL DE ESTABELECIMENTO DO JOVEM (201,50 METROS). A PRIMEIRA SETA ROXA REPRESENTA UMA DISTÂNCIA MENOR DO PAI ATÉ A MÃE (41,70 METROS) E A OUTRA SETA MENOR A DISTÂNCIA DA MÃE ATÉ O ESTABELECIMENTO DO JOVEM (0,90 METROS).....76



## LISTA DE TABELA

TABELA 1. VALORES DE DIVERSIDADE GENÉTICA PARA <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> POR DIFERENTES AUTORES, COM MARCADORES ISOENZIMÁTICOS E MICROSSATÉLITES.....	35
TABELA 2. RELAÇÃO DAS 11 MATRIZES E OS SEUS RESPECTIVOS NÚMEROS DE PROGÊNIES ANALISADAS DA PARCELA DA COXILHA RICA, LAGES. PPG RGV, UFSC (2013). .....	38
TABELA 3. LOCOS MICROSSATÉLITES EMPREGADOS NESTE TRABALHO, DESENVOLVIDOS PARA <i>ARAUCARIA</i> , COM SUAS SEQUÊNCIAS MOTIVOS DE REPETIÇÃO, A SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> E OS RESPECTIVOS AUTORES QUE OS DESENVOLVERAM.....	41
TABELA 4. SEQUÊNCIA DOS PRIMERS QUE FORAM MARCADOS COM FLUORESCÊNCIA AZUL (FAM) E VERDE (HEX) EM COMBINAÇÃO BIPLEX. ....	42
TABELA 5. TESTE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS LOCOS DOS INDIVÍDUOS ADULTOS, JOVENS, PLÂNTULAS E PROGÊNIES DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> (10.000 PERMUTAÇÕES; LIMITE DE SIGNIFICÂNCIA APÓS CORREÇÃO DE BONFERRONI = 0,000446). PPG RGV, UFSC (2013). .....	51
TABELA 6. FREQUÊNCIA DE ALELOS NULOS EM CADA LOCO PELO MÉTODO OOSTERHOUT <i>ET AL.</i> (2004), PARA OS INDIVÍDUOS ADULTOS, JOVENS, PLÂNTULAS E PROGÊNIES DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> NA PAISAGEM DE CAMPO DA COXILHA RICA. PPG RGV, UFSC (2013). .....	52
TABELA 7. NÚMERO DE ALELOS ENCONTRADOS PARA <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> ATRAVÉS DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES, POR DIFERENTES AUTORES. ....	55
TABELA 8. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS PARA OITO LOCOS MICROSSATÉLITES, EM INDIVÍDUOS ADULTOS, JOVENS, PLÂNTULAS E PROGÊNIES, DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> , PROVENIENTES DE PAISAGEM DE CAMPO, COXILHA RICA (LAGES-SC). ....	56
TABELA 9. DIVERSIDADE GENÉTICA E ENDOGAMIA NA POPULAÇÃO DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> , NA COXILHA RICA. N É O TAMANHO DA	

AMOSTRA,  $K$  É O NÚMERO TOTAL DE ALELOS,  $\hat{H}_E$  É A HETEROZIGOSIDADE ESPERADA EM EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG,  $\hat{H}_O$  É A HETEROZIGOSIDADE OBSERVADA E  $F$  É O ÍNDICE DE FIXAÇÃO..... 58

TABELA 10. ÍNDICES DE DIVERSIDADE GENÉTICA NA POPULAÇÃO DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*, NA COXILHA RICA, PARA CADA GERAÇÃO (ADULTOS, JOVENS, PLÂNTULAS E PROGÊNIES).  $N$  É O TAMANHO DA AMOSTRA,  $\hat{A}$  É O NÚMERO EFETIVO DE ALELOS NOS LOCOS,  $\hat{H}_E$  É A HETEROZIGOSIDADE ESPERADA EM EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG,  $\hat{H}_O$  É A HETEROZIGOSIDADE OBSERVADA,  $F_{IS}$  É O ÍNDICE DE FIXAÇÃO E  $F_{IS}^1$  É O ÍNDICE DE FIXAÇÃO EXCLUINDO LOCOS SEGREGANTES PARA ALELOS NULOS..... 59

TABELA 11. PARÂMETROS DO SISTEMA DE CRUZAMENTO DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* NA COXILHA RICA, LAGES-SC..... 60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cal AP – anos radiocarbono calibrados antes do presente;  
CAP – circunferência à altura do peito;  
Cfb – chuvas distribuídas ao longo do ano;  
CIA – clorofórmio: Álcool isoamílico;  
CTAB – brometo de cetil trimetil amônio;  
DAC – diâmetro à Altura do colo;  
DAP – diâmetro à Altura do Peito;  
DNTP – desoxirribonucleotídeos Fosfatados  
DP – desvio Padrão;  
EDTA –ácido etileno diamino tetracético;  
FGC – fluxo gênico crítico;  
 $F_{IS}$  - Índice de fixação individual  
FOD - Floresta Ombrófila Densa;  
FOM - Floresta Ombrófila Mista;  
 $F_{ST}$  - divergência genética  
 $\hat{H}_E$  – heterozigosidade esperada;  
 $\hat{H}_{ET}$  – heterozigosidade esperada total;  
 $\hat{H}_O$  – heterozigosidade observada;  
 $\hat{H}_{OT}$  – heterozigosidade observada total;  
k – números de alelos nos locos;  
LDGV – Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal;  
LOD – logaritmo da razão de verossimilhança;  
PCR – polymerase Chain Reaction;  
PVP – polyvinylpyrrolidone;  
RNAse – ribonuclease;  
 $r_p$  - correlação de paternidade ;  
Taq – taq DNA polimerase  
 $t_m$  - taxa de cruzamento multiloco;  
 $t_m-t_s$  - taxa de cruzamento entre aparentados;  
 $(1 - t_m)$  - correlação de autofecundação;  
 $t_s$  - taxa de cruzamento uniloco;  
UC – Unidade de Conservação;  
UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina;  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina;  
 $\theta_{xy}$  - coeficiente de coancestria



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>27</b>
2.1	A ESPÉCIE .....	27
2.2	A ESPÉCIE EM PAISAGEM DE CAMPO .....	29
2.3	GENÉTICA NA CONSERVAÇÃO DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> .....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
3.1	ÁREA DE ESTUDO .....	35
3.2	DEMOGRAFIA .....	37
3.3	COLETA PARA A CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA .....	38
3.4	EXTRAÇÃO E QUALIDADE DO DNA.....	40
3.5	AMPLIFICAÇÃO DO DNA VIA PCR E GENOTIPAGEM .....	40
<b>4</b>	<b>ANÁLISE DOS DADOS .....</b>	<b>43</b>
4.1	ANÁLISE DE ALELOS NULOS .....	43
4.2	ANÁLISE DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	43
4.3	ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA .....	43
4.4	ANÁLISES DO PADRÃO ESPACIAL DOS GENÓTIPOS .....	44
4.5	ANÁLISE DE PARENTESCO .....	44
4.6	FLUXO GÊNICO CONTEMPORÂNEO .....	44
4.7	FLUXO GÊNICO CRÍTICO .....	45
4.8	SISTEMA REPRODUTIVO .....	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
5.1	ESTRUTURA POPULACIONAL.....	45
5.2	DIVERSIDADE GENÉTICA E TAXA DE CRUZAMENTO .....	50
5.2.1	<i>Desequilíbrio de ligação</i> .....	50
5.2.2	<i>Alelos nulos</i> .....	52
5.2.3	<i>Índices de diversidade</i> .....	52
5.2.4	<i>Taxa de cruzamento</i> .....	59
5.3	ANÁLISE DE PARENTESCO E FLUXO GÊNICO.....	60
5.3.1	<i>Poder de exclusão</i> .....	60
5.3.2	<i>Fluxo de pólen e sementes</i> .....	61

5.3.3	<i>Fluxo gênico crítico</i> .....	61
5.4	ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL .....	61
5.4.1	<i>Dispersão de pólen</i> .....	67
5.4.2	<i>Dispersão de sementes</i> .....	73
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>APÊNDICE</b> .....	<b>93</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A Floresta Ombrófila Mista (FOM), na qual *Araucaria angustifolia* é componente marcante da fitofisionomia, pertence a uma região de altitudes que variam de 200 a 1500 metros (Backes, 2009). 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 ocorria, 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; no Rio de Janeiro, no maciço de Itatiaia e na Serra da Bocaina (Klein, 1960; Reitz, 1966); no Espírito Santo (Backes, 2009); e além do leste da Província de Misiones, Argentina (Mattos, 1994).

Na FOM, o clima é caracterizado como Cfb, ou seja, mesotérmico, com chuvas regularmente distribuídas ao longo do ano e sem uma estação seca. A temperatura média é de 15,9°C, com média das mínimas igual ou inferior à 11,5°C, sendo que as médias mais altas correspondem a pontos periféricos da área ocupada pela araucária e as mínimas absolutas de -2,1 a -10°C, com a média das máximas de 22,1°C (Backes, 2009). Já na Argentina, ao leste de Misiones, a espécie existe em estado nativo com o tipo de clima Cfa (Mattos, 1994).

A vegetação da FOM, denominada por Klein (1978) de Floresta de Araucária, não constitui uma formação homogênea, mas é formada por diversos tipos de submatas, constituídas por árvores características nas diferentes áreas de ocorrência. Outras vezes, interrompidas por campos ou capões arbustivos. De acordo com Klein (1978) são cinco formações vegetacionais distintas: no Planalto Norte e Meio-oeste associada principalmente a *Ocotea porosa* e *Ilex paraguariensis*, no Planalto Sul a *Ocotea puchella* e *Nectandra lanceolata* e no Extremo-oeste a *Apuleia leiocarpa* e *Parapiptadenia rigida*. Ainda no Extremo-oeste e em regiões de transição com a Floresta Ombrófila Densa (FOD), associada a faxinais. E por fim, em formações de campo, formando os chamados capões.

Ao longo de toda a faixa do Planalto, onde campos e Floresta com Araucária se interpenetram, é frequente a ocorrência de manchas florestais em meio à matriz campestre, os denominados capões, estes, são formados por desde pequenos agregados de vegetação arbóreo/arbustiva, até grandes fragmentos de Floresta com Araucária (Machado, 2004). Assim, os capões são importantes núcleos de

manutenção dos processos florestais, bem como fornecedores de alimento e refúgio à fauna silvestre (Machado, 2004).

No início do século XX cerca de 35% da cobertura vegetal dos estados do sul do Brasil estavam representados pela FOM e atingia 42,5% do território estadual. Atualmente, devido à exploração da madeira não ultrapassa 5% da sua cobertura original, que 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).

Em estudos posteriores, Ribeiro *et al.* (2009) verificaram uma redução da cobertura vegetal da FOM de 25.400.000 ha para 3.200.000, ficando com 12,6% ha de remanescentes no Brasil, a maioria menores que 50 hectares e destes, apenas 0,62% (165.000 ha) estão em áreas protegidas (Indrusiak e Monteiro, 2009). Além disso, a proteção especificamente da paisagem dos campos com araucária tem sido completamente negligenciada.

A exploração da floresta de *A. angustifolia*, desde o início da colonização, alavancou o desenvolvimento para a região sul do país, mas ocorreu de maneira predatória, não sustentável, seja do ponto de vista social, econômico e ecológico (Guerra *et al.*, 2002), fazendo com que a espécie permaneça desde 1997 na lista vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza, como vulnerável na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção do Estado do Paraná, em perigo de extinção pelo workshop Revisão da lista da flora brasileira ameaçada de extinção de 2005, na lista de espécies ameaçadas de extinção do Ministério do Meio Ambiente em 2008, e recentemente indicada no relatório do Workshop da lista de espécies da flora catarinense ameaçadas de extinção de 2011.

Neste contexto, ações que favoreçam a conservação e restauração das populações de *Araucaria angustifolia* são de grande relevância e urgentes. Grande parte das populações remanescentes pode estar se tornando inviáveis e sujeitas ao desaparecimento devido ao rompimento da dinâmica da sua regeneração, amadurecimento e reprodução, decorrentes da fragmentação da Floresta Ombrófila Mista. Ademais, o pequeno tamanho efetivo das populações nos fragmentos torna as futuras gerações cada vez mais débeis devido ao aumento da endogamia e perda de alelos pelo efeito da deriva genética (Reis, 1996; Shimizy, Jaeger & Sopchaki, 2000; Bittencourt e Sebbenn, 2007).

Assim, para a estruturação de planos de conservação, recuperação e de manejo para a espécie *Araucaria angustifolia*, torna-se imprescindível o entendimento da dinâmica da diversidade genética,

envolvendo aspectos de caracterização demográfica, estimativas de fluxo gênico e determinação do sistema reprodutivo. Desta forma, neste estudo, caracterizou-se a estrutura de uma população em uma situação de diferente histórico de ocupação da Floresta Ombrófila Mista, os capões na paisagem de campo, avaliando aspectos relativos ao sistema reprodutivo, diversidade genética, distâncias de dispersão de pólen e de sementes, com o objetivo de buscar conhecimento para estratégias de conservação e manejo para esta diferente e não menos importante paisagem.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A Espécie

A família Araucariaceae compreende atualmente três gêneros: *Wollemia*, com uma espécie restrita ao Sudeste da Austrália, *Agathis*, com 13 espécies exclusivas da Australásia, cinco delas endêmicas da Nova Caledônia; e *Araucaria*, com maior número de espécies (19) e maior distribuição geográfica, e único presente na América do Sul, com 13 exclusivos da Nova Caledônia (Dutra & Stranz, 2009).

A *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, ou pinheiro-brasileiro, é uma espécie arbórea, conífera e que já constituiu o principal item da economia florestal do país. Além da madeira essa espécie fornece resina e alimento (pinhão) para o homem e a fauna nativa (Reitz, Klein & Reis, 1978). Os indivíduos desta espécie formam árvores de tamanho elevado, copa de formato peculiar tornando-se uma figura imponente e característica na paisagem do sul do Brasil. As árvores novas apresentam copa cônica e as velhas, copa em forma de umbela terminal. O pinheiro se destaca das outras espécies brasileiras, devido a sua forma original: 20-50m de altura, 1-2m de diâmetro a altura do peito (DAP), tronco cilíndrico, raramente ramificado, resinoso, rugoso e com a casca até 18cm de espessura (Klein, 1960; Mattos, 1994). O sistema radicular é muito desenvolvido, principalmente para sustentação da copa. As folhas são pequenas, laxas, de 5-6 cm de comprimento, com 0,5 mm de espessura e côncavas. Os ramos secundários, chamados grimpas, são persistentes e revestidos pelas folhas (Mattos, 1994).

Reitz & Klein (1966) descreve a Araucária como sendo 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, quando imaturos são

verdes e maduros tem coloração acastanhada. Estes, são formados por um conjunto de muitos estames em espiral, em torno de um eixo cilíndrico, cada estame com 10-25 anteras com enorme quantidade de pólen dispersados pelo vento, formando assim, nuvens amarelas de pólen e com data de maturação entre 28 de setembro a 15 de outubro, podendo ocorrer variações conforme o clima. O estróbilo feminino apresenta forma arredondada, o cone maduro mede de 10 a 25 cm de diâmetro, que apresenta uma gotícula receptora constituída de substância adesiva na sua superfície entre as bráctes escamiformes, para que o pólen fique aderido e inicie a formação do tubo polínico. A pinha possui um número variável de pinhões, também chamados de protocarpas ou diásporas (5 a 150), é constituída também de falhas (inférteis) e pinhões chochos (não fertilizados), e seu peso pode atingir mais de 4,7 kg (Souza & Hattemer, 2003; Mattos, 1994).

O pinhão é altamente nutritivo (54% amido e 5,1% proteína) (Rosado *et al.* 1994), sendo um recurso importante na dieta dos animais, principalmente na época de escassez de outros alimentos. Os animais que consomem uma porção suficiente para inviabilizar sua germinação, são chamados de predadores. Dentre eles, invertebrados (besouros e formigas) e vertebrados, na maioria aves e mamíferos. Um dos principais invertebrados é a broca-do-pinhão, *Cydia araucariae*, das aves o papagaio-charão (*Amazona pretrei*) e a gralha-azul (*Cyanocorax caeruleus*); e dos mamíferos macacos, veados, quatis, cotias, capivaras, ouriços, pacas, esquilos e pequenos roedores, estes últimos considerados os maiores predadores. Dentre os principais dispersores estão as gralhas (*Cyanocorax chrysops* e *C. caeruleus*), além do papagaio-do-peito-roxo (*Amazona viaceae*) e da tiriba (*Pyrrhura frontalis*), e entre mamíferos, os esquilos (*Sciurus ingrami*) e as cotias (*Dasyprocta azarae*) (Vieira & Iob, 2009).

A região dos pinheirais do Estado de Santa Catarina, localiza-se no Planalto Ocidental. Do Rio Caçador para a esquerda, até o extremo Oeste, estende-se a grande Zona Basáltica; no extremo norte acha-se uma pequena zona, qual seja do Planalto de Canoinhas do Sub-grupo Estrada Nova; nos arredores de Lages, encontra-se o Planalto de Lages (formação sedimentar), cujas características são bem distintas do resto do Planalto (Mattos, 1994).

Hoje, a espécie considerada ameaçada de extinção em todos os locais de ocorrência, está inserida em setenta e duas Unidades de Conservação (UCs) federais e estaduais de domínio público, localizadas na área de distribuição da Floresta Ombrófila Mista no Brasil, totalizando 885.858,23 ha de áreas protegidas. Contudo, somente 0,62%

da área original de ocorrência da Araucária estão em áreas protegidas (Indrusiak & Monteiro, 2009).

O Estado de Santa Catarina conta com 172.564,37 ha de áreas protegidas, dos quais 75.179,37 ha estão em seis UCs federais e 97.385,00 ha em oito UCs estaduais. Estudos identificaram 29 áreas com remanescentes de Floresta de Araucária em UCs em SC, a maioria tinha menos de 100 ha e havia sofrido exploração intensa a moderada dos recursos florestais (Indrusiak & Monteiro, 2009). Estes autores reforçam que a maioria das UCs de Floresta com Araucária tem tido manejo precário e não alcançam seus objetivos, além disso, a Floresta está ainda mal representada em UCs, sobretudo porque as ações vieram tarde e já não existem grandes remanescentes a conservar. Uma das soluções importantes está em aumentar a habilidade em articular paisagens sustentáveis que permitam compatibilizar a produção com o funcionamento dos ecossistemas locais.

