

ANO  
2014



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

Esse estudo consistiu na investigação da influência de plantios de *Pinus* nos níveis de diversidade genética e no padrão de dispersão de pólen de populações remanescentes de *Araucaria angustifolia* (capões), por meio análises de paternidade com oito locos microssatélites, para capões inseridos em área natural de campo e em área de plantio de *Pinus*.

Orientador: Adelar Mantovani

Coorientador: Altamir Frederico Guidolin

Lages, 2014

NEWTON CLÓVIS FREITAS DA COSTA | ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL, SISTEMA DE REPRODUÇÃO E FLUXO DE PÓLEN EM *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE EM PEQUENAS POPULAÇÕES REMANESCENTES EM PAISAGEM DE CAMPO E PLANTIOS FLORESTAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL,  
SISTEMA DE REPRODUÇÃO E  
FLUXO DE PÓLEN EM *Araucaria  
angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE  
EM PEQUENAS POPULAÇÕES  
REMANESCENTES EM PAISAGEM  
DE CAMPO E PLANTIOS  
FLORESTAIS**

NEWTON CLÓVIS FREITAS DA COSTA

LAGES, 2014

**NEWTON CLÓVIS FREITAS DA COSTA**

**ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL, SISTEMA DE  
REPRODUÇÃO E FLUXO DE PÓLEN EM *Araucaria  
angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE EM PEQUENAS  
POPULAÇÕES REMANESCENTES EM PAISAGEM DE  
CAMPO E PLANTIOS FLORESTAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Florestal.

Orientador: Adelar Mantovani

**LAGES, SC  
2014**

C837e

Costa, Newton Clóvis Freitas

Estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo de pólen em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em pequenas populações remanescentes em paisagem de campo e plantios florestais / Newton Clóvis Freitas Costa. - Lages, 2014.

75 p.: il.; 21 cm

Orientador: Adelar Mantovani

Inclui bibliografia.

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de

Santa Catarina, Centro de Ciências

Agroveteinárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Lages, 2014.

1. Dispersão de pólen. 2. Análise de paternidade. 3. Polinização pelo vento. 4. Taxa de imigração de pólen.

5. Fluxo gênico. 6. Florestamento com *Pinus*.

I. Costa, Newton Clóvis Freitas. II. Mantovani, Adelar. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do  
CAV/UDESC

**NEWTON CLÓVIS FREITAS DA COSTA**

**ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL, SISTEMA DE REPRODUÇÃO  
E FLUXO DE PÓLEN EM *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE  
EM PEQUENAS POPULAÇÕES REMANESCENTES EM PAISAGEM  
DE CAMPO E PLANTIOS FLORESTAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Florestal.

**Banca Examinadora**

Orientador:

\_\_\_\_\_  
(Prof. Dr. Adelar Mantovani)  
CAV/UDESC

Co-orientador:

\_\_\_\_\_  
(Prof. Dr. Altamir Frederico Guidolin)  
CAV/UDESC

Membro:

\_\_\_\_\_  
(Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari)  
CCA/UFSC

**LAGES, SC  
2014**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Aos meus pais, Newton e Lilyan os quais me deram a vida. Ao meu padrasto Luis Claudio que acompanhou parte da minha vida, e também ao o meu irmão, Geovane.

A toda minha família, especialmente a minha Tia Enedina, que sempre lutou, e ainda luta, para que eu sempre tivesse o necessário para chegar até aqui.

A minha namorada Lilian, de maneira especial, que me deu muito amor e carinho estando pacientemente comigo nos últimos nove anos da minha vida, assim como seus familiares que nunca deixaram de acreditar em mim.

A minha segunda família que são os amigos os quais conquistei durante o percurso de minha vida e aos momentos de descontração concedidos por eles, que são fundamentais.

Ao amigo orientador, Adelar Mantovani principalmente por sempre acreditar em mim e também ao amigo e co-orientador Altamir Guidolin.

Ao pessoal da “salinha”, amigos e colegas que fazem parte do Grupo de Pesquisa de “Uso e Conservação dos Recursos Florestais” bem como o “pessoal” do Laboratório DNA UDESC, que sempre proporcionaram apoio, alegria e companheirismo.

Aos colegas e amigos professores especialmente Adelar, Altamir e Jefferson que estiveram mais próximos nesta etapa, contribuindo não só na minha formação acadêmica, mas também na formação do meu caráter profissional.

Ao Marcelo Duarte por disponibilizar o local para realização do estudo

Para não correr o risco de cometer injustiça, agradeço aqueles que passaram pela minha vida e contribuíram de alguma forma.

De coração! Muito obrigado a todos!



## RESUMO

COSTA, Newton Clóvis Freitas. **Estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo de pólen em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em pequenas populações remanescentes em paisagem de campo e plantios florestais**. 2014, 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal – Área: Ecologia de Espécies Florestais e Ecossistemas Associados) Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de pós graduação em Engenharia Florestal, Lages, 2014.

O fluxo gênico é um dos componentes determinantes da persistência e adaptação das populações locais, podendo influenciar em suas propriedades ecológicas. Entender o comportamento desse fluxo em populações naturais ou alteradas é essencial para elaboração de planos eficazes de conservação pelo uso dos recursos naturais. Investigou-se a influência de plantios de *Pinus* no padrão de dispersão de pólen em populações remanescentes de *Araucaria angustifolia* (capões), por meio análises de paternidade com oito locos microssatélites. Para isso, amostraram-se dois capões em área de campo e dois em área de plantios de *Pinus*, localizados no planalto sul catarinense. Nas áreas de estudo (capões) foram mapeados e genotipados todos os 68 indivíduos machos reprodutivos e mais 400 sementes retiradas de 20 plantas matrizes (cinco por população). A análise de paternidade revelou que a distância média de polinização para a área de campo (170 m), foi maior do que para área de plantios de *Pinus* (67 m). O número efetivo de polinizadores ( $N_{ep}$ ) foi de 16,4 e 8,9 para área de campo e plantio de *Pinus*, respectivamente. Áreas de campo apresentaram uma taxa de imigração de pólen de 46% e áreas de plantio apresentaram 36%. Esses resultados são um indicio de que os plantios de *Pinus* podem agir como barreira ao fluxo de pólen, embora ainda ocorra fluxo através dos plantios. Verificou-se a presença de estrutura genética espacial não significativa para os indivíduos adultos em ambas as áreas, além de uma elevada diversidade genética ( $H_e$ , variando de 0,16 a 0,829), sem diferenças significativas, sugerindo a presença de um fluxo gênico histórico entre as áreas. Enquanto as





sementes oriundas das matrizes em meio as áreas de campo não apresentaram índice de fixação significativos, as sementes oriundas das árvores em meio aos plantios de *Pinus* apresentarem índices de fixação significativos ( $F = 0,076$ ,  $P < 0,05$ ). Tanto a população adulta quanto as sementes apresentaram alelos exclusivos, evidenciando que nem todos os indivíduos reprodutivos presentes nos remanescentes contribuíram para a formação da amostra de sementes, entretanto o fluxo de pólen externo contribuiu efetivamente para formação das sementes de dentro do capão.

**Palavras-chave:** dispersão de pólen, análise de paternidade, polinização pelo vento, taxa de imigração de pólen, Fluxo gênico, florestamento com *Pinus*.



## ABSTRACT

COSTA, Newton Clóvis Freitas. **Spatial genetic structure, mating system and pollen flow in small remnant populations of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze in grasslands and forest plantations landscapes.** 2014, 75 p. Dissertation (Master in Forest Engineering – Area: Ecology of Forest Species and Associated Ecosystems) Santa Catarina State University. Forestry Engineering Graduate Program, Lages, 2014.