## 2.2 A espécie em paisagem de campo

Os capões de matas com Araucária são belas formações características do Sul do Brasil, formando verdadeiras ilhotas de mata espalhadas pelos campos; o nome capão vem do guarani “*caapuan*”, que quer dizer *caa* = mata e *puan* = redondo (Mattos, 1994). Os capões são formações naturais e, via de regra, distinguem-se pela forma e arquitetura de suas bordas de remanescentes florestais gerados por desmatamento. Observa-se que essas manchas naturais apresentam-se arredondadas ou até mesmo circulares e, os indivíduos de borda, geralmente muito ramificados, são curvos com o crescimento orientado para a parte externa da mancha, o que confere aos capões um aspecto hemisférico. Ainda, relatos e registros históricos de uso das áreas fornecem subsídios de grande valia para o reconhecimento dessas manchas (Machado, 2004). Mattos (1994) acrescenta que os capões se formam nas cabeceiras dos banhados, na parte mais enxuta ou nas grotas, podem desenvolver-se até certo ponto ou continuarem o desenvolvimento e sua forma é muito variável, em terrenos mais secos por exemplo, a forma é arredondada e apresenta geralmente 1 ou 2 pinheiros no centro.

Klein (1978) cita nos campos com Araucária, uma predominância de agrupamentos herbáceos, formado por gramíneas, Ciperaceae, compostas, leguminosas e Verbenaceae e como espécies frequentes: a carqueja do campo (*Baccharis gaudichaudiana*) a vassoura lajeana (*Baccharis uncinela*), os caragatás (*Eryngium* spp.) a

samambaia das taperas (*Pteridium aquilinum*), bem como capões e as típicas matas de galeria, muitas vezes se alargando formando bosques de pinhais no meio da vegetação campestre (Klein 1978). Mattos (1994) também descata a ocorrência de *Schinus longifolius* (Lindl.) Spreng. ou *Lithraea brasiliensis* March., tendo a participação do pinheiro nesta formação de 3 modos: antes das outras espécies, ao mesmo tempo com as outras espécies e depois das espécies pioneiras. A vegetação de sombra vai sendo substituída por formas arbustivas, robustas, de ramos curtos e folhagem densa e novos elementos como arbustos (ou árvores) próprios para o campo como espécies de *Anisomeris*, *Erythroxylum*, *Excoecaria*, *Myrsine* e *Stenocalyx* (Mattos, 1994). A vegetação rareia, mas não uniformemente, retrai-se em moitas pequenas, arredondadas, aqui e acolá, reforçados por árvores isoladas, acrescenta o autor.

Os Campos Sulinos (como também são chamadas estas formações de campos) são formados por ecossistemas naturais com alta diversidade de espécies vegetais e animais, oferecem benefícios ambientais importantes e constituem fonte forrageira para a pecuária do sul do Brasil (Pillar *et al.*, 2009b). Além disso, a presença de diferentes fisionomias de comunidades campestres e estágios de expansão florestal, desde a presença de indivíduos arbóreos isolados até capões em zonas de transição com a Floresta com Araucária, certamente propiciam um incremento na diversidade (Pillar *et al.*, 2009).

Alguns estudos palinológicos têm sido realizados durante as últimas décadas na região campestre Sul - Brasileira, e têm comprovado que existiam extensas áreas de vegetação campestre sobre o Planalto durante as épocas glaciais e do Holoceno Inferior e Médio. A dominância de uma vegetação de campos é atribuída às condições glaciais frias e secas e às condições climáticas quentes e secas do Holoceno superior. A expansão da Floresta com Araucária sobre áreas de vegetação campestre teve início no Planalto em torno de 3210 anos cal AP<sup>4</sup> (idade em anos radiocarbono calibrados<sup>5</sup> antes do presente), começando a partir da migração de matas de galeria ao longo de rios, o que indica o advento de condições climáticas mais úmidas e se completando no Holoceno Superior, onde a Floresta atingiu os campos mais elevados, com as atuais condições climáticas úmidas (Behling *et al.*, 2009).

Mesmo assim, Machado (2004) destaca que apesar das condições climáticas favoráveis às florestas, é de extrema importância ressaltar que a expansão dos capões parece ser relativamente lenta. Há evidências de que o processo de expansão florestal foi e continua sendo

influenciado pela ação antrópica (Bitencourt & Krspehauer, 2006; Reis & Ladio, 2012).

Resultados de análises palinológicas e de carvão na região nordeste da Serra do Sudeste, no Morro Santana em Porto Alegre (Behling *et al.*, 2007), indicam a ocorrência de uma vegetação em forma de mosaico de campo e floresta com elevada diversidade taxonômica que sofreu influência do fogo durante o Holoceno Superior. (Behling *et al.*, 2009). O aumento na quantidade de carvão durante o Holoceno indica fogo causado, seguramente, por ações antrópicas: primeiro causadas por ameríndios e posteriormente por colonos europeus. Os atuais ecossistemas, tanto florestais como campestres, são fortemente influenciados pelas atividades humanas. A remoção da floresta e a alteração da paisagem, por meio da agricultura, pastoreio e plantios de *Pinus* e *Eucalyptus*, têm mudado claramente a vegetação original (Behling *et al.*, 2009).

A história dos campos, principalmente nos últimos 10 mil anos, sempre esteve associada a algum grau de interferência antrópica desde os povos indígenas até os colonizadores europeus. Ou seja, tanto as comunidades da flora quanto da fauna dos campos que atualmente compõem o cenário de mosaicos de floresta-campo vem sofrendo uma seleção natural ao longo do tempo e provavelmente se encontram adaptadas às atuais pressões de pastejo e de fogo (Pillar *et al.*, 2009).

Nas últimas décadas, vastas áreas originalmente cobertas com os Campos foram transformadas em outros usos (culturas anuais, silvicultura e invasão de exóticas). Esse processo aconteceu sem que limites tenham sido efetivamente estabelecidos e aplicados nem pelo poder público nem pela sociedade (Pillar *et al.*, 2009b). A legislação ambiental a respeito é ainda precária e negligenciada, algumas políticas públicas têm estimulado a conversão e os Campos estão pobremente representados nos sistemas de áreas protegidas. Distúrbios causados pelo fogo e pastejo são importantes nesses ecossistemas campestres, influenciando na diversidade de espécies, e em certa medida sendo essencial para sua conservação, mas o limiar entre uso sustentável e degradação devido a esses distúrbios ainda é insuficientemente conhecido (Pillar *et al.*, 2009b).

Informações pré-históricas e históricas, que envolvam o conhecimento sobre a intensidade do fogo e a frequência de queimadas, bem como os efeitos de ambas sobre a vegetação, também poderiam ser aplicadas na criação de planos de manejo sustentável a longo prazo e trabalhos de monitoramento (Behling *et al.*, 2009).

Dados paleoecológicos e paleoambientais da região do Planalto Sul-Brasileiro relacionados a dinâmica da vegetação, do fogo e do impacto humano incluindo o uso da terra fornecem importantes informações para sua conservação e manejo. Vários registros palinológicos mostram que as áreas de campo altamente diversas são naturais, ou seja, remanescentes de uma extensa área de um período glacial e do Holoceno Campos Sulinos Inferior e Médio e não de áreas florestais do passado. A partir desse conhecimento, sugere-se que os campos devam ser protegidos e não sujeitos a florestamentos (Behling *et al.*, 2009). Os autores ainda reforçam que os campos merecem ser conservados e não ser condenados à extinção, simplesmente porque são ecossistemas que não correspondem ao clima atual e, por isso, dependem de intervenção humana para serem mantidos.

Além disso, a supressão de gado e do fogo produz uma grande acumulação de biomassa inflamável aumentando, assim, o risco de queimadas catastróficas e incontroláveis, com conseqüências imprevisíveis para a biodiversidade. Pela legislação, as queimadas sobre o campo em fazendas, com propósitos de manejo, estão proibidas. Porém, uma maneira de se manter os campos poderia ser através de atividades de pastoreio com o gado (Behling *et al.*, 2009). O número limitado de cabeças de gado poderia ser uma boa alternativa para o manejo dos campos, o que seria mais apropriado do que freqüentes queimadas com efeitos negativos, tais como a degradação do solo, poluição do ar e o risco de fogo incontrolável (Behling *et al.*, 2009). Os grandes mamíferos que viviam nos campos no sul do Brasil até o início do Holoceno poderiam ter tido um papel importante na manutenção da alta diversidade da vegetação de campo, similar ao gado em tempos modernos. (Behling *et al.*, 2009).

### **2.3 Genética na conservação de *Araucaria angustifolia***

Bittencourt (2007) explica que a conservação da natureza visa proteger áreas que representam habitats e comunidades que podem ser identificadas e ressalta que a conservação genética vai além, pois se preocupa com diferenças genéticas no material conservado. A autora destaca também que a preocupação com a conservação desses recursos genéticos requer conhecimento de como estes se encontram distribuídos na natureza e que cada população representa uma fonte genética de variação e diversidade com a adaptação a novos ambientes, ou seja, material com potencialidades para melhoramento, uso e conservação



genética, pois apresentam possível aproveitamento econômico ou outros valores.

Reis (1996) ressalta a necessidade de um maior número de estudos que caracterizem os eventos relacionados à movimentação dos alelos (níveis de diversidade, estrutura genética, sistema reprodutivo, taxa de cruzamento, fluxo gênico, etc.) em populações naturais. Para efetiva conservação genética ou exploração de uma espécie deve-se conhecer de que forma a variação genética ocorre dentro e entre populações, bem como compreender como ocorre essa variação de acordo com o tempo e o espaço (Souza, 2006). Mantovani *et al.* (2006) coloca que a existência e o nível de estruturação genética dentro das populações varia entre estas, dependendo das histórias de ocupação, já que a densidade de indivíduos nos remanescentes da espécie é variável.

O fluxo gênico entre populações florestais remanescentes pode informar sobre a conexão funcional, que pode ser avaliada por marcadores codominantes como os microssatélites, para *Araucaria angustifolia*. Nesta perspectiva, o entendimento da distribuição da variabilidade genética desta espécie bem como a conectividade entre os fragmentos florestais, são instrumentos básicos para que se possam definir estratégias de conservação, recomposição e restabelecimento das conexões para a manutenção do fluxo gênico dessa espécie-chave da Floresta Ombrófila Mista (Bittencourt, 2007).

Um plano de recuperação eficiente dentro de fragmentos florestais, que proporcionaria uma estrutura equilibrada, deve envolver a entrada de novos alelos através de sementes, provenientes de corredores de fluxo gênico (Tarazi *et al.*, 2010). Richards (1997) destaca que comportamento dos polinizadores influencia fortemente o fluxo de pólen, e as maneiras como as plantas se adaptaram a essas características comportamentais desempenham um papel primordial na dispersão de genes, e na estrutura genética das populações, a qual é controlada pela interação entre sistema de reprodução das plantas e seleção natural. Já na polinização pelo vento, os padrões de fluxo gênico dependem em grande parte do acaso (Richards, 1997).

A *A. angustifolia* têm densidades populacionais normalmente altas, que podem limitar a movimento de pólen entre e dentro das populações e reduzir o número de doadores de pólen contribuindo para a próxima geração (Sousa *et al.*, 2005). Além disso, Auler *et al.* (2002) encontrou para *A. angustifolia* maior parte da variabilidade genética contida dentro das populações, e ainda, nas populações degradadas que estudou, os índices de diversidade encontrados foram mais baixos do que nas populações em melhor estado de conservação, devido a

fragmentação. Da mesma forma constatou Souza *et al.* (2009), em estudo com a espécie, encontrou maior diversidade genética em populações remanescentes de florestas contínuas no Rio Grande do Sul e Paraná, do que nas populações fragmentadas ou isoladas naturalmente por condições físicas e climáticas, no Rio de Janeiro e Minas Gerais e estes, atribuem em primeiro lugar ao isolamento em refúgios no último período Glacial, seguido por um deriva genética ao invés da exploração humana. Os autores também ressaltam a importância da conservação destas populações antigas e relictuais, levando em conta a distinção genética de cada população.

Os estudos de sistema reprodutivo estão mais diretamente associados aos níveis de diversidade genética e à distribuição da variabilidade entre e dentro de populações. A caracterização da taxa de cruzamento dá uma idéia de movimentação dos alelos no tempo, ou mais especificamente, entre duas gerações. Assim, a caracterização dos níveis de variabilidade e estruturação genética, bem como o entendimento da dinâmica de movimentação dos alelos nas populações naturais, trazem subsídios para a maximização de estratégias de conservação e monitoramento do processo de exploração sustentada (Reis, 1996).

Deriva genética e endogamia pode influenciar pequenas populações isoladas, alterando os padrões de diversidade genética. Ambos os efeitos têm implicações para a conservação, nos quais a perda de variação genética pode diminuir o potencial para defesa a fatores bióticos (como patógenos e herbívoros) e alterações ambientais (Souza *et al.*, 2009).

Na tabela 1 podem ser verificados os últimos estudos genéticos com *Araucaria angustifolia* com marcadores isoenzimáticos e microssatélites em diferentes locais de ocorrência da espécie e diferentes tamanhos amostrais. Todos estes, em floresta contínua ou fragmentada, e inexistentes em paisagem de campo.

**Tabela 1.** Valores de diversidade genética para *Araucaria angustifolia* por diferentes autores, com marcadores isoenzimáticos e microssatélites.

Referência	Marcador	Populações	Locos	Indivíduos	Ho	He	f	A
Shimizu <i>et al.</i> 2001	Isoenzimas	1 (PR)	8	120	0,24	0,25	0,06	--
Auler <i>et al.</i> 2002	Isoenzimas	9 (SC)	15	328	0,06	0,11	0,14	33
Mantovani <i>et al.</i> 2006	Isoenzimas	1 (SP)	16	334	0,17	0,17	0,01	26
Ferreira <i>et al.</i> 2011	Isoenzimas	1 (SC)	9	278	0,10	0,11	0,06	26
Zechini (2012)	Isoenzimas	6 (SC)	13	1540	0,08	0,08	0,03	27
Salgueiro <i>et al.</i> 2005	SSR	3 (RJ, PR, RS)	8	60	0,31	0,34	--	49
Stefenon <i>et al.</i> 2007	SSR	6 (SP, PR, SC e RS)	5	384	0,58	0,71	0,10	73
Bittencourt & Sebbenn (2007)	SSR	1 (PR)	8	228	0,51	0,59	0,14	77
Bittencourt & Sebbenn (2008)	SSR	1 (PR)	8	298	0,55	0,59	0,06	64
Bittencourt & Sebbenn (2009)	SSR	1 (PR)	8	1.179	0,54	0,58	0,09	106
Patreze & Tsai (2010)	SSR	1 (SP)	6	105	0,80	0,74	-0,09	70
Sant'anna (2011)	SSR	1 (SC)	9	513	0,55	0,63	0,13	86

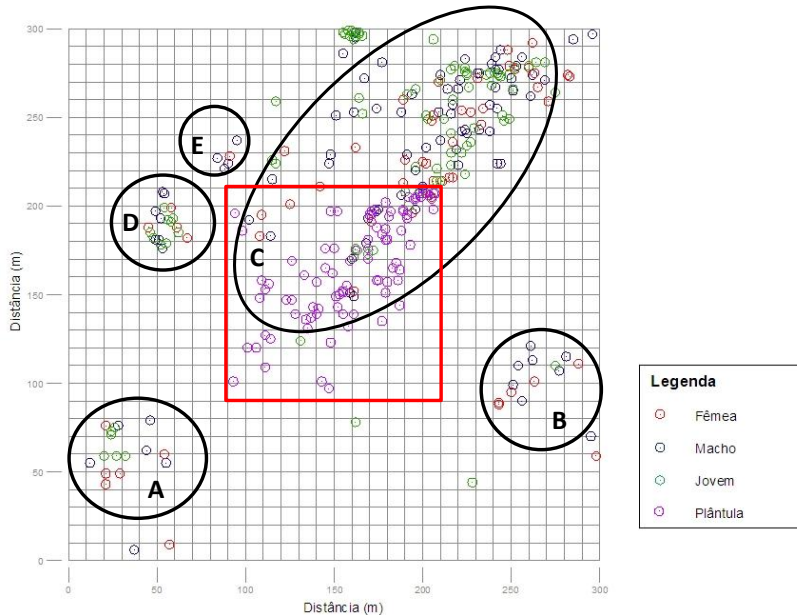
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudo

O estudo foi realizado no interior da cidade de Lages, na região de Coxilha Rica, Estado de Santa Catarina, a 28° 02' S e 50 17' W, a qual estende-se do Rio Pelotinhas a leste até o Rio Lava-Tudo, e ao sul até onde o campo encontra as florestas que cobrem o vale do Rio Pelotas. A microrregião da Coxilha Rica, pertencente ao Planalto Serrano Catarinense e está inserida inteiramente no ecossistema de Campos de altitude. É considerada como uma das áreas do Estado de Santa Catarina com menor alteração das características naturais predominantes. As altitudes alcançam 1.500 m, com temperatura média anual abaixo de 18°C, com ocorrência de geadas, temperaturas negativas no inverno e precipitação pluvial média anual de 1.600 mm. O solo é pouco profundo, pedregoso, ácido e de baixa fertilidade (Fernandes *et al.*, 2011).

A área de paisagem de campo estudada encontra-se em uma propriedade privada, com presença rotativa de gado, roçadas e queimadas nos campos e um histórico de corte seletivo há 35 anos. Nesta propriedade foi realizada a montagem de uma parcela permanente de maneira que fossem abrangidos os diferentes ambientes em que a espécie está inserida no campo, como capões de diferentes tamanhos e situados em mata ciliar. A parcela ficou constituída de 90.000 m<sup>2</sup> (300 x

300m), subdividos em subparcelas de 100 m<sup>2</sup> (10 x 10m) para facilitar a localização e avaliação das plantas, podendo ser visualizada na figura 1. O capão A (figura 1) e C com presença de um pequeno curso d'água, com algumas espécies diferenciadas em relação aos outros e situados em uma baixada subindo uma pequena encosta na altura do capão C, cortado por uma passagem para gado e veículos usados na fazenda.



**Figura 1.** Área de estudo demarcada (grade de 300 x 300 m, com quadrículas de 10 x 10 m) indicando os capões (A, B, C, D e E) com todos os indivíduos genotipados da parcela (adultos - machos e fêmeas, jovens e plântulas). O quadro vermelho demarca a área analisada de plântulas dentro da parcela.

O capão B situado em área mais elevada, com solo bastante pedregoso e grande número de rochas visíveis (figura 2); e os capões D e E, (figura 2) menores que os outros, situados em uma pequena encosta.



**Figura 2.** Aspectos da área de estudo, com paisagem de campo e capões na Região da Coxilha Rica (Lages, SC), mostrando parcialmente os capões D, E e A (círculos vermelhos) e o capão B.

Além da importância dos estudos com enfoque genético em paisagem de campo, a escolha desta área se deve a presença de fatores antrópicos no passado e no presente, fato este presente na realidade das regiões campestres do país, com necessidade de ser elucidado para elaboração de planos de conservação e de manejo.