Gene flow is a determining component of persistence and adaptation of local populations, and may influence their ecological properties. Understand the behavior of this flow in natural or altered populations is essential for developing effective conservation plans by the use of natural resources. We investigated the influence of *Pinus* plantations in the pollen dispersal patterns in remaining *Araucaria angustifolia* populations (patches), using paternity analysis with eight microsatellite locos. For this, we sampled two patches in the grassland area and two patches in the pine plantations area, located in southern Santa Catarina plateau. In the study areas all male reproductive individuals (68) and 400 seeds from 20 seed-tree (five per population) were mapped and genotyped. The paternity analysis revealed higher average distance of pollination for grassland area (170 m) than *Pinus* plantation area (67 m). The effective number of pollen donors (Nep) was 16.4 and 8.9 for grassland area and *Pinus*, respectively. Grassland areas showed a pollen immigration rate of 46%, and the plantation area showed a 36%. These results are an indication that the *Pinus* plantation can act as barrier to pollen flow, although, pollen dispersal occurs through plantings. There was no significant spatial genetic structure for adults, and high levels of genetic diversity were verified in both areas (He, ranging 0.16 to 0.829), with no significant differences, suggesting presence of historic gene flow between locals. While the seeds from natural grasslands seed-tree present no significant fixation index, the seeds from seed-tree located into *Pinus* plantations presented significant fixation indexes ( $F = 0.076$ ,  $P < 0.05$ ). Both adult population and seeds showed private alleles, evidencing that not all possible reproductive individuals, in the remnants, contributed to seed



sampled formation, however, pollen flow from outside contributed effectively to seed formation within patches.

**Key-words:** pollen dispersal, paternity analysis, wind pollination, pollen immigration rate, gene flow, *Pinus* forestation.



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	19
<b>CAPÍTULO I</b> .....	21
Efeitos da paisagem de campo e florestamentos com <i>Pinus</i> na diversidade e estrutura genética de remanescentes de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	21
RESUMO .....	22
ABSTRACT .....	22
INTRODUÇÃO .....	23
MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
RESULTADOS .....	27
DISCUSSÃO .....	31
CONCLUSÃO .....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36
<b>CAPÍTULO II</b> .....	41
Fluxo contemporâneo de pólen em <i>Araucaria angustifolia</i> em pequenas populações remanescentes (capões) em paisagem de campo e plantios florestais .....	41
RESUMO .....	42
INTRODUÇÃO .....	43
MATERIAIS E MÉTODOS .....	45
RESULTADOS .....	52
DISCUSSÃO .....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	75





## INTRODUÇÃO

Considerado um dos temas de grande relevância na atualidade, a conservação de recursos genéticos, vem despertando a atenção de inúmeros cientistas quanto ao entendimento de sua magnitude, quantificação e distribuição. Essas informações constituem-se em subsídios para constatar os efeitos das atividades antrópicas, perdas de variabilidade, isolamento de populações, bem como permitem o estabelecimento das melhores estratégias para incrementar e preservar a diversidade dentro das espécies.

A rapidez e a capacidade do homem em modificar ambientes naturais tem sido muitas vezes superior à habilidade que esses ambientes possuem em se recompor. A fragmentação de habitats tem sido uma das maiores ameaças para biodiversidade e a naturalidade, sendo considerada como uma das principais causas da extinção de espécies, podendo causar irreversíveis perdas (HAMBLER *et al.*, 2011). A destruição de habitats pela ação antrópica não só prejudica o ecossistema alterado, como também áreas adjacentes a este (BOAKES *et al.*, 2010).