### 3.2 Demografia

Foi realizado o levantamento de todos os indivíduos localizados dentro da parcela (adultos, jovens e plântulas), cada um etiquetado com placa de alumínio contendo o número da sub-parcela e a coordenada geográfica x e y para as análises de estrutura genética espacial. Os indivíduos adultos foram sexados com auxílio de binóculos, sendo classificados pela presença de estruturas reprodutivas (estróbilos) como adultos reprodutivos. Estes foram mensurados quanto a circunferência à altura do peito (CAP), ou seja, 1,30m, com fita métrica. Os indivíduos juvenis e as plântulas foram mensurados quanto à altura, com régua dendrométrica e diâmetro à altura do colo (DAC) com paquímetro.

### 3.3 Coleta para a caracterização genética

Para a caracterização genética de progênes foram coletadas 3 pinhas de 20 matrizes amostradas aleatoriamente dentro da parcela. A coleta foi realizada através de escalada pelo tronco das matrizes, com auxílio de uma equipe especializada. Posteriormente a coleta foram sorteados vinte pinhões e plantados em casa de vegetação na Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Estas progênes apresentaram problemas na germinação, resultando em um número insuficiente para análise. As sementes que restaram do plantio (armazenadas a 4°C) foram utilizadas para a análise. Foram retirados os embriões e analisados no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LDGV) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sendo obtidas entre 9 e 17 sementes por matriz (tabela 4).

**Tabela 2.** Relação das 11 matrizes e os seus respectivos números de progênes analisadas da parcela da Coxilha Rica, Lages. PPG RGV, UFSC (2013).

<b>Matrizes</b>	<b>Progênes</b>
M1	17
M2	14
M3	12
M4	14
M5	15
M6	17
M7	12
M8	17
M9	14
M10	9
M11	11
<b>Total</b>	<b>152</b>

Para a caracterização genética dos indivíduos adultos, foram coletados ramos (aproximadamente 30 acículas) de todos os reprodutivos (machos e fêmeas). A coleta foi realizada com auxílio de pedras e estilingue devido ao porte das árvores. Para amostragem de indivíduos juvenis foram coletados ramos de todos os indivíduos com altura superior a 1,5 m e DAP menor que 5,0 cm, devido ao elevado

número de indivíduos e visando amostrar um conjunto de indivíduos de idade mais homogênea. Para amostragem da geração de plântulas foi estabelecida uma área central na parcela (14.400 m<sup>2</sup> - 120 x 120 m, conforme o quadrado em vermelho presente na figura 1) devido ao elevado número de indivíduos, e coletadas aproximadamente 10 acículas por indivíduo de todos os indivíduos nesta área. Todas as amostras foliares coletadas foram identificadas, armazenadas em isopor com gelo e posteriormente levadas ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) e armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA. As progênies e os indivíduos coletados podem ser observados na figura 3 e a metodologia desta coleta na figura 4.



**Figura 3.** Sementes de *Araucária* coletadas para amostragem de progênies (A), plântula identificada com placa (B), indivíduo jovem com 1,5 metros de altura (C) e indivíduo adulto reprodutivo (D), na paisagem de campo, Coxilha Rica-Lages, SC.



**Figura 4.** Aspectos da coleta de pinhas por escalada (A) e da coleta de acículas com estilingue (B) na área de estudos, região da Coxilha Rica, Lages.

### **3.4 Extração e qualidade do DNA**

Para a extração do DNA das acículas, a metodologia foi baseada em Doyle & Doyle (1990). Já o DNA das progênies foi extraído com o kit Nucleo Spin Plant II (Macherey-Nagel), devido à dificuldade de se obter DNA de qualidade com a metodologia anterior.

O DNA extraído foi avaliado quanto a qualidade em eletroforese em gel de agarose 1,5% com 4 µl de tampão de carregamento com GelRed® e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Para quantificar a pureza e quantidade de DNA para a diluição utilizado na PCR, realizou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro Nanodrop® 1000 (Thermo Scientific) em 230, 260 e 280 nm.

### **3.5 Amplificação do DNA via PCR e genotipagem**

Para o estudo foram utilizados oito locos microssatélites (Tabela 2), selecionados por serem polimórficos, não apresentarem desequilíbrio de ligação nos trabalhos de origem e por serem utilizados para o gênero *Araucaria* em outros trabalhos.



**Tabela 3.** Locos microssatélites empregados neste trabalho, desenvolvidos para *Araucaria*, com suas sequências motivos de repetição, a sequência dos *primers* e os respectivos autores que os desenvolveram.

Loco		Motivo	Sequência (5' para 3')	Autor
Ag20	F	(GA) <sub>12</sub>	ACTAGGAATGGATGTTGGTG	Salgueiro <i>et al.</i> 2005
	R		AAGGTATGGCATCATGTCTC	
Ag23	F	(TA) <sub>5</sub> (GT) <sub>4</sub>	CCCTGTTAGACCTATGGTTG	Salgueiro <i>et al.</i> 2005
	R		ATATCATCCATCAATGAGGC	
Ag45	F	(GT) <sub>4</sub> AT(GT) <sub>7</sub>	CCATCCTCCATCATTATCC	Salgueiro <i>et al.</i> 2005
	R		TCCCTCCCTATGTCCCAAAG	
Ag56	F	(TC) <sub>11</sub>	CCCACTCAAACAATAGCAGTTC	Salgueiro <i>et al.</i> 2005
	R		TGAAGTTGGCCAATCAGATAC	
Ag62	F	(TC) <sub>13</sub>	ATATGGTGGGTGCCTACAG	Salgueiro <i>et al.</i> 2005
	R		TCCAATCGTTTCTCCAACAG	
Ag94	F	(TC) <sub>12</sub>	CCCCACAATAACCCAAGATG	Salgueiro <i>et al.</i> 2005
	R		AGTAAAATCCGCTAACAAATGC	
CRCA1	F	(GA) <sub>19</sub>	ACAACATGGAAAACATATGAG	Scott <i>et al.</i> 2003
	R		CCGTGTAACATTATGACTGC	
CRCA2	F	(GA) <sub>23</sub>	ATGCATGACTAGGATGAACA	Scott <i>et al.</i> 2003
	R		ATAGTTCTGCTTATCACATCT	

A técnica para amplificação foi primer-tail, primer universal M13 marcado com fluorocromo, com o seguinte protocolo de mix de PCR: para uma reação com volume total de 17µl, 1x Taq buffer (Fermentas), 0,3 U de DNA polimerase (Fermentas), 0,5 µM de *primer* F e 0,2 µM de *primer* R, 0,2 µM de *primer* M13, 0,1 mM de dNTPs (Fermentas), 2,5 mM de Cloreto de Magnésio (Fermentas) e 2ng de DNA. Um primer de cada loco foi marcado com fluorocromo HEX (verde) e fluorocromo FAM (azul) para os oito locos microssatélites (Tabela 3).

Na amplificação foi utilizado o conjunto de ciclos e temperaturas: 95°C por 3 minutos para desnaturação seguido de 35 ciclos, sendo cada ciclo composto por três fases, a primeira com 95°C por 30 segundos, a segunda com a T(a)°C (temperatura de anelamento) por 45 segundos e a terceira com 72°C por 1 minuto para extensão, e a extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para testar a temperatura de anelamento de cada um dos oito locos microssatélites, ao produto da PCR foi adicionado tampão de carregamento com GelRed® e visualizado através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A eletroforese foi com uma

corrente de 90 volts por 120 minutos e o resultado visualizado por transiluminação com luz ultravioleta.

Somente os primers Ag94 e Ag56, desenvolvidos por Salgueiro *et al.* (2005), foram amplificados nas mesmas condições da publicação, os outros Ag20, Ag23, Ag45 e Ag62, com temperaturas diferentes. Dos dois primers desenvolvidos por Scott *et al.* (2003), o CRCA1 foi amplificado com a mesma temperatura da publicação.

**Tabela 4.** Sequência dos primers que foram marcados com fluorescência azul (FAM) e verde (HEX) em combinação bplex.

	<b>Locos</b>	<b>Fluorescência</b>	<b>Ta (°C)</b>	<b>Fragmento esperado</b>
Biplex A	Ag 94	FAM	55	159 - 203
	Ag 20	HEX	58	257 - 283
Biplex B	Ag 23	FAM	55	249 - 287
	Ag 56	HEX	60	132 - 180
Biplex C	CRCA 1	FAM	55	212 - 232
	Ag 62	HEX	52	126 - 138
Biplex D	Ag 45	FAM	55	170 - 186
	CRCA 2	HEX	52	199 - 219

A obtenção dos genótipos foi realizada em sistema de detecção por fluorescência em seqüenciador MegaBACE 1000 DNA Analysis System Amersham Biosciences Corp. de 96 capilares, em quatro combinações bplex, marcadas com uma coloração FAM para um primer e coloração HEX para o outro. Para a eletroforese por capilar se utilizou 1µl do produto de PCR diluído em 5µl de água destilada autoclavada para os primers Ag56 e CRCA1, e para os primers Ag94, Ag20, Ag23, Ag62, Ag45 e CRCA2, diluído em 2,5µl. Em sistema bplex foi utilizado 1µl da diluição de cada primer, cada um marcado com coloração diferente. Nos 2µl de cada produto diluído foram adicionados 7,75µl de 0,1% de Tween 20 e 0,25µl de MegaBACE ET400-R Size Standard. A injeção das amostras foi feita por 85 segundos com carga elétrica de 3 KV e a corrida eletroforética por 80 minutos e carga elétrica de 9 KV. Os dados obtidos foram analisados através da interpretação dos eletroferogramas pelo software MegaBACE Fragment Profiler 1.2.

## 4 ANÁLISE DOS DADOS

### 4.1 Análise de Alelos nulos

Para identificação de erros de genotipagem devido a não amplificação de alelos (alelos nulos), foi usado o programa Micro-Checker Versão 2.2.3 (Oosterhout *et al.*, 2004).

### 4.2 Análise do desequilíbrio de ligação

O teste de desequilíbrio de ligação foi realizado entre todos os pares de locos com auxílio do programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002). As probabilidades de significância do teste foram obtidas por permutação (10000) e aplicando uma correção sequencial de Bonferroni para múltiplas comparações (95 %,  $\alpha = 0,05$ ).

### 4.3 Análise da diversidade genética

A diversidade genética para as gerações de adultos, jovens, plântulas e progênies foi caracterizada para o número total de alelos nos locos ( $k$ ), número efetivo de alelos nos locos ( $\hat{A} = 1/(1 - \hat{H}_e)$ ), heterozigosidade observada ( $\hat{H}_o$ ) e esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\hat{H}_e$ ), utilizando o programa GDA versão 1.1 (Lewis & Zaykin, 2000).

Os índices de endogamia intrapopulacional foram estimados pelo índice de fixação individual ( $F_{IS}$ ). A significância estatística dos valores foram testados por permutação (10.000). O índice de fixação e as permutações foram obtidos através do programa SPAGEDI 1.4 (Hardy e Vekemans, 2002).

A divergência genética ( $F_{ST}$ ) para todas as gerações (progênies, plântulas, jovens e adultos) foram estimadas seguindo Weir e Cockerham (1984). Estas análises foram feitas pelo programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002). O índice de endogamia ( $F_{IS}$ ), descrito por Loiselle *et al.* (1995), foi estimado para cada geração e a significância (determinada por 10.000 permutações) foi testada usando o programa SPAGEDI 1.4 (Hardy e Vekemans, 2002).

#### 4.4 Análises da estrutura genética espacial

A caracterização da distribuição espacial dos genótipos adultos, jovens e plântulas foram realizadas utilizando-se a estimativa do coeficiente de coancestria entre pares de árvores ( $\theta_{xy}$ ) descrito em Loiselle *et al.* (1995) e obtidos pelo programa SPAGED1 1.4 (Hardy & Vekemans, 2002). O coeficiente  $\theta_{xy}$  mede a extensão da similaridade entre os indivíduos  $x$  e  $y$ , relativo à similaridade genética média entre dois indivíduos aleatórios da amostra (Hardy & Vekemans, 2002). A significância estatística dos valores foi testada por permutação (10.000).

#### 4.5 Análise de parentesco

A análise de parentesco foi realizada com base no genótipo das progênies, jovens, plântulas e seus respectivos possíveis pais (adultos), utilizando um método de simples exclusão, aceitando a maternidade ou paternidade pelo programa CERVUS 3.0.3 (Marshall *et al.*, 1998; Kalinowski *et al.*, 2007). As análises de parentesco foram determinadas pela estatística  $\Delta$ , que corresponde à diferença entre o LOD (logaritmo da razão de verossimilhança) do candidato a parental mais provável, menos o LOD do segundo candidato a parental mais provável. Para obter os valores críticos de  $\Delta$  foram conduzidas simulações com os candidatos a parental, usando 10.000 repetições e 1 % como a proporção de locos com erro. Foram utilizados os níveis de confiabilidade de 95% como restrito e de 80 % como relaxado, conforme sugestão de Marshall *et al.* (1998).

Como todos os indivíduos possuem localização da parcela, foram determinadas as distâncias de dispersão de pólen, através da posição dos pais e mães, e as distâncias de dispersão de sementes através das mães e filhos.

#### 4.6 Fluxo gênico contemporâneo

As estimativas do fluxo gênico contemporâneo via pólen e sementes, foram obtidas usando análise de paternidade com o auxílio do programa CERVUS 3.0.3 (Marshall *et al.*, 1998). A taxa de imigração de pólen e sementes no fragmento ( $m$ ) foi calculada como a proporção de indivíduos que não tiveram um candidato a pai ou mãe determinado dentro da população ( $n_{imigrante}$  imigrantes) em relação ao número total de indivíduos amostrados ( $n_{total}$ ):  $m = n_{imigrante}/n_{total}$  (Burczyk *et al.*, 2004).

#### 4.7 Fluxo gênico crítico

O fluxo gênico crítico (FGC) é a probabilidade de determinar erroneamente um pai de um indivíduo dentro da população, quando o verdadeiro parental encontra-se fora da parcela (falso-positivo). A equação para o cálculo do fluxo gênico crítico, baseada em Dow & Ashley (1996) foi " $FGC=1-(1-P)^n$ "; onde P corresponde à probabilidade de não exclusão do segundo parental e n ao número de árvores parentais encontradas no interior da população. O número de progênes foi multiplicado pelo fluxo gênico crítico, obtendo-se o valor de indivíduos falso-positivos.

#### 4.8 Sistema Reprodutivo

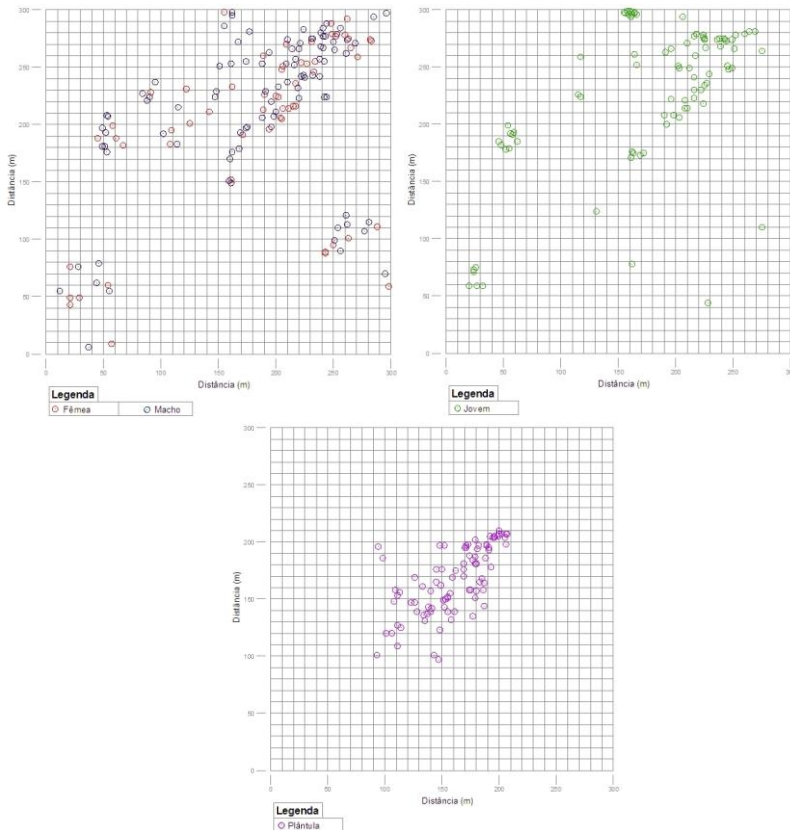
Para análise do sistema reprodutivo utilizou-se o programa MLTR 3.2 de Ritland (2004), que estima os seguintes parâmetros: a taxa de cruzamento multiloco ( $t_m$ ), pelo método de máxima verossimilhança; a taxa de cruzamento uniloco ( $t_s$ ); a taxa de autofecundação ( $s = 1 - t_m$ ); a taxa de cruzamento entre aparentados ( $t_m-t_s$ ); a correlação de paternidade ( $r_p$ ). O erro padrão da média para as estimativas descritas foi obtido através de 1000 bootstraps.

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1 Estrutura Populacional

Na população estudada, foram encontrados 150 indivíduos adultos reprodutivos, destes, 93 machos e 57 fêmeas e das 11 matrizes foram avaliadas 152 progênes. A geração de indivíduos classificados como jovens, selecionada com valores de altura e diâmetro à altura do colo (DAC) de 1,5m e 5,0 cm respectivamente, apresentou 90 indivíduos no total. A amostra da geração de plântulas selecionada no centro da parcela (14.400 m<sup>2</sup>) totalizou 96 indivíduos, dentre os 2.851 existentes na parcela. Os indivíduos analisados somaram 486, destes, 334 estabelecidos na parcela, distribuídos nos capões (Figura 1), e 152 progênes. No capão A, estão estabelecidos 10 adultos e 6 jovens, no capão B, 11 adultos e 1 jovem, no capão C, 83 plântulas, 59 jovens e

104 adultos, no capão D, 11 adultos e 9 jovens e no capão E 5 adultos. O restante dos indivíduos estão distribuídos pela área de campo da parcela, chamados de indivíduos isolados, totalizando 9 adultos, 15 jovens e 13 plântulas. Na figura 5 pode-se observar o padrão de distribuição espacial de cada uma das 3 gerações.



**Figura 5.** Distribuição espacial dos indivíduos da parcela, por categoria (adultos, machos e fêmeas, jovens e plântulas), identificados por capão (A, B, C, D e E) na paisagem de campo da Coxilha Rica. PPG RGV, UFSC (2013).

A paisagem de campo apresenta naturalmente baixa densidade de indivíduos adultos, por estarem estabelecidos na forma de capões, cercados por campo. No presente estudo a densidade de adultos foi de

16,6 ind.ha<sup>-1</sup> e 10 ind.ha<sup>-1</sup> para a geração de jovens selecionada. No total da parcela foi encontrada alta densidade da geração de plântulas, 316,7 ind.ha<sup>-1</sup>, já esperado em ambiente aberto com elevada incidência de luz solar. Na área selecionada para o estudo desta geração (14.400 m<sup>2</sup> no centro da parcela), foram observadas 66,6 ind.ha<sup>-1</sup>, pois a distribuição destas é diferenciada em toda a parcela, conforme a localização das fêmeas e produção de pinhas.

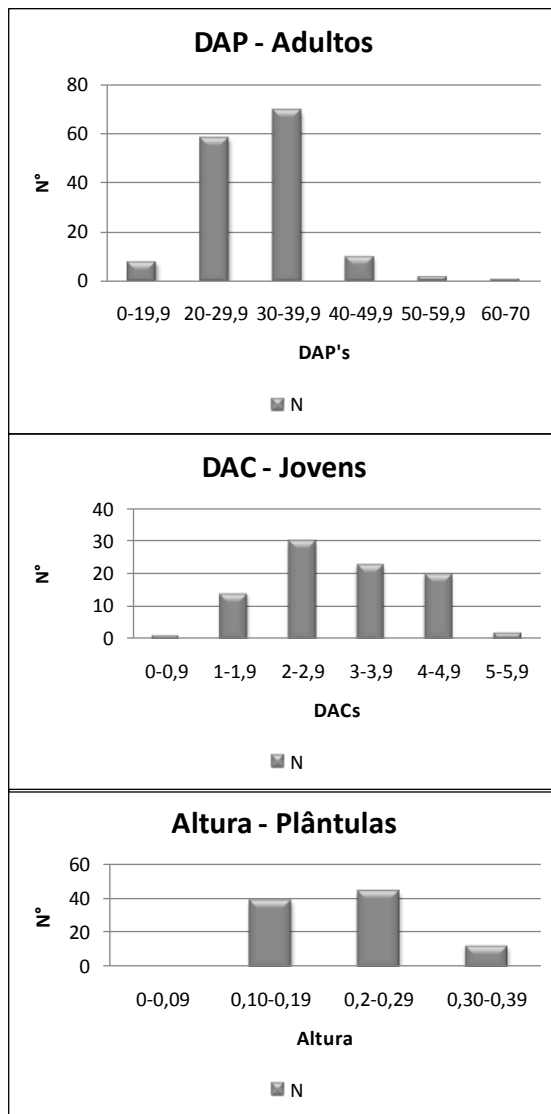
No total das gerações desta parcela Paludo (2013), em estudos de dinâmica demográfica para a espécie, encontrou densidade de 314 ind.ha<sup>-1</sup> e padrão espacial agregado. Sant'anna (2011) em remanescente de floresta contínua em SC, encontrou densidade de adultos em *A. angustifolia* de 40,3 ind.ha<sup>-1</sup>. Ferreira (2008) também em SC encontrou 175 ind.ha<sup>-1</sup>. Mantovani *et al.* (2006) em reserva de Campos do Jordão, com histórico de corte seletivo há 45 anos, encontrou 32 ind.ha<sup>-1</sup>, e Solórzano-Filho (2001) na mesma região de SP encontrou densidade maior, 55 ind.ha<sup>-1</sup>. Os primeiros autores atribuem que esta diferença pode estar associada a história de ocupação ou mesmo de exploração dos locais. Mantovani (2003) ainda acrescenta que para cada população a presença e magnitude da estrutura interna variam, visto que a densidade de indivíduos nos remanescentes de araucária é variável.

Neste estudo foi verificada densidade de fêmeas reprodutivas de 6,3 ind.ha<sup>-1</sup>. Solórzano-Filho (2001) encontrou 46 ind.ha<sup>-1</sup>, Mantovani (2003) 18 ind.ha<sup>-1</sup> e Zechini (2012) 13,9 ind.ha<sup>-1</sup> para Caçador-SC, 6,2 ind.ha<sup>-1</sup> para Coxilha Rica-SC e 29,6 ind.ha<sup>-1</sup> para Três Barras-SC. A razão sexual entre indivíduos machos e fêmeas de *A. angustifolia* foi de 1:1,6 (57/93). Este valor foi superior aos já relatados para *A. angustifolia* em floresta contínua e em fragmentos de floresta (1:1, Paludo *et al.*, 2009; 1:1,2, Mantovani *et al.*, 2004, Bittencourt & Sebbenn 2007 e 1:1,5, Mantovani *et al.*, 2001). Esta diferença entre machos e fêmeas na Coxilha Rica, pode ser resultado de um corte seletivo não intencional de fêmeas na área que ocorreu no passado, conforme informações do proprietário. Populações de espécies de plantas dióicas frequentemente exibem desvios da razão sexual, comumente associados às características da história de vida da espécie ou a segregação espacial dos sexos em ambientes heterogêneos (Vieira *et al.*, 2008). Mattos (1994) coloca que, geralmente, há maior porcentagem de pinheiros de sexo masculino que pinheiros do feminino, por área considerada.

O valor médio do diâmetro à altura do peito (DAP) dos indivíduos adultos foi de 31,4 cm (DP=7,84), variando de 13,3 a 62,7cm. O valor médio do diâmetro à altura do colo (DAC) dos jovens foi 2,97cm (DP=1,3) e da altura média das plântulas, 0,21m (DP=0,61)

(figura 6). Os baixos valores de DAP evidenciam uma população recente, refletindo o histórico de realização de corte seletivo na propriedade há aproximadamente 35 anos. Sant'anna (2011) estimou idade de 29 a 44 anos para adultos com DAP entre 20 a 30 cm e para juvenis, com DAP variando entre 0,1 a 6,4 cm e altura variando entre 0,2 a 6,4 cm, idades variando de menos de um ano a no máximo 10 anos, 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). Considerando os valores de DAP dos adultos da parcela da Coxilha Rica, entre 13,3 a 62,7 cm, nota-se que estes apresentam diferentes idades, sendo reflexo de diferentes eventos reprodutivos, a mesma situação se repete aos indivíduos jovens.





**Figura 6.** Distribuição de freqüências para diâmetro à altura do peito (DAP) dos indivíduos adultos, diâmetro a altura do colo (DAC) em indivíduos jovens e altura de plântulas de *Araucaria angustifolia* na paisagem de campo da Coxilha Rica, Lages. PPG RGV, UFSC (2013).

## 5.2 Diversidade genética e taxa de cruzamento

### 5.2.1 Desequilíbrio de ligação

Dos 28 testes realizados entre os pares de locos avaliados nos adultos, jovens, plântulas e progênies, nenhum apresentou desvios significativos, após a correção de Bonferroni ( $\alpha=0,000446$ ), sugerindo equilíbrio genotípico (Tabela 5). Portanto, pode-se afirmar que os alelos dos diferentes locos não estão associados e segregam independentemente. Sendo assim, todos os locos utilizados neste estudo foram apropriados na determinação da estrutura e diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico contemporâneo de *A. angustifolia*.

**Tabela 5.** Teste de desequilíbrio de ligação entre os locos dos indivíduos adultos, jovens, plântulas e progênes de *Araucaria angustifolia* (10.000 permutações; limite de significância após correção de Bonferroni = 0,000446). PPG RGV, UFSC (2013).

<b>Locos</b>	<b>Adultos</b>	<b>Jovens</b>	<b>Plântulas</b>	<b>Progênes</b>
SSRAG9 X SSRAG2	0,11384	0,06741	0,87455	0,04554
SSRAG9 X SSRAG2	0,40625	0,12723	0,01429	0,44866
SSRAG9 X SSRAG5	0,12946	0,26071	0,03705	0,60536
SSRAG9 X SSRARC	0,94018	0,57098	0,31652	0,7875
SSRAG9 X SSRAG6	0,64286	0,11071	0,18884	0,00045
SSRAG9 X SSRARC	0,14241	0,66875	0,94286	0,06741
SSRAG9 X SSRAG4	0,68839	0,65313	0,85938	0,17589
SSRAG2 X SSRAG2	0,96205	0,00045	0,99598	0,20446
SSRAG2 X SSRAG5	0,22277	0,63661	0,14063	0,33839
SSRAG2 X SSRARC	0,08214	0,04375	0,02723	0,31071
SSRAG2 X SSRAG6	0,52143	0,64688	0,71161	0,17813
SSRAG2 X SSRARC	0,14196	0,03571	0,09196	0,00893
SSRAG2 X SSRAG4	0,97143	0,80804	0,07768	0,48259
SSRAG2 X SSRAG5	0,09196	0,94598	0,11964	0,32589
SSRAG2 X SSRARC	0,70625	0,15045	0,07991	0,91384
SSRAG2 X SSRAG6	0,00848	0,98795	0,34643	0,60179
SSRAG2 X SSRARC	0,04598	0,51786	0,74152	0,23438
SSRAG2 X SSRAG4	0,69152	0,88259	0,91295	0,58661
SSRAG5 X SSRARC	0,29107	0,41696	0,95759	0,77545
SSRAG5 X SSRAG6	0,63036	0,51295	0,66027	0,87679
SSRAG5 X SSRARC	0,12321	0,52634	0,62991	0,42723
SSRAG5 X SSRAG4	0,62277	0,94777	0,61875	0,10446
SSRCRC X SSRAG6	0,56205	0,53348	0,78929	0,23661
SSRCRC X SSRARC	0,17768	0,77009	0,49152	0,47277
SSRCRC X SSRAG4	0,83348	0,66071	0,29911	0,75848
SSRAG6 X SSRARC	0,1558	0,34643	0,64018	0,15
SSRAG6 X SSRAG4	0,71339	0,1125	0,92813	0,00089
SSRCRC X SSRAG4	0,23214	0,42723	0,42813	0,01027

### 5.2.2 Alelos nulos

Dos locos utilizados no presente estudo, foram encontradas frequências significativas de alelos nulos para Ag23 nos adultos e plântulas, Ag62 nos adultos, jovens e plântulas e Ag45 para todas as gerações (adultos, jovens, plântulas e progênies), este último em maior frequência (Tabela 6). A consequência da presença de alelos nulos é a detecção errônea de quantidade maior de genótipos homozigotos em populações avaliadas por locos microssatélites (White *et al.*, 1999). Alelos nulos têm sido encontrados em mais de 25% dos locos de microssatélites, chegando a atingir frequências superiores a 15%, mesmo assim esses dados são ainda limitados para generalizar esta tendência (Jarne & Lagoda, 1996).

**Tabela 6.** Frequência de alelos nulos em cada loco pelo método Oosterhout *et al.* (2004), para os indivíduos Adultos, Jovens, Plântulas e Progênies de *Araucaria angustifolia* na paisagem de campo da Coxilha Rica. PPG RGV, UFSC (2013).

Locos	Adultos	Jovens	Plântulas	Progênies
AG94	0,0029	0,0257	0,0404	-0,0035
AG20	-0,0047	0,0173	0,0527	0,0283
AG23	<b>0,115*</b>	0,0591	<b>0,1294*</b>	0,0256
AG56	0,0169	0,018	0,0011	-0,0354
CRCA1	-0,0622	0,0432	-0,0268	0,0271
AG62	<b>0,1274*</b>	<b>0,1731*</b>	<b>0,1085*</b>	0,0248
CRCA2	0,0342	0,0477	0,0514	-0,0076
AG45	<b>0,1171*</b>	<b>0,2173*</b>	<b>0,1717*</b>	<b>0,0964*</b>

\* = presença de alelos nulos, significativo a 95%.

### 5.2.3 Índices de diversidade

A população de *Araucaria angustifolia* da Coxilha Rica apresentou alto nível de diversidade genética para os oito locos microssatélites analisados. Para os oito locos em todos os 486 indivíduos (adultos, jovens e plântulas) e progênies de *Araucaria*

*angustifolia*, foram identificados 87 alelos, indicando alto polimorfismo. O número de alelos por loco variou de cinco (Ag45) à 16 (Ag94), com uma média de 11 alelos por loco: Ag94 - 16 alelos, Ag 20 - 13 alelos, Ag 23 - 13 alelos, Ag56 - 12 alelos, CRCA1 - 10 alelos, Ag62 - 7 alelos, CRCA2 - 11 alelos, Ag45 - 5 alelos. A partir da análise de frequências alélicas observou-se que para o loco Ag94, todas as gerações apresentaram um alelo exclusivo, para o loco Ag20 os adultos apresentaram 3 alelos exclusivos e os jovens e plântulas um, para o loco Ag23 os adultos apresentaram 4 alelos exclusivos e as progênies 1, para o loco Ag56 os adultos apresentaram 3 alelos exclusivos e as progênies 1, para os locos CRCA1 e Ag62 as progênies apresentaram 1 alelo exclusivo, para o loco CRCA2 os jovens apresentaram 1 alelo exclusivo e para o loco Ag45 os adultos e as progênies mostraram apenas 1 alelo exclusivo (Tabela 7). Em todas as situações de ocorrência os alelos exclusivos apresentaram baixa frequência.

Pode-se notar que os indivíduos adultos apresentaram mais alelos exclusivos do que as outras gerações, podendo indicar desta forma, que nem todos os adultos da parcela participaram do processo reprodutivo nestes determinados espaços temporais, ou não estão representados dentro da amostragem de plântulas e progênies, ou da geração de jovens analisada. Outro fator evidente são os alelos exclusivos das progênies, em maior quantidade por segundo lugar, seguido dos jovens e plântulas. Este resultado ressalta a polinização por indivíduos que estão fora da parcela (imigrantes), ou imigração via sementes.

Sant'anna (2011) encontrou 86 alelos com nove locos microssatélites em remanescente de floresta contínua, considerado conservado, enquanto que na paisagem de campo com idade mais recente com oito locos microssatélites iguais foi encontrado 87 alelos. Esta é uma das evidências importantes da diferença entre as paisagens, a Araucária no campo apresentando maior riqueza alélica pode servir de fonte de manutenção entre capões e matas de galerias, levando a diversidade até o ambiente de contínuo florestal. A autora também verificou presença de alelos exclusivos na maioria dos locos (Aang01, Ag23, Ag62, Ag94, CRCA1 e CRCA2) e encontrou apenas um loco com alelos exclusivos nos juvenis, indicando um menor número de imigrantes em ambiente florestal comparando com o estudo em paisagem de campo.

A baixa frequência dos alelos exclusivos nos adultos pode também estar relacionada ao passado, muitos alelos podem ter sido perdidos por deriva genética, como consequência da redução do número

de árvores pela intensa exploração madeireira da região. Segundo Carvalho (2010) durante o auge de exploração das Florestas com Araucária, a melhoria de estradas e o aumento no número e na capacidade de caminhões transportadores foram fatores importantes para a região de Lages se tornar nas décadas de 1940 e 1950 um dos principais (senão o principal) centros de produção madeireira da região da Araucária.

Com quatro locos microssatélites (Ag20, Ag45, Ag94 e CRCA2) coincidentes com este trabalho, Stefenon *et al.* (2007) encontraram número de alelos de 18, 7, 13, e 14 respectivamente, para seis populações de *A. angustifolia* e especificamente para a população de SC este número foi de 11, 3, 7 e 8, com tamanho amostral de 63 indivíduos. Enquanto que neste estudo, com 486 amostras, foram encontrados 13, 5, 16 e 11, respectivamente, valores mais próximos ao total das seis populações (384) e superior a amostragem feita em SC. O estudo de Sant'anna (2011), com 513 indivíduos em fragmento de floresta, apresentou 8, 3, 15 e 12 para os mesmos locos. A discrepância entre locos provavelmente se deve a grande abrangência geográfica das populações dos diferentes autores, em SP, PR, SC e RS, e ainda a diferença de paisagem da floresta em estudo.

Patreze & Tsai (2010) em 105 indivíduos em Campos do Jordão com os locos Ag23 e Ag56 detectaram 18 e 9 alelos, enquanto que no estudo atual foram 13 e 12. Já Salgueiro *et al.* (2005) em três populações (RJ, PR e SC) com 60 indivíduos com os mesmos locos deste trabalho (Ag20, Ag23, Ag45, Ag56, Ag62, Ag94, CRCA1 e CRCA2) encontraram número de alelos por loco de 8, 7, 3, 6, 11, 10, 4 e 8. Os valores deste estudo foram maiores (13, 13, 5, 12, 7, 16, 10 e 11), com exceção apenas do loco Ag62, provavelmente pela diferença do tamanho amostral e por incluir progênies, que teoricamente apresentam imigração de alelos. Os valores encontrados por Sant'anna também foram superiores ou iguais 8, 11, 3, 6, 4, 15, 5 e 12 com amostragem maior (513 indivíduos). Já no trabalho de Bittencourt & Sebbenn (2007) para 7 locos iguais (Ag20, Ag23, Ag45, Ag56, Ag62, CRCA1 e CRCA2) apresentaram 12, 19, 9, 13, 20, 8 e 16 alelos, valores superiores possivelmente pelo elevado número amostral (1370 indivíduos). Estes resultados podem ser observados na tabela x.

**Tabela 7.** Número de alelos encontrados para *Araucaria angustifolia* através dos marcadores microssatélites, por diferentes autores.

Referências	Populações	N	Ag20	Ag23	Ag45	Ag56	Ag62	Ag94	CRCA1	CRCA2
Salgueiro <i>et al.</i> (2005)	3 (RJ, PR, SC)	60	8	7	3	6	11	10	4	8
Stefenon <i>et al.</i> (2007)	6	384	18	--	7	--	--	13	--	14
Stefenon <i>et al.</i> (2007)	1 (SC)	63	11	--	3	--	--	7	--	8
Bittencourt & Sebbenn (2007)	1 (PR)	1370	12	19	9	13	20	--	8	16
Patreze & Tsai (2010)	1 (SP)	105	--	18	--	9	--	--	--	--
Sant'anna (2011)	1 (SC)	513	8	11	3	6	4	15	5	12
Presente estudo	1 (SC)	486	13	13	5	12	7	16	4	11

**Tabela 8.** Frequências alélicas para oito locos microsatélites, em indivíduos Adultos, Jovens, Plântulas e Progênesis, de *Araucaria angustifolia*, provenientes de paisagem de campo, Coxilha Rica (Lages-SC).