A Mata atlântica historicamente tem sofrido com as alterações humanas, e sua área de cobertura atualmente limita-se a 12% da extensão original (RIBEIRO *et al.*, 2011). Tais alterações tem impactos negativos na diversidade e estrutura genética de populações e no fluxo gênico destas (AGUIAR *et al.*, 2009; ECKERT *et al.*, 2009; KAMM *et al.*, 2010; SEBBENN *et al.*, 2011; QUESADA *et al.*, 2013; TAMBARUSSI 2013). O fluxo gênico é um dos componentes determinantes da persistência e adaptação das populações locais, podendo influenciar em suas propriedades ecológicas (WHITLOCK e MCCAULEY, 1999). Assim, um alto fluxo gênico entre populações permite que todas elas evoluam de maneira conjunta, porém, com baixo fluxo gênico estas podem divergir, o que contribui para o isolamento reprodutivo e estabelecimento de linhagens evolutivamente diferentes (SLATKIN, 1994).

O conhecimento das respostas as alterações de habitats em populações de espécies chaves é fundamental para conservação da biodiversidade em paisagens fragmentadas (HANSON *et al.*, 2008). Na paisagem em que está inserida a *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze apresenta uma enorme importância, tanto pelo potencial econômico quanto ecológico. Desde a colonização até o dossel da floresta, em seu

ambiente de ocorrência natural fornece grande quantidade de recursos que contribuem para sobrevivência de muitas outras espécies (PINHEIRO e GANADE, 2009), inclusive o homem.

Vibrans *et al.* (2010) verificaram para o estado de Santa Catarina que a vegetação nativa das Matas de Araucária consideradas em bom estado de conservação limita-se a 5% do original, e ainda 47% da vegetação que existe hoje encontra-se bastante fragmentada e sobre um alto impacto externo. Os atuais ecossistemas da região, tanto florestais como campestres, tem sido fortemente afetado pelas atividades humanas, onde plantios florestais de espécies exóticas têm mudado claramente a vegetação original (BEHLING *et al.*, 2009).

Diante disso, estudou-se a interferência da matriz da paisagem no fluxo gênico da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze presente em pequenos fragmentos em paisagem de campo nativo e em paisagem natural de campo que foi florestado com *Pinus*. Para isto, avaliou-se a diversidade genética de indivíduos reprodutivos e de sementes, a estrutura genética interna destes fragmentos (Capítulo I), a estrutura genética espacial e por meio de análise de paternidade avaliou-se o fluxo de pólen dessas populações (Capítulo II). De forma a investigar se as condições da paisagem que a espécie se encontra alteram o fluxo gênico entre fragmentos, para ajudar a estabelecer padrões eficientes de manejo e conservação da espécie em ambos os ambientes.

## REFERÊNCIAS

- AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOCO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, p. 5177-5188, 2008.
- BEHLING, H.; JESKE-PIERUSCHKA, V.; SCHÜLER, L.; PILLAR V. P. Dinâmica dos campos no sul do Brasil durante o Quaternário Tardio, In: PILLAR V. P.; MÜLLER, S.C.; CASTILHOS, Z.M.S.; JACQUES, A.V.A. **Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: MMA, 2009. p. 13-24.
- BOAKES EH, MACE GM, MCGOWAN PJK, FULLER RA (2010) Extreme contagion in global habitat clearance. *Proc Roy Soc B* 277: 1081–1085
- ECKERT, C.G.; KALISZ, S.; GEBER, M.A.; SARGENT, R.; ELLE, E.; CHEPTOU, P-O.; GOODWILLIE, C.; JOHNSTON, M.O.; KELLY, J.K.; MOELLER, D.A.; PORCHER, E.; REE, R.H.; VALLEJO-MARÍN, M.; WINN, A.A. Plant mating system in a changing world. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 25, p. 35-43, 2009.
- HAMBLER C, HENDERSON PA, SPEIGHT MR (2011) Extinction rates, extinction-prone habitats, and indicator groups in Britain and at larger scales. **Biological Conservation**, 144, 713–721.
- HANSON, T.T.; BRUNSFELD, S.J.; FINEGAN, B.; WAITS, L.P. Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, p. 2060–2073, 2008
- KAMM, U.; GUGERLI, F.; ROTACH, P.; EDWARDS, P.; HOLDEREGGER, R. Open areas in a landscape enhance pollen-mediated gene flow of a tree species: evidence from northern Switzerland. **Landscape Ecology**, Dordrecht, v. 25, p. 903–911, 2010.
- PINHEIRO, C.C. e GANADE, G. 2009. Influência do microhabitat no processo de predação de sementes em uma área degradada. *Neotropical Biology and Conservation* 4:20-27.
- QUESADA, M.; HERRERÍAS-DIEGO, Y.; LOBO, J.A.; SÁNCHEZ-MONTOYA, G.; ROSAS, F.; AGUILAR, R. Long-term effects of