Ag94	Adultos	Jovens	Plântulas	Progênesis	Ag20	Adultos	Jovens	Plântulas	Progênesis
159	0,046	0,052	0,042	0,060	257	0,007	0	0	0
169	0,050	0,058	0,10	0,050	259	0,007	0	0	0
171	0,160	0,145	0,20	0,166	261	0	0,006	0	0
173	0,145	0,140	0,084	0,185	265	0,018	0,040	0,037	0,013
175	0,106	0,163	0,068	0,093	267	0,082	0,080	0,096	0,091
177	0,039	0,012	0,016	0,023	269	0,336	0,420	0,383	0,342
179	0,145	0,151	0,084	0,106	271	0,282	0,210	0,234	0,262
181	0,099	0,093	0,089	0,096	273	0,150	0,159	0,170	0,138
183	0,025	0,035	0,047	0,070	275	0,093	0,045	0,064	0,124
185	0,050	0,058	0,011	0,023	277	0,018	0,006	0,011	0,020
187	0,128	0,076	0,237	0,126	279	0,004	0,034	0	0,010
189	0,004	0,012	0,005	0	281	0,004	0	0	0
191	0,004	0	0	0	283	0	0	0,005	0
193	0	0	0,016	0					
195	0	0	0	0,003					
203	0	0,006	0	0					
<b>Exclusivos</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>Exclusivos</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
Ag23	Adultos	Jovens	Plântulas	Progênesis	CRCA2	Adultos	Jovens	Plântulas	Progênesis
249	0,014	0	0	0	199	0	0,006	0	0
259	0	0	0	0,003	201	0,025	0,028	0,000	0,017
261	0,011	0,006	0,005	0,003	203	0,525	0,539	0,580	0,561
265	0,007	0	0	0	205	0,018	0,028	0,034	0,010
267	0	0,006	0,010	0	207	0,148	0,124	0,092	0,139
269	0,533	0,511	0,573	0,344	209	0,060	0,062	0,069	0,108
271	0,120	0,128	0,151	0,194	211	0,025	0,017	0,006	0,034
273	0,152	0,2	0,104	0,207	213	0,074	0,118	0,121	0,091
275	0,080	0,061	0,047	0,150	215	0,053	0,067	0,069	0,024
277	0,018	0,033	0,047	0,034	217	0,063	0,011	0,023	0,017
279	0,058	0,056	0,063	0,065	219	0,011	0	0,006	0
281	0,004	0	0	0					
287	0,004	0	0	0					
<b>Exclusivos</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>Exclusivos</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Ag56	Adultos	Jovens	Plântulas	Progênesis	CRCA1	Adultos	Jovens	Plântulas	Progênesis
132	0,007	0	0	0	212	0	0	0	0,004
134	0,003	0	0	0	216	0,003	0,006	0	0,004
162	0,003	0	0	0	218	0,003	0	0	0,007
164	0,003	0	0	0,010	220	0	0,006	0	0,004
166	0	0	0	0,013	222	0	0,006	0	0,007
168	0,024	0,023	0,026	0,056	224	0,014	0	0,011	0,014
170	0,155	0,149	0,224	0,191	226	0,014	0	0	0,007
172	0,183	0,144	0,224	0,243	228	0,938	0,933	0,974	0,942
174	0,190	0,190	0,151	0,230	230	0,027	0,039	0,016	0,011
176	0,362	0,425	0,328	0,194	232	0	0,011	0	0
178	0,062	0,069	0,042	0,059					
180	0,003	0	0,005	0,003					
<b>Exclusivos</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>Exclusivos</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
Ag62	Adultos	Jovens	Plântulas	Progênesis	Ag45	Adultos	Jovens	Plântulas	Progênesis
126	0	0	0	0,004	170	0,040	0,040	0,048	0,040
128	0	0,006	0	0,004	180	0	0	0	0,003
130	0,043	0,098	0,097	0,046	182	0,239	0,233	0,255	0,233
132	0,734	0,667	0,704	0,739	184	0,713	0,727	0,697	0,723
134	0,076	0,063	0,075	0,054	186	0,007	0	0	0
136	0,076	0,092	0,065	0,064					
138	0,072	0,075	0,059	0,089					
<b>Exclusivos</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>Exclusivos</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>



A heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi maior que a observada em todos os locos, variando de 0,105 (CRCA1) à 0,887 (Ag94), com média de 0,601 (tabela 8) A heterozigosidade observada variou de 0,102 (CRCA1) à 0,858 (Ag94), com média de 0,539. O índice de fixação variou de 0,014 (Ag56) à 0,312 (Ag45), com média 0,102.

A maioria dos valores de diversidade genética obtidos com marcadores microssatélites (tabela 1) foram altos, semelhantes ao estudo, porém é importante ressaltar a diferença entre os tamanhos amostrais, número e diferença entre locos microssatélites utilizados. Outro aspecto importante a considerar, é a paisagem de campo, especificamente estudada pela primeira vez neste trabalho, mostrou uma diversidade genética alta, comparando-se aos outros estudos da espécie, dentro de uma área de 9 hectares e naturalmente com baixa densidade de indivíduos adultos, muito diferente da paisagem de floresta ou fragmento florestal.

Além destes, outros trabalhos como o de Zechini *et al.* (2011) com 31 populações (1.550 indivíduos adultos) de *A. angustifolia* no Estado de Santa Catarina, encontraram 37 alelos, índice de fixação positivo de 0,28 para todas as populações e divergência genética significativa ( $G_{ST}=0,15$ ), sugerindo os resultados pela fragmentação e histórico de diminuição das populações. Sujii *et al.* (2008) também encontrou um valor de índice de fixação positivo (0,19) para 262 indivíduos de SC e RS e  $H_e$  de 0,83, associando e evidenciando o efeito negativo da fragmentação, apontando para a possível perda de riqueza alélica comprometendo a longevidade da população.

Para a mesma região do estudo, Coxilha Rica, Zechini (2012) encontrou elevado índice de fixação (0,232), porém com amostragem diferencial, 59 indivíduos coletados aleatoriamente e analisados com marcadores isoenzimáticos. Este resultado pode estar relacionado ao tamanho amostral e o menor número de alelos encontrados com este marcador.

**Tabela 9.** Diversidade genética e endogamia na população de *Araucaria angustifolia*, na Coxilha Rica.  $n$  é o tamanho da amostra,  $k$  é o número total de alelos,  $\hat{H}_e$  é a heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg,  $\hat{H}_o$  é a heterozigosidade observada e  $f$  é o índice de fixação.

População	n	k	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	$f$
<b>Ag94</b>	473	16	0,887	0,858	0,032
<b>Ag20</b>	471	13	0,765	0,732	0,043
<b>Ag23</b>	471	13	0,708	0,581	0,178*
<b>Ag56</b>	480	12	0,786	0,775	0,014
<b>CRCA1</b>	469	10	0,105	0,102	0,027
<b>Ag62</b>	459	7	0,467	0,348	0,253*
<b>CRCA2</b>	466	11	0,662	0,626	0,053
<b>Ag45</b>	468	5	0,429	0,294	0,312*
<b>Média</b>	469	11	0,601	0,539	0,102
<b>Total</b>	486	87	--	--	--

$P < 0,05$

Na tabela 9, pode-se observar os valores de diversidade genética para as diferentes gerações (adultos, jovens, plântulas e progênies). A heterozigosidade observada oscilou entre 0,493 (plântulas) à 0,588 (progênies), e a heterozigosidade esperada variou de 0,58 (plântulas) à 0,607 (progênies). As estimativas de  $F_{ST}$  (0,006; com IC=0-0,012 à 95%) indicaram baixa diferenciação genética entre as gerações. Em relação à dinâmica da endogamia entre gerações, o  $F_{IS}$ <sup>1</sup> indicou ausência de endogamia na população, evidenciando a alogamia da espécie. Este foi recalculado para corrigir o  $F_{IS}$ , levando em conta somente os locos com ausência de alelos nulos, para evitar falsas estimativas. Para a população, o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EW) não apresentou desvios significativos após correção de Bonferroni (0,00156) sugerindo que a população adere ao EHW.

**Tabela 10.** Índices de diversidade genética na população de *Araucaria angustifolia*, na Coxilha Rica, para cada geração (adultos, jovens, plântulas e progênes).  $n$  é o tamanho da amostra,  $\hat{A}$  é o número efetivo de alelos nos locos,  $\hat{H}_e$  é a heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg,  $\hat{H}_o$  é a heterozigosidade observada,  $F_{IS}$  é o índice de fixação e  $F_{IS}^{-1}$  é o índice de fixação excluindo locos segregantes para alelos nulos.

População	n	$\hat{A}$	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	$F_{IS}$	$F_{IS}^{-1}$
Adultos	140	9,00	0,598	0,536	0,1041*	0,0243 ( $\pm 0,003$ )
Jovens	88	7,00	0,6	0,513	0,1442*	0,0718 ( $\pm 0,004$ )
Plântulas	93	7,62	0,58	0,493	0,1532*	0,0705 ( $\pm 0,005$ )
Progênes	147	8,25	0,607	0,588	0,0337	0,0167 ( $\pm 0,002$ )
Média	117	7,96	0,596	0,533	0,0337	0,0167
Total	468	--	--	--	--	--

$P < 0,05$

#### 5.2.4 Taxa de cruzamento

A taxa de cruzamento multilocos foi  $t_m=1$  e uniloco  $t_s=0,966$ . A diferença entre essas taxas foi baixa, mas significativamente diferente de zero ( $t_m-t_s= 0,034$ ), sugerindo uma baixa proporção de acasalamento entre indivíduos aparentados. A taxa de autofecundação é zero, pois a espécie é dióica e todos os indivíduos avaliados na população eram exclusivamente femininos. A estimativa do número de plantas doadoras de pólen foi de 16,39, considerada baixa comparado com Ferreira *et al.* (2011) que encontrou 250 e 55, 6 para duas populações de Santa Catarina com alta densidade de indivíduos por hectare. Mantovani *et al.* (2006) observaram uma taxa de cruzamento alta (0,956) esperada para uma espécie dióica, no entanto, foi diferente de um (1,0), indicando que 5,8% dos cruzamentos acontecem entre indivíduos aparentados, e corroborando com a presença de estrutura genética interna. Patreze & Tsai (2010) também verificou alta taxa de cruzamento (0,991), mesmo assim com cruzamento entre aparentados.

**Tabela 11.** Parâmetros do sistema de cruzamento de *Araucaria angustifolia* na Coxilha Rica, Lages-SC.

<b>Sistema de cruzamento</b>	
Taxa de cruzamento multiloco: $\hat{t}_m$	1 (0) <sup>a</sup>
Taxa de cruzamento uniloco: $\hat{t}_s$	0,966 (0,009) <sup>a</sup>
Cruzamento entre parentes: $\hat{t}_m - \hat{t}_s$	0,034 (0,009) <sup>a</sup>
Taxa de autofecundação: $\hat{S} = 1 - \hat{t}_m$	0
Correlação de paternidade multiloco: $\hat{r}_p$	0,061 (0,0017) <sup>a</sup>
Nº médio de doadores de pólen: $1/\hat{r}_p$	16,39

a = erro padrão da média

### 5.3 Análise de parentesco e fluxo gênico

#### 5.3.1 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 para o teste de paternidade das progênies, com as mães conhecidas, foi de 0,00006, ou seja o conjunto dos oito locos analisados apresentou um poder de exclusão de 0,99993. Para as plântulas, para o par de parentes desconhecidos, mas com o sexo conhecido, o poder de exclusão foi de 0,9997 e para os indivíduos jovens o poder de exclusão foi de 0,9998. Este resultado encontrado revela que os locos microssatélites utilizados permitem estimativas estatisticamente precisas de vínculo genético entre os indivíduos, com alto poder informativo para análises confiáveis de parentesco.

### 5.3.2 Fluxo de pólen e sementes

A taxa de imigração de pólen e sementes no fragmento ( $m$ ) foi calculada como a proporção de indivíduos que não tiveram um candidato a pai ou mãe determinado dentro da população ( $n_{imigrante}$ ) em relação ao número total de indivíduos amostrados ( $n_{total}$ ),  $m = n_{imigrante}/n_{total}$  (Burczyk *et al.*, 2004.). Para as progênes 35 pais não foram identificados dentro da parcela, sendo o fluxo de pólen de aproximadamente 23%, considerado alto pelo tamanho da parcela e distância entre os capões. No caso das plântulas e jovens, não foram identificados 19 e 25 pais dentro da parcela, gerando um fluxo de pólen de 20% e 26%, respectivamente. Para o teste de maternidade, não foram identificadas 26 mães da geração de plântulas e 24 para a geração de jovens, gerando um fluxo de sementes de 27% e 26%. Neste caso, os resultados indicaram valores quase iguais de fluxo de pólen e de sementes, o que pode ser explicado pela polinização anemófila e dispersão zoocórica da espécie. Na polinização pelo vento, os padrões de fluxo gênico dependem em grande parte do acaso (Richards, 1997).

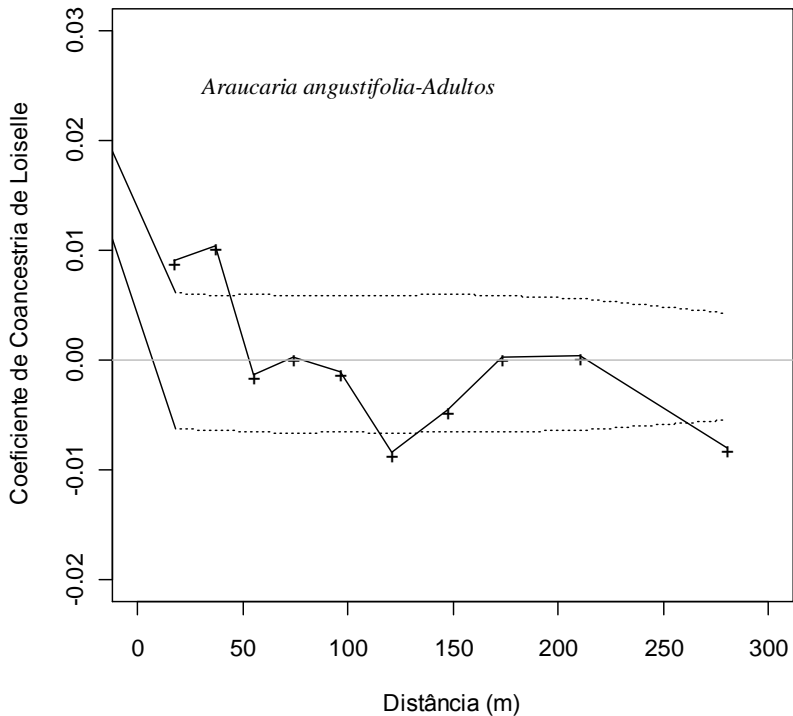
### 5.3.3 Fluxo gênico crítico

Para as progênes o número foi alto, 53 indivíduo podem ter sido identificados erroneamente como pai. Nas plântulas, para maternidade foi 1,28 e para paternidade 1,41. Já nos indivíduos jovens, para maternidade foi 0,62 e paternidade 0,92.

## 5.4 Estrutura genética espacial

A estrutura genética espacial para os adultos foi significativa até a distância aproximada de 37 m (figura 7), sugerindo que árvores que ocorrem distantes entre si até esta distância, possam apresentar grau de parentesco, ou seja, semelhantes geneticamente. O coeficiente de coancestria estimado na primeira classe para os adultos foi de 0,0091 e na segunda 0,0104. Árvores vizinhas apresentam vantagem na polinização pela curta distância, porém isso não aconteceu a partir dos 37 metros nos indivíduos adultos. Valor aproximado de distância foi encontrado por Patreze & Tsai (2010) em uma parcela de 10ha em população natural de Campos do Jordão, com estrutura significativa até 25 metros (primeira classe) em 105 adultos de *Araucaria angustifolia*,

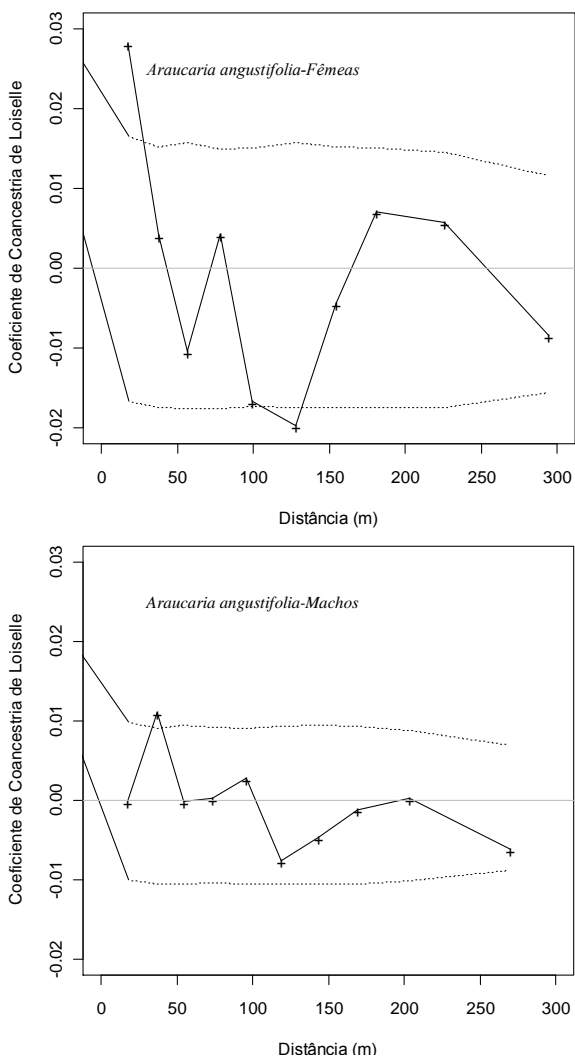
enquanto que Mantovani *et al.* (2006), para mesma área com marcadores isoenzimáticos encontrou a 70 metros.



**Figura 7.** Estrutura genética espacial nos indivíduos adultos de *Araucaria angustifolia* na Coxilha Rica. A linha contínua refere-se a estimativa do coeficiente de coancestria 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. ( $H_0: \theta_{xy} = 0$ ).

Analisando separadamente os indivíduos adultos fêmeas e machos, obteve-se valores significativos até a distância de 17m para as fêmeas e na distância de 36m para os machos (figura 8). Este resultado pode ter ocorrido pelo número inferior de fêmeas (57) e superior de machos (93). O coeficiente de coancestria estimado para os machos na

segunda classe foi de 0,0111 e nas fêmeas na primeira classe foi de 0,0281.



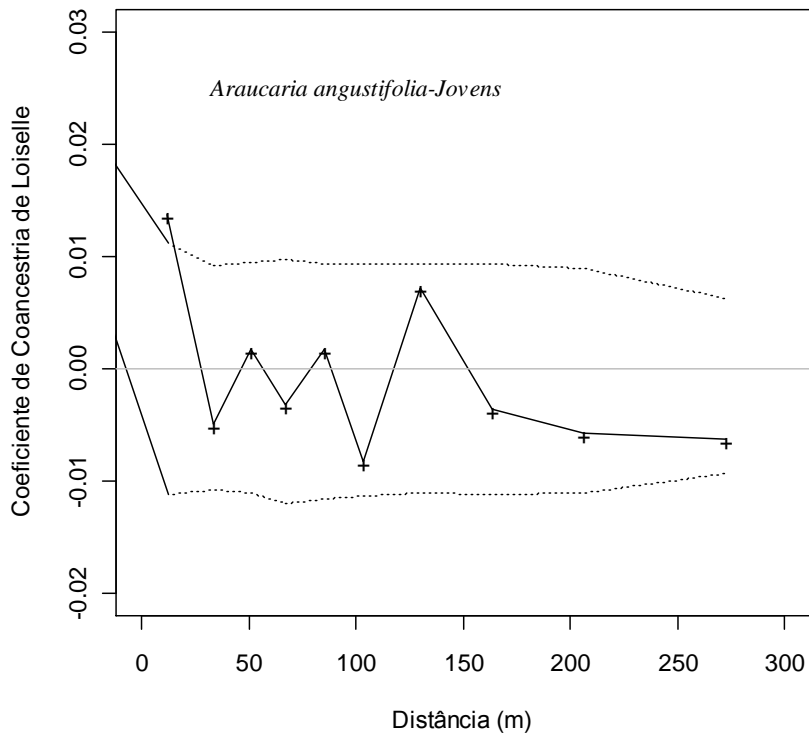
**Figura 8.** Estrutura genética espacial nos indivíduos machos e fêmeas de *Araucaria angustifolia* na Coxilha Rica. A linha contínua refere-se a estimativa do coeficiente de coancestria médio e as linhas pontilhadas referem-se a estimativa do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade da hipótese de ausência de estrutura genética.

Para os indivíduos jovens a estrutura genética espacial foi significativa até a distância aproximada de 11 m (figura 9), evidenciando uma mudança no fluxo gênico para as gerações mais recentes. O coeficiente de coancestria estimado na primeira classe foi de 0,0138. Resultados diferentes encontraram Stefenon *et al.* (2008) relatando níveis mais elevados de estrutura genética espacial na população com maior quantidade de indivíduos juvenis, como esperado para espécies com dispersão de sementes agregada. Por outro lado, Stefenon *et al.* (2007) em cinco populações de adultos encontrou dispersão de genes muito maior e baixa divergência genética, atribuindo ao transporte antropogênico de sementes e transporte de pólen em um modelo de trampolim entre os fragmentos.

Distância de dispersão de pólen e estrutura genética em fina escala de *A. angustifolia* foram analisados por Bittencourt e Sebbenn (2008). Dentro da área estudada por estes autores, *A. angustifolia* manifestou uma estrutura genética espacial significativa em distâncias até 75 m. Com base na análise de paternidade, a distância calculada da polinização média foi de 102 m, e o número efetivo de doadores de pólen foi de 6,4 machos, o que corresponde a uma área efetiva de polinização de 2,1 ha. Os autores concluíram que estes resultados implicam longa distância de dispersão de pólen dentro de florestas contínuas. Entretanto, a proporção mais elevada ocorreu a curtas distâncias, produzindo desse modo o acasalamento biparental (Bittencourt e Sebbenn, 2008).

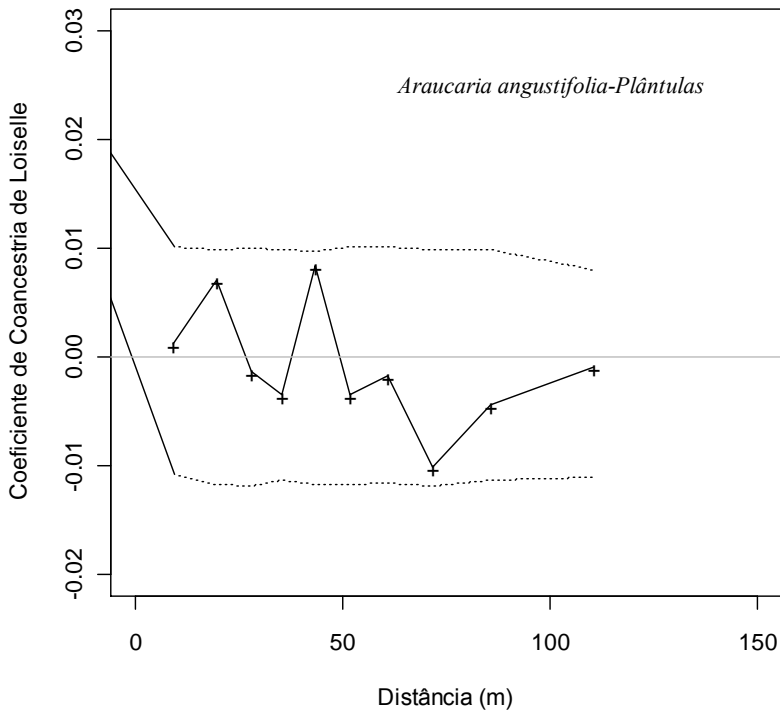
Stefenon *et al.* 2009 afirma que mesmo que a atual estrutura genética das populações de *A. angustifolia* seja provavelmente muito fortemente afetada pelos longos eventos evolutivos, a exploração da floresta durante os últimos 100 anos, pode ter contribuído para moldar a estrutura genética observada e a diversidade nos remanescentes florestais.





**Figura 9.** Estrutura genética espacial na geração de jovens de *Araucaria angustifolia* na Coxilha Rica. A linha contínua refere-se a estimativa do coeficiente de coancestria 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.

Já a geração de plântulas (figura 10) não apresentou estrutura genética espacial significativa, evidenciando novamente maior fluxo gênico nas gerações recentes. O coeficiente de coancestria foi de 0,0012.



**Figura 10.** Estrutura genética espacial na geração de plântulas de *Araucaria angustifolia* na Coxilha Rica. A linha contínua refere-se a estimativa do coeficiente de coancestria 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.

Estes resultados indicam que da geração de adultos até as gerações mais recentes houve um declínio da estrutura de família, diminuindo já na geração de jovens (até 11 metros) e não sendo encontrada na amostragem parcial de plântulas da parcela. Fato este, que pode ser discutido pelo histórico da área e pela formação da paisagem de campo. A região da Coxilha Rica foi intensamente explorada pela madeira, com o último corte seletivo há 35 anos. Mantovani *et al.* (2006) afirma que a existência e o nível de estruturação genética dentro das populações varia entre estas, dependendo das histórias de ocupação,

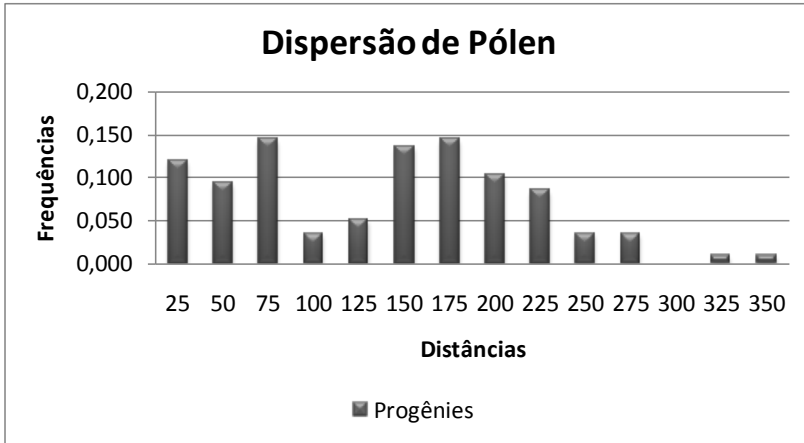
já que a densidade de indivíduos nos remanescentes da espécie é variável.

Os atuais adultos da parcela provavelmente foram originados em diferentes eventos reprodutivos, como evidenciado anteriormente pelos valores de DAP, nos quais os valores entre 20-30 cm podem corresponder à idade de 29 a 44 anos, considerando as estimativas de Sebbenn *et al.* (2004). No caso deste estudo, a maioria dos indivíduos apresenta entre 30 e 40 cm de DAP, devendo ter idade superior a 60 anos. Segundo Carvalho (2010) nesta época, no ano de 1954, só em Lages haviam 154 serrarias e delas saíam fileiras de caminhões carregados de madeira de Araucária. Durante essa intensa exploração possivelmente haviam menos indivíduos polinizadores do que hoje devido ao corte, originando cruzamento entre parentais ao longo do tempo, o que explicaria a estrutura genética nos adultos.

Além disso, a formação dos capões está sempre em expansão e com a proibição do corte a tendência é o aumento dos capões e das possibilidades de fluxo gênico, o que foi evidenciado ao analisar a geração de jovens e de plântulas, a primeira com diminuição da estrutura (11 m) em relação aos adultos e a segunda que já não apresenta estrutura em família. Outra possibilidade de entrada de alelos é o fluxo de sementes, com a pausa do corte da Araucária e aumento do número de árvores, abre espaço para fauna ir à busca de recursos. Estudos acerca dos campos demonstram tendências de avanço florestal sobre estes, protegidos em relação ao pastejo e à queima, em áreas de ecótono de formações florestais e campestres (Oliveira & Pillar, 2004). A imigração dos elementos florestais evidencia-se pela observação da forma dos contornos florestais em contato com o campo e das florestas de galeria ao longo dos cursos de água, assim como pela presença dos capões inseridos na matriz campestre como núcleos de expansão florestal (Oliveira & Pillar, 2004).

#### 5.4.1 Dispersão de pólen

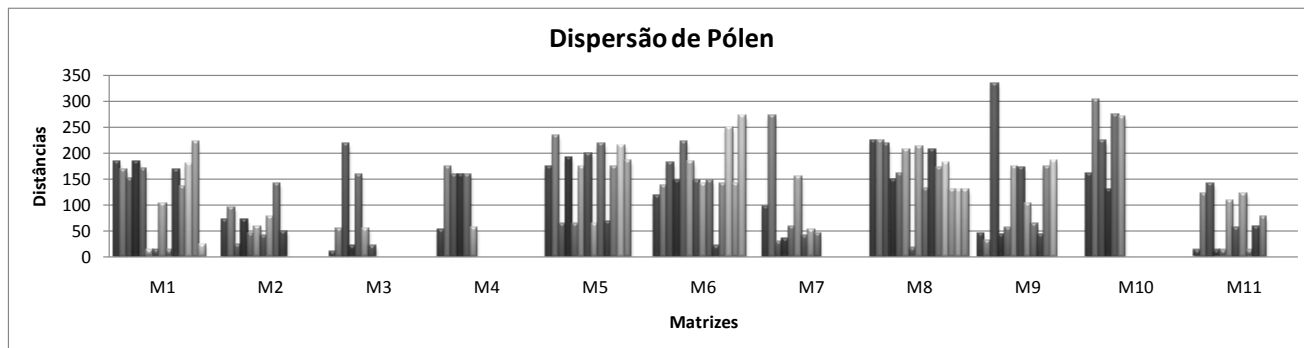
A distância de dispersão de pólen, obtida através da análise de paternidade das 152 progênies oriundas de 11 matrizes, teve média de 125 metros e maior frequência nas classes de 75 e 175 metros (figura 11), com distâncias entre 9,84 e 334 metros (figura 12).



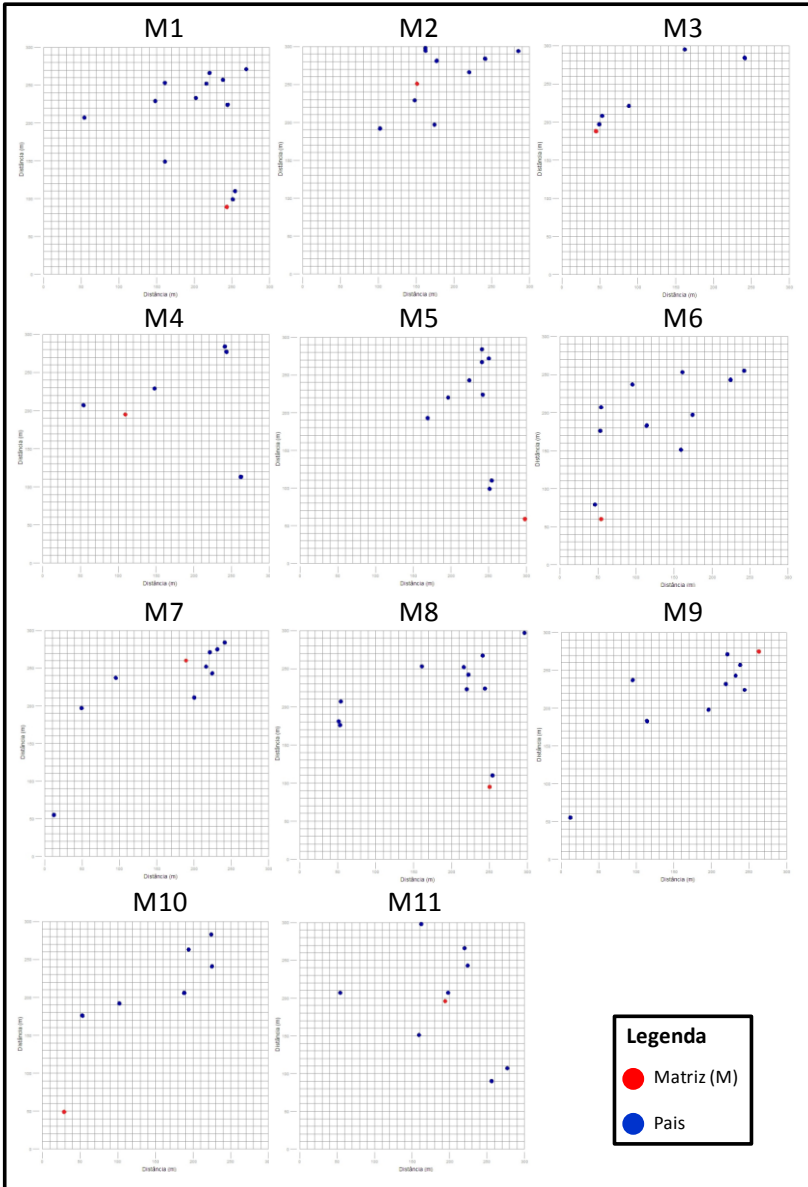
**Figura 11.** Frequências das distâncias de dispersão de pólen obtidas através dos genótipos das mães e dos pais da geração de progênies de *Araucaria angustifolia* na paisagem de campo da Coxilha Rica (Lages-SC).

Observando o mapa de localização das 11 matrizes dentro da parcela com os respectivos pais das progênies (figura 13), pode-se observar que está ocorrendo fluxo de pólen de diversas áreas dentro da parcela. As trocas ocorreram entre todos os capões e as maiores trocas ocorrem no capão C, maior e com maior número de indivíduos, provavelmente pela proximidade das árvores e prolongação deste fora da parcela. As longas distâncias de dispersão de pólen na área podem estar ocorrendo devido à alta variação de intensidade e direções do vento na região, sendo facilitada também pela própria separação dos capões por campo.

Na análise de paternidade foram encontrados pais para 117 progênies, sendo o restante vindo de imigração para dentro da parcela (35 pais). Dos 93 pais polinizadores, 54 participaram da amostra do evento reprodutivo, os outros 39 podem não ter sido amostrados nas sementes. Um fator importante a ser observado é a posição das matrizes na parcela, a maioria delas está posicionada mais próximo às bordas do que ao centro (Figura 2), favorecendo trocas externas.



**Figura 12.** Distâncias de dispersão de pólen obtidas através das progêneses. M1(matriz com 17 progêneses), M2 (matriz com 14 progêneses), M3 (matriz com 14 progêneses), M4 (matriz com 14 progêneses), M5 (matriz com 15 progêneses), M6 (matriz com 17 progêneses), M7 (matriz com 12 progêneses), M8 (matriz com 17 progêneses), M9 (matriz com 14 progêneses), M10 (matriz com 9 progêneses) e M11 (matriz com 11 progêneses).



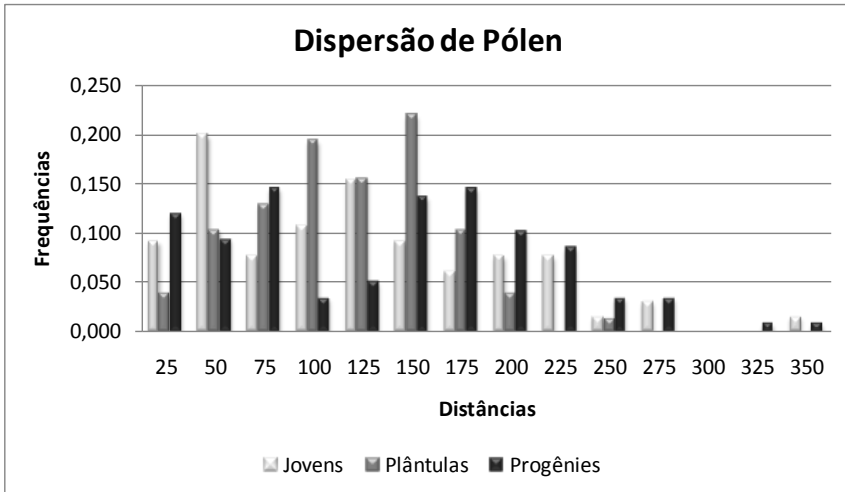
**Figura 13.** Localização das 11 matrizes dentro da parcela com os respectivos pais das progênies. Em vermelho as matrizes e em azul os pais.

Paralelamente foram encontrados valores de dispersão de pólen obtidos por meio da geração de plântulas e de jovens. Via plântulas foram encontrados valores entre 5,38 e 231 metros, com média de 103 metros e maior frequência na classe de 150 metros, seguida de 100 metros (Figura 14). Via jovens, os valores de dispersão de pólen foram de 11,39 à 337 metros, com média de 111 metros e frequência maior na classe de 50 metros (figura 14).

Entre as 3 gerações, as distâncias e média de dispersão do pólen foram semelhantes em média e distâncias, mas variaram na frequência, fator este que pode ser explicado pela dispersão anemófila, com forte efeito estocástico. Esta variação na frequência ocorre até aproximadamente 225 metros, mostrando um padrão diferenciado nesta paisagem.

A *Araucaria angustifolia* no estado do Paraná mostrou uma distância de dispersão de pólen em torno de 100 metros no interior de uma floresta contínua; no entanto, a alta proporção de dispersão ocorre em curta distância produzindo biparentais bem como reduzindo o tamanho efetivo (Bittencourt & Sebbenn, 2007).

Em estudos de *Araucaria araucana*, em uma população semelhante à de paisagem de campo com capões, com aberturas naturais entre a floresta, incluindo presença natural de fogo, Moreno (2012) encontrou distâncias maiores de dispersão de pólen (90 a 10.000 metros) maiores do que as encontradas na outra população de floresta contínua do mesmo estudo (17,42 a 5.163 metros). O pólen da *Araucaria angustifolia* (87 $\mu$ m) é maior e mais pesado que o pólen da *Araucaria araucana* (74 $\mu$ m), provavelmente por isso as distâncias de fluxo são inferiores, entretanto, apresentam a também diferença de distâncias de fluxo entre paisagem contínua e interrompida (Moreno, 2012).



**Figura 14.** Frequências das distâncias de dispersão de pólen obtidas através dos genótipos das mães e dos pais das gerações de progênes, plântulas e jovens de *Araucaria angustifolia* na paisagem de campo da Coxilha Rica (Lages-SC).