habitat fragmentation on mating patterns and gene flow of a tropical dry forest tree, *Ceiba aesculifolia* (Malvaceae: Bombacoideae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 100, n. 6, p. 1095–1101, 2013.

RIBEIRO, M.C.; MARTENSEN, A.C.; METZGER, J.P.; TABARELLI, M.; SCARANO, F.; FORTIN, M.-J. The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. In: ZACHOS, F.E.; HABEL J.C. (Ed.). **Biodiversity hotspots**. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. pt. 4, p. 405-434

SEBBENN, A.M.; CARVALHO, A.C.M.; FREITAS, M.L.M.; MORAES, S.M.B.; GAINO, A.P.S.C.; SILVA, J.M.; JOLIVET, C.; MORAES, M.L.T. Low level of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, London, v. 106, p. 134-145, 2011

SLATKIN 1994. Gene flow and population structure. En: ecological genetics (ed Real LA) Pp. 3-18. Princeton University Press.

TAMBARUSI, E.V. **Contemporary gene flow, mating system and spatial genetic structure in a Jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* Mart. Kuntze) fragmented population by microsatellite markers**. 2013. 121 f. Tese (Doutorado em Genética de plantas e reprodução) – Universidade Federal de São Paulo, Piracicaba, 2013.

VIBRANS, A.C.; SEVEGNANI, L.; UHLMANN, A.; SCHORN, L.A.; SOBRAL, M.; GASPER, A.L.; LINGNER, D.V.; BROGNI, E.; KLEMZ, G.; GODOY, M.B. & VERDI, M. 2011. Structure of mixed ombrophylous forests with *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) under external stress in Southern Brazil. *Revista de Biologia Tropical* 59: 1371-1387.

WHITLOCK MC, MCCAULEY DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration,  $F_{ST} \neq 1/(4Nm + 1)$ . *Heredity*, 82, 117–125.

## **CAPÍTULO I**

Este manuscrito segue as normas de formatação do periódico *Scientia Forestalis*

### **Efeitos da paisagem de campo e florestamentos com *Pinus* na diversidade e estrutura genética de remanescentes de *Araucaria angustifolia***

Effects of natural grasslands and *Pinus* plantations in diversity and genetic structure in remnants of *Araucaria angustifolia*

Grupo de pesquisa Uso e Conservação de Recursos Florestais, Centro de Ciências Agroveterinárias de Lages, Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages, Santa Catarina.

## RESUMO

Características da paisagem podem estruturar a variação genética e afetar o fluxo de pólen de populações de plantas. Para investigar efeitos da paisagem na estrutura e diversidade genética de populações de *Araucaria angustifolia*, oito locos microssatélites foram usados para análise de 400 sementes e seus respectivos indivíduos reprodutivos (87) presentes em quatro remanescentes florestais (Capões). Os capões estudados estão inseridos em diferentes matrizes de paisagem, dois em campo natural (Fazenda X) e dois em florestamento com *Pinus* (Fazenda Z). Elevada diversidade genética foi verificada nas populações ( $H_e$ , variando de 0,16 a 0,829), sem diferenças significativas entre os indivíduos adultos. Não foram verificadas diferenças