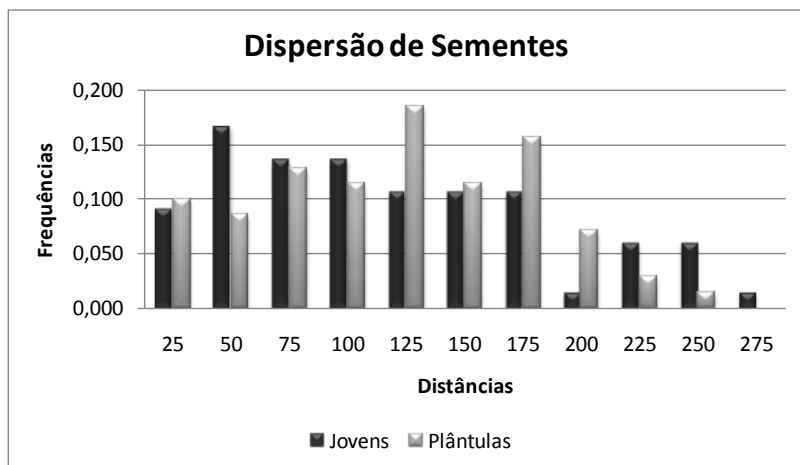
Na polinização é muito importante a direção e velocidade dos ventos, quando muito fortes nem sempre são benéficos, podendo levantar o pólen muito acima das árvores e quando muito fracos, a massa de pólen cairá. Segundo Mattos (1994), para a polinização em *A. angustifolia*, a melhor velocidade dos ventos é de 7km por hora em média, além disso, as rajadas também são importantes, como são irregulares, provocam o balanço dos galhos, desprendendo o pólen.

Os ventos assolam a parte superior e os bordos das florestas, mas seu interior fica praticamente protegido. A movimentação do ar dentro da floresta é de pouca expressão, assim a temperatura média dentro da mata é mais constante que no campo aberto. As temperaturas muito baixas que ocorrem no inverno, no campo, não atingem com a mesma intensidade no interior da mata (Mattos, 1994). 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).



#### 5.4.2 Dispersão de sementes

Na distância de dispersão de sementes gerada através das plântulas, os valores ficaram entre 7,32 e 237 metros, com média de 109 metros e maior frequência a 125 metros. Os valores obtidos avaliando a geração de jovens ficaram entre 0,90 e 290 metros, com média de 104 metros e maior frequência na classe dos 50 metros (Figura 15). A geração de jovens apresentou estrutura significativa até 11 metros, o que pode ser esperado pelo fato de ocorrer maior frequência de dispersão de sementes até 50 metros, nas menores classes. Por outro lado, na geração de plântulas as distâncias foram maiores, o que condiz com a ausência de estrutura familiar. Da mesma forma que a dispersão de pólen, a dispersão de sementes segue um padrão diferenciado de variação até 175 metros.



**Figura 15.** Frequências das distâncias de dispersão de sementes obtidas através dos genótipos das mães e das gerações plântulas e jovens de *Araucaria angustifolia* na paisagem de campo da Coxilha Rica (Lages-SC).

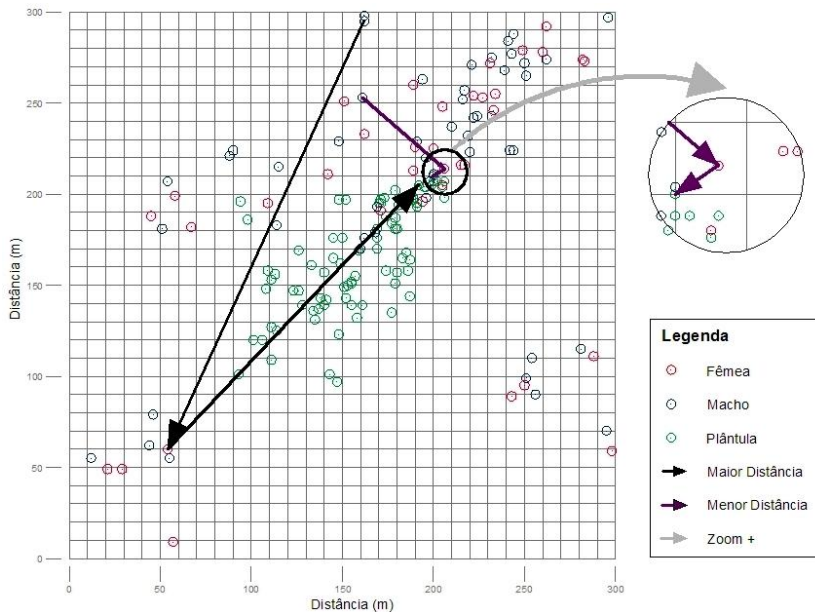
Bittencourt & Sebbenn (2007) encontraram distância de dispersão de sementes de *A. angustifolia* variando de 0,35 até 291 m sendo que 47% ficaram dentro de um raio de 60 metros ao redor da planta-mãe. Sant'anna (2011), também com *A. angustifolia* encontrou uma distância média observada do vizinho mais próximo para adultos de 7,66 m e para juvenis 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. Assim, os autores mencionados, observaram que na espécie a dispersão de sementes é mais limitada do que a de pólen.

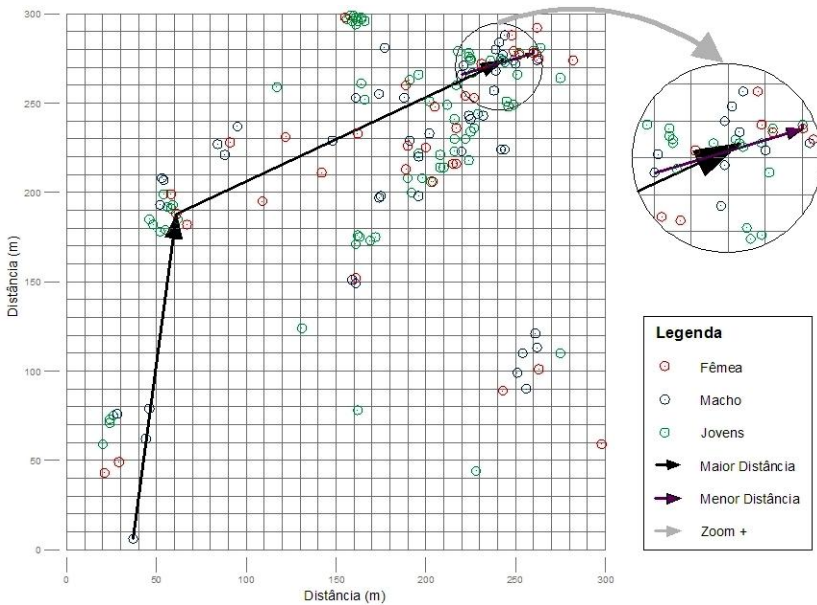
A distância de dispersão de sementes foi menor do que a de pólen, o que já é esperado e observado para a espécie, se repetindo na paisagem de campo. Entretanto, também foram encontradas grandes distâncias, sugerindo a presença de fauna, esta já registrada visualmente (veado-campeiro, gralha azul) e por vestígios na parcela (roedores), além da confirmação de presença de Cutias pelo proprietário. Mesmo que ocorra a presença diária do gado na parcela, esta é rotativa, possibilitando a busca de alimento pela fauna no local, além disso, há presença de muitas aves na região que podem carregar as sementes entre os capões e campo. A presença de indivíduos de espécies florestais estabelecidos na matriz campestre é observada com frequência, sendo esse processo associado à dispersão zoocórica, principalmente por aves (Duarte *et al.*, 2006), o que é registrado em alguns pontos dentro da parcela em estudo. Outro estudo que revela a eficiência da dispersão por animais, quando estes estão presentes na área é o de Cruz & Valiati (2008) que no Rio Grande do Sul, verificaram plântulas de araucária em reflorestamentos de *Pinus* sp e *Eucalipto* sp, sugerindo dispersões em uma Reserva em São Francisco de Paula, local de ocorrência de alguns dos principais dispersores de pinhão, tais como a cutia (*Dasyprocta aguti*) e a gralha-azul (*Cyanocorax caeruleus*).

Outro fator que está relacionado a dispersão de sementes e pode explicar parte dos resultados encontrados, é a declividade da paisagem. Alguns pontos da parcela são mais altos que outros, assim, algumas árvores estão em declives e suas pinhas caem mais distantes da planta-mãe do que outras.

Exemplos de maiores e menores valores de dispersão de pólen e de sementes da espécie, via mães, pais e plântulas, podem ser visualizados na figura 16 e via mães, pais e jovens na figura 17.



**Figura 16.** Exemplo de distância maior e menor de dispersão de pólen e de semente entre o trio: mães, plântulas e pais dentro da parcela da Coxilha Rica (Lages-SC). A primeira seta preta representa maior distância do pólen (258,40 metros) até a mãe e a segunda seta, distância da semente até o local de estabelecimento da plântula (200 metros). A primeira seta roxa representa uma distância menor do pai até a mãe (59,70 metros) e a outra seta menor a distância da mãe até o estabelecimento da plântula (7,20 metros).



**Figura 17.** Exemplo de distância maior e menor de dispersão de pólen e de semente entre o trio: mães, jovens e pais dentro da parcela da Coxilha Rica (Lages-SC). A primeira seta preta representa maior distância do pólen (183,60 metros) até a mãe e a segunda seta, distância da semente até o local de estabelecimento do jovem (201,50 metros). A primeira seta roxa representa uma distância menor do pai até a mãe (41,70 metros) e a outra seta menor a distância da mãe até o estabelecimento do jovem (0,90 metros).

Os resultados para paisagem de campo foram diferentes dos encontrados em floresta contínua e fragmentos florestais, a densidade de indivíduos é menor e a polinização é, possivelmente, facilitada pela abertura entre os capões, ocasionando em fluxo gênico suficiente para não ocorrer cruzamentos entre indivíduos aparentados.

No cenário da paisagem se destaca o elevado número de aves, que, provavelmente, estão dispersando sementes pelo campo; o que fica evidenciado pela existência de árvores isoladas e pelo fluxo de sementes. Além disso, a visualização do veado-campeiro e a menção pelo proprietário da existência de cutia (um dos principais dispersores da Araucária), são fortes indicativos de presença da fauna. Também há registros de ocorrência da gralha-azul na área, outro dos principais

dispersores, além de diversas outras aves, visualizadas nas árvores dentro da parcela.

Duarte *et al.* (2009) em estudos sobre as manchas florestais, obtiveram resultados que sugeriram duas hipóteses; a) a primeira seria que o estabelecimento inicial de espécies de plantas florestais no campo seria promovido fundamentalmente por aves frugívoras e b) a segundo, que à medida em que os capões de Floresta com Araucária se desenvolvem, aumenta a importância de frugívoros terrícolas, como mamíferos roedores, na dispersão de diásporos de plantas florestais colonizadoras dos capões.

A ocorrência de fortes ventos observados nas visitas à parcela, também pode ser um dos principais fatores que fazem a diferença nesta paisagem, formando nuvens de pólen carregadas a maiores distâncias. As análises de fluxo de pólen e semente sugerem que há trocas também entre árvores isoladas e capões pequenos localizados entre a matriz campestre e capões maiores, servindo como “trampolins” para fluxo gênico, semelhante à corredores ecológicos e, possivelmente, esta é a diferença mais importante entre a paisagem de campo e a paisagem florestal fragmentada, para a espécie. A presença de diferentes fisionomias de comunidades campestres e estágios de expansão florestal, desde a presença de indivíduos arbóreos isolados até capões em zonas de transição com a Floresta com Araucária, certamente propiciam um incremento na diversidade (Pillar *et al.*, 2009).

Esta população em paisagem de campo mostra diversos pontos positivos para conservação de *A. angustifolia* em paisagem de campo. Os dados sugerem uma população em EW, não apresentando endogamia, bem como um efetivo fluxo gênico de pólen e de sementes entre os capões; além disso, a imigração de capões mais distantes, favorecem a manutenção da diversidade genética nesta população, mesmo com a presença do gado, de queimadas e roçadas no campo, o que reforça a importância da conservação desta paisagem em Unidades de Conservação (UC), pois hoje existem pouquíssimas UC's com presença de campo.

Além da importância das UC's integrais, que garantem toda a dinâmica da conservação ecológica e genética, é importante ressaltar a possibilidade de uso das áreas associadas à conservação, como o caso da população estudada: conservação pelo uso. SOUZA *et al.* (2012) afirma que a conservação da biodiversidade depende muito da manutenção do habitat em áreas privadas, uma avaliação da sustentabilidade da exploração e de práticas de uso em regiões distintas é necessário, a fim

de decidir adequadamente como integrá-los em planos regionais de conservação.

A dinâmica natural do ecossistema campo-floresta, determinado por múltiplas interações entre clima, solo e organismos, tende a favorecer o avanço da Floresta com Araucária e por outro lado, as atividades humanas predominantes na região retardam o avanço florestal, garantindo a permanência do mosaico vegetacional (Duarte *et al.*, 2009). Ao considerar a idade das formações florestais, as florestas Ombrófila Densa e Estacional, sob as condições climáticas atuais e sem interferências humanas, estariam avançando sobre a Floresta com Araucária e esta, sobre os campos (Pillar *et al.* 2009). O entendimento dos processos envolvidos na dinâmica da Floresta com Araucária depende da avaliação de como esses diversos fatores interagem entre si, moldando a estrutura da paisagem. Decorre daí a necessidade da execução de planos de pesquisa com um forte caráter teórico/acadêmico, dos quais possa se extrair conclusões aplicáveis do ponto de vista de conservação e manejo (Duarte *et al.*, 2009). O autor ainda ressalta que é importante que a geração de estratégias viáveis de conservação e uso sustentável do mosaico formado pelos campos do Planalto e pela Floresta com Araucária somente será garantida a partir do esforço conjunto entre pesquisadores, tomadores de decisões e os habitantes da região.

Historicamente, o gado bovino e cavalari foi introduzido por Jesuítas nas missões Guaranis no século XVII e após o abandono das missões o gado alçado se espalhou pelas áreas abertas no RS. A persistência dos campos foi de 7 mil anos, anterior a introdução do gado. Durante este período, o avanço das florestas foi contido por condições climáticas e ocorrência de queimadas. A ação do fogo e depois a introdução do gado, são apontados como fatores cruciais no desenvolvimento e manutenção do mosaico de campos e florestas (Pillar *et al.*, 2009).

Hoje, a redução ou supressão de queimadas e do uso pelo gado produz em geral dominância de arbustos e, mais tarde, espécies arbóreas (Quadros & Pillar, 2001). O manejo tradicional dos campos (pastejo e queima) inibe o estabelecimento de espécies florestais nos campos. Porém, em determinados sítios, como afloramentos rochosos e solos litólicos (Pillar 2003), algumas espécies florestais colonizam a matriz campestre, dentre elas, *A. angustifolia* destaca-se pela frequência e abundância.

A conservação apenas dos processos naturais de sucessão e expansão florestal no campo compromete uma série de espécies que

vem co-evoluindo com regimes de distúrbios. Manter diferentes padrões, com diferentes níveis de distúrbios nas comunidades de campo, permitiria preservar uma série de organismos associados à diversidade da paisagem, que tenderiam a desaparecer caso os distúrbios sejam excluídos. Tudo isto, monitorado por pesquisas científicas e inseridas em UC's para que a conservação não fique restrita a propriedades privadas, onde os distúrbios não são ecologicamente planejados (Pillar *et al.*, 2009).

É necessário destacar que o uso em pastoreio pode manter a integridade dos ecossistemas, porém o limiar entre uso sustentável e degradação parece ser tênue e a pecuária tem oferecido baixo rentabilidade para o produtor, o que tem estimulado sua conversão para outros usos (Pillar *et al.*, 2009). Em áreas que mantem a pecuária, uma lotação em geral mais baixa do que a usual permite maior ganho de peso por animal e melhor conservação de espécies, porém pode resultar no desenvolvimento de vegetação lenhosa de baixo valor forrageiro e tornar o sistema de produção menos rentável (Pillar *et al.*, 2009). A expansão de cultivos agrícolas e florestais com espécies exóticas, nas últimas três décadas, representa uma séria ameaça à preservação desses ecossistemas. Sistemas pecuários de produção extensiva predominam no Sul do Brasil, entre as principais conseqüências de uma alta pressão de pastejo (lotação elevada) está o aumento na proporção de solo exposto e a substituição por espécies menos produtivas e de baixa qualidade forrageira. E por outro lado uma pressão muito baixa leva a uma dominância de gramíneas altas (touceiras), de baixo valor nutricional, além do aumento de espécies não forrageiras, principalmente as vassouras (*Bacharis*) e gravatás (*Eryngium*). Portanto, um regime sustentável requer níveis intermediários de carga animal, para manter um balanço entre produção de forragem, diversidade de espécies e preservação do solo. Se ainda assim, a tendência ao desenvolvimento de gramíneas altas e arbustos for inevitável e diminuir a qualidade forrageira dos campos e sua rentabilidade econômica, para que o uso do fogo seja evitado, práticas de manejo adicionais terão que ser adotadas, como roçadas e pastoreio em rotação com períodos curtos de utilização com lotação elevada (Pillar *et al.*, 2009).

Por outro lado, o fogo tem sido usado por pecuaristas com o objetivo de eliminar biomassa seca ao final do inverno e facilitar o rebrote nos pastos, apesar da proibição das queimadas. Se outras formas de manejo fossem adotadas, esses nutrientes e a matéria orgânica poderiam ser mantidos e reciclados no próprio sistema, permitindo aumento de produtividade e tornando desnecessárias as queimadas

(Pillar *et al.* 2009). Já do ponto de vista ecológico, distúrbios intermediários de fogo mantem diversidades mais altas. Por exemplo, em áreas de campo nativo não pastejadas e submetidas a queimadas periódicas (a cada 3-5 anos) tendem a apresentar maior diversidade e riqueza de espécies num intervalo entre 2-3 anos após o fogo e que, depois deste período, o número de espécies diminui progressivamente devido a dominância competitiva das gramíneas cespitosas (touceiras) (Overbeck *et al.* 2006). Essa mesma frequência de queimadas mantém um controle da densidade de espécies lenhosas, condicionando a sua ocorrência a determinados sítios onde a intensidade do fogo tende a ser menor. Áreas de campo abandonado (sem fogo e pastejo) apresentam uma altíssima dominância de gramíneas cespitosas e uma baixa diversidade de herbáceas. Em estudos no RS, Overbeck *et al.* (2006) encontrou um número de espécies variando de 3 a 13 por quadro de 0,25 m<sup>2</sup>, enquanto que em área submetida a queimadas frequentes o número chegou a 33 por quadro.

Da mesma forma que o pastejo e o fogo são os principais fatores limitantes da expansão florestal em mosaicos de floresta e campo, os mesmos atuam direta e indiretamente na estrutura e nas propriedades ecológicas da vegetação campestre (Pillar & Quadros, 1997).

Pillar *et al.* (2009) ressaltam a importância de estudos de longa duração das comunidades e populações-chave para o melhor entendimento da estrutura dos ecossistemas da Floresta com Araucária e do Campo, bem como das relações em sua interface. Os autores ainda mencionam que abordagens populacionais dos aspectos etários e de variações espaço-temporais conforme seus ciclos de vida ou processos de expansão/retração, associados ou não a variações climáticas, edáficas ou interferência antrópica, permitiriam uma melhor compreensão dos fatores importantes na manutenção de mosaicos floresta-campo.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A paisagem de campo da região da Coxilha Rica, cidade de Lages (SC) apresentou pontos muito importantes para conservação tanto da espécie como da própria matriz campestre e por fim, da FOM. Os valores de alta diversidade genética, ausência de endogamia, presença de imigração na parcela, dispersão de pólen e sementes a variadas distâncias e frequências, sugerem um ambiente propício à manutenção da diversidade genética da espécie, mesmo na presença de gado e constantes roçadas no campo.

Vale lembrar que estes dados são referentes à espécie *A. angustifolia*, e que estudos de estruturação e ecologia dentro dos capões e na matriz campestre também são importantes e essenciais para planos de manejo e conservação.

Além da necessidade de criação de Unidades de Conservação Integrais em paisagem de campo, é preciso levar em conta o número de áreas particulares em paisagem de campo e o auxílio a estas propriedades precisa ser desenvolvido de forma sustentável e economicamente viável, para que o campo não seja ocupado por imensas plantações de espécies exóticas, como já acontece em muitas regiões. Na área em estudo, existem algumas plantações de *Pinus* sp. próximas, entre 2 e 3 km, porém, ainda existe o domínio da matriz campestre com manchas de floresta de tamanhos variados, a maioria brechados pela roçada intensa para o pastejo.

Estudos científicos sobre a dinâmica da estruturação dos capões com presença e ausência de roçada, fogo e de pastejo, e o monitoramento destes, são essenciais para elaboração de estratégias. Assim como estudos da dinâmica da diversidade genética e sistema reprodutivo ao longo dos anos. Para tanto, seria necessário executar projetos de longo prazo, talvez na escala de décadas, para que obtivéssemos resultados satisfatórios.

O estudo revelou que um componente importante para o dinamismo da espécie nesta paisagem é o fluxo gênico. Associado ao ambiente aberto entre os capões na matriz campestre, sem barreiras para fluxo gênico, está o vento, fator estocástico, porém muito forte na região com presença de rajadas que contribuem para soltura do pólen dos galhos. Além disso, as árvores isoladas na matriz campestre servem de trampolins de trocas alélicas entre os capões, matas de galerias, até possivelmente chegar a florestas contínuas ou remanescentes.

A dispersão de sementes, neste estudo, apresentou tanta importância como a de pólen. Provavelmente esta entrada de sementes

ocorreu por importantes dispersores da espécie ainda presentes na região, como a gralha-azul e cutias. A fauna é de extrema importância para manutenção deste ambientes, genética e ecologicamente. Portanto, planos de manejo precisam levar em consideração estratégias para que a fauna esteja também presente na matriz campestre.

O presente estudo revela indícios positivos para conservação da espécie na paisagem de campo, porém é preciso ressaltar a importância da continuidade dessas avaliações tanto no mesmo local, na forma de dinâmica da diversidade ao longo dos anos como em diferentes regiões campestres, que apresentam diferentes processos exploratórios do passado e de uso atuais. Além disso, é importante ressaltar a necessidade de estudos envolvendo a ecologia e estrutura de espécies também nesta paisagem, com monitoramento e acompanhamento das atividades locais, como roçadas, queimadas ou pastejo.

## 7 REFERÊNCIAS

- Auler, N.M.F.; Reis, M.S.; Guerra, M.P.; Nodari, R.O. 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, 2002.
- Backes, A. distribuição geográfica atual da Floresta com Araucária: condicionamento climático, p. 39-44. *In*: Fonseca, C.R., Souza, A.F., Leal-Zanchet, A.M., Dutra, T., Backes, A., Ganade, G. (Eds). Floresta com araucária, ecologia, conservação e desenvolvimento sustentável. Holos, Ribeirão Preto (SP), 2009.
- Behling H., Pillar V.D., Müller S.C. & Overbeck G.E. Late-Holocene fire history in a forest-grassland mosaic in southern Brazil: Implications for conservation. *Applied Vegetation Science*10: 81-90, 2007.
- Behling, H.; Jeske-Pieruschka,V.; Schüler, L. & Pillar V. P. Dinâmica dos campos no sul do Brasil durante o Quaternário Tardio, p. 13-24. *In*: Pillar V. P.; Müller, S.C.; Castilhos, Z.M.S.; Jacques, A.V.A. Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade. Editores, Brasília (DF): MMA, 2009.
- Bitencourt, A.L.V.; Krauspenhar, P.M. Possible prehistoric anthropogenic effect on *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze expansion during the late Holocene. *Revista Brasileira de Paleontologia* 9:109-116, 2006.
- 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. 10.1007/s10592-007-9411-2, 2008.
- Bittencourt, J.V.M. Proposta para a conservação genética da *Araucaria angustifolia*. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 55: 87-93, 2007.
- Bittencourt, J.V.M.; Sebbenn, A.M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. *Heredity*, 99. 580-591, 2007.

Burczyc, J.; Difazio, S.P.; Adams, W.T. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel? *Forest Genetics*, v.11, p. 1-14, 2004.

Carvalho M. M. X. O desmatamento das florestas de araucária e o MédioVale do Iguçu: uma história de riqueza madeireira e colonizações. Dissertação pelo Programa de Pós-Graduação em História da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

Cruz, C.A. & Valiati, V.H. Viabilidade da dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia* nas fragmentações das áreas nativas e exóticas da Flona-SFP. *In: XVI Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Resumo*, 2008.

Dow, B. D.; Ashley, M.V. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of sampling in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology*, v. 5, p. 615-627, 1996.

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13 -15, 1990.

Duarte, L.S.; Hartz, S.M.; Pillar, V.D. A dinâmica de nucleação dos pinhais sobre os campos no planalto Sul-Riograndense, p. 75-84. *In: Fonseca, C.R., Souza, A.F., Leal-Zanchet, A.M., Dutra, T., Backes, A., Ganade, G. (Eds). Floresta com araucária, ecologia, conservação e desenvolvimento sustentável. Holos, Ribeirão Preto (SP), 2009.*

Duarte, L.S.; Santos, M.M.G.; Hartz, S.M.; Pillar, V.D. Role of nurse plants in *Araucaria* Forest expansion over grassland in south Brazil. *Austral Ecology*, 31, 520–528, 2006.

Dutra, T.L. & Stranz, A. Biogeografia, evolução e ecologia da família Araucariaceae: o que mostra a Paleontologia, p. 155-33. *In: Fonseca, C.R., Souza, A.F., Leal-Zanchet, A.M., Dutra, T., Backes, A., Ganade, G. (Eds). Floresta com araucária, ecologia, conservação e desenvolvimento sustentável. Holos, Ribeirão Preto (SP), 2009.*

Fernandes, P.; Amorim, C.C.; Boff, M.I.C.; Boff, P. Caracterização do hábitat da erva-de-touro nos Campos naturais de altitude do Planalto Serrano Catarinense, Brasil. *Cadernos de Agroecologia*, 6 (2): 1-5, 2011.

Ferreira, D.K. Caracterização genética e estrutura populacional de diferentes origens de *Araucaria angustifolia* na FLONA de Três Barras. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

Goudet, J. FSTAT version 2.9.3 Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland, 2002.

Guerra, M.P., Silveira, V., Reis, M.S. & Schneider, L. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais (L.L. Simões & C.F. Lino, orgs.). Senac, São Paulo, p.85-102, 2002.

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

Indrusiak, C. & Monteiro, S.A. Unidades de conservação na área de distribuição da Araucaria. In: Fonseca, C.R., Souza, A.F., Leal-Zanchet, A.M., Dutra, T., Backes, A., Ganade, G. (Eds). Floresta com araucária, ecologia, conservação e desenvolvimento sustentável. Holos, Ribeirão Preto (SP). p. 267-272, 2009.

Jarne, P. & Lagoda, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. Elsevier Science, TREE v. 11, n<sup>o</sup>. 10, 1996.

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

Klein, R.M. Aspectos dinâmicos do pinheiro brasileiro. Sellowia, 12: 17-44, 1960.

Klein, R.M. Mapa fitogeográfico de Santa Catarina. Flora ilustrada catarinense, p. 10, 1978.

Lewis, P.O.; Zaykin, D. GDA – Genetic Data Analysis: version 1.1 for Windows 95/NT. 2000.

Loiselle, B.A.; Sork, V.L.; Nason, J.; Graham, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis*. American Journal of Botany, 82: 1420-1425, 1995.

Machado, R.E. Padrões vegetacionais em capões de Floresta com Araucária no Planalto Nordeste do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, UFRGS, Porto Alegre, 2004.

Mantovani, A. Fenologia reprodutiva e estrutura genética de uma população natural de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae) [PhD thesis]. Rio Claro, Brazil: Universidade Estadual Paulista.

Mantovani, A., Morellato, P.C. & Reis, M.S. Internal Genetic Structure and Outcrossing rate in a Natural Population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Journal of Heredity 97(5): 466-472, 2006.

Mantovani, A.; Morellato A.P.C.; Reis, M.S. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. Rev Bras Bot 27: 787-796, 2004.

Mantovani, A.; Morellato, L.P.C.; Puchalski, A.; Reis, M.S. Razão sexual em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. In: 47 Congresso Nacional de Genética, 2001, Águas de Lindóia. Genetics and Molecular biology, 2001.

Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B.; Pemberton, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology, 7: 639-655, 1998.

Martins, K.; Santos, J.D.; Gaiotto, F.A.; Moreno, M.A.; Kageyama, P.Y. Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf.(Leguminosae – Caesalpinioideae) em fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. Revista Brasil. Bot., V.31, n.1, p.61-69, 2008.

Mattos, J. R. O pinheiro brasileiro. Vol 1, Ed 2, 1994.

Moreno, A.C. Estudio del flujo génico mediado por polen en poblaciones fragmentadas de *Araucaria araucana*. Tesis En Ciencias

Biológicas, Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Argentina, 2012.

Oliveira, J. M.; & Pillar, V. D. Vegetation dynamics on mosaics of Campos and Araucaria forest between 1974 and 1999 in Southern Brazil. *Comm. Ecol.* 5, 197–202, 2004.

Oosterhout, C.V.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M.; Shipley, P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535–538, 2004.

Overbeck, G.E.; Muller, S.C.; Pillar, V.D.; Pfadenhauer, J. Floristic composition, environmental variation and species distribution patterns in burned grassland in southern Brazil. *Braz. J. Biol.*, 66(4): 1073-1090, 2006.

Paludo, G. F.; Klauberg, C.; Mantoani, A.; Reis, M. S. Estrutura demográfica e padrão espacial de uma população natural de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae) em Santa Catarina. *Revista Árvore*, v.33, n.6, p. 1109-1121, 2009.

Paludo, G.F. Estudo populacional de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo e de floresta. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

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.

Pillar, V.D. Dinâmica da expansão florestal em mosaicos de floresta e campos no sul do Brasil. In: Claudino-Sales, V. (ed.) *Ecosistemas Brasileiros: Manejo e Conservação*. p. 209-216. Expressão Gráfica, Fortaleza. p.392, 2003.

Pillar, V.P.; Muller, S.C.; Oliveira, J.M.; Machado, R.E. Mosaico de Campos e Floresta com Araucárias: dilemas para a conservação. *Floresta com Araucária*, 1: 273-283, 2009a.

Pillar V. P.; Müller, S.C.; Castilhos, Z.M.S.; Jacques, A.V.A. Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade. Editores, Brasília (DF): MMA, 2009b.

Pillar, V.D. & F.L.F. de Quadros. Grassland-forest boundaries in southern Brazil. *Coenoses* 12: 119-126, 1997.

Reis, M.S. & Ladio, A. Paisajes con Araucarias en Sudamérica: construcciones culturales pre-colombinas y del presente para producción de alimento. In: Navarro, V y Espinosa, S. Paisajes Culturales: memorias de las Jornadas de reflexión acerca de los paisajes culturales de Argentina y Chile, en especial los situados en la región Patagónica (ISBN 978 987 12 42 71 9). Rio Gallegos, AR. ICOMOS / UNPA / UMAG, 2012. p 224 – 244, 2012.

Reis, M.S. 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, 1996.

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

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

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*, 142: 1141-1153, 2009.

Richards, A.J. *Plant breeding systems*. Chapman & Hall, 529, 1997.

Ritland, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using  $n$  independent loci. *Heredity*, 88: 221-228, 2004.

Rosado, R.M.; Ferreira, A.G.; Mariath, J.E.A.; Cocucci, A.R. Amido no megagametofito de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze: degradação durante a germinação e o desenvolvimento do esporófito. *Acta Bot. Bras.* 8: 35-43, 1994.



Salgueiro, F.; Caron, H.; Souza, M.I.F.; Kremer, A. & Margis, R. Characterization of nuclear microsatellite loci South American Araucariaceae species. *Molecular Ecology*, 5, 256-258 p., 2005.

Sant'anna, C.S. 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 do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

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

Sebbenn, A.M.; Pontinha, A.A.S.; Freitas, S.A.; Freitas, J.A. Variação genética em cinco procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. No sul do estado de São Paulo. *Rev Inst Florestal* 16:91-99, 2004.

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

Solórzano-Filho, J. A. Demografia, fenologia e ecologia da dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia*(Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae), numa população relictual em Campos do Jordão. Dissertação Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

Sousa, V.A.; Sebbenn, A.M.; Hattemer, H.; Ziehe, M. Correlated mating in populations of a dioecious Brazilian conifer, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Forest Genet*, 12: 107-119, 2005.

Souza, A.F.; Cortez, L.S.R.; Longhi, S.J. Native forest management in subtropical South America: long-term effects of logging and multiple-use on forest structure and diversity. *Biodivers Conserv*, 21:1953-1969, 2012.

Souza, M.I.F. Análise da diversidade genética de populações de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze utilizando marcador AFLP. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Departamento de Genética. p. 111, 2006.

Souza, M.I.F.; Salgueiro, F.; Bottino, M.C.; Félix, D.B.; Ferreira, M.A.; Bittencourt, J.V.M.; Margis, R. Patterns of genetic diversity in southern and southeastern *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze relict populations. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 3, 546-556, 2009.

Souza, V. A. & Hattemer, H.H. Fenologia Reprodutiva de *Araucaria angustifolia* no Brasil. *Bol. Pesq. Fl.*, Colombo, n.47, p. 19-32, jul./dez, 2003.

Stefenon, V.M.; Behling, H.; Gailing, O.; Finkeldey, R. Evidences of delayed size recovery in *Araucaria angustifolia* populations after post-glacial colonization of highlands in Southeastern Brazil. *An Acad Bras Cienc* 80:433–443, 2008.

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 Biol* 9:516–525, 2007.

Stefenon, V.M.; Steiner, N.; Guerra, M.P.; Nodari, R.O. Integrating approaches towards the conservation of forest genetic resources: a case study of *Araucaria angustifolia*. *Biodivers Conserv*, 18:2433–2448, 2009.

Sujii, P.S.; Azevedo, V.C.R.; Inglis, P.W.; Ciampi, A.Y. Diversidade genética de populações de *Araucaria angustifolia* de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. *In: 54º Congresso Brasileiro de Genética*, 2008, Salvador. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

Tarazi, R.; Mantovani, A.; Reis, M.S. Fine-scale spatial genetic structure and allozymic diversity in natural populations of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Conservation Genetics*, 11:965-976, 2010.

Vieira, E.M. & Iob, G. Dispersão e predação de sementes de *Araucaria angustifolia*, p. 85-92. *In: Fonseca, C.R., Souza, A.F., Leal-Zanchet, A.M., Dutra, T., Backes, A., Ganade, G. (Eds). Floresta com araucária, ecologia, conservação e desenvolvimento sustentável*. Holos, Ribeirão Preto (SP), 2009.

Vieira, F.A.; Brandão, M.M.; Arriel, D.A.A.; Carvalho, D. Razão sexual e padrão espacial de *Lithraea molleoides* (Vell.) Engler (Anacardiaceae) em ambientes de fragmentos e corredores de vegetação em Lavras, MG. In: 59° Congresso Nacional de Botânica, 2008, Natal. 59° Congresso Nacional de Botânica, 2008.

White, G.M.; Boshier, D.H.; Powell, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. *Molecular Ecology*, 8, 1899–1909, 1999.

Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38:1358-1370, 1984.

Zechini, A. A.; Schussler, G.; Cristofolini, C.; Bittencourt, R.; Montagna, T.; Mantovani, A.; Reis, M. S. Geographic distribution of genetic diversity of *Araucaria angustifolia* populations in Santa Catarina State: conservation perspectives to a threatened specie from Atlantic Rainforest. In: 57° Congresso Brasileiro de Genética, Resumo, 2011.

Zechini, A.A. Morfometria, produção, fenologia e diversidade genética: Subsídios para conservação da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze e Coleta sustentável do pinhão no planalto catarinense. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.



## 8 APÊNDICE

### Extração do DNA

Para a extração de DNA das acículas, estas foram secas anteriormente em sílica gel por aproximadamente 5 dias, para facilitar a maceração. A metodologia de extração foi baseada em Doyle & Doyle (1990), no qual a padronização constou da maceração de 3 a 4 acículas em macerador automático Precellys® 24 até gerar um pó fino. Imediatamente foi acrescentado 1,0 ml de tampão de extração [20 mg/mL de CTAB (brometo de cetil trimetil amônio); 87 mg/mL de NaCl; 20 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético); 12,1 mg/mL de Tris-HCl pH 8,0; 20 mg/mL de PVP], adicionados 30 µl de 2- mercaptoetanol e manteve-se as amostras em banho-maria a 60°C por no mínimo 30 minutos e máximo 60 minutos, invertendo a cada 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 600 µl de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1), agitados por 10 minutos e centrifugados a 13.000 rpm. Foi retirado o sobrenadante e repetiu-se a adição do CIA. Retirado novamente o sobrenadante, acrescentou-se o CIA juntamente com CTAB 10% (100 mg/ml de CTAB; 81,2 mg/mL NaCl) a 60°C, agitando por 10 minutos e centrifugados a 13.000 rpm. Ao sobrenadante foi adicionado 1,5 ml de etanol 76% com acetato de amônio 10mM a -20°C, invertendo até a formação de precipitado. As amostras ficaram a -20°C por no mínimo 1 hora, podendo ficar over night. Decorrido o tempo, foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm e descartado o sobrenadante. Adicionou-se 1,0 ml de álcool 70% e foi centrifugado a 8.000 rpm. Repetiu-se a mesma ação com álcool 95% e foi deixado secar a temperatura ambiente. Foi adicionado 100 µl de H<sub>2</sub>O com RNase (0,4 µg/ml) a 4°C e mantido em estufa a 37°C por uma hora e então, armazenados a -20°C até o momento do uso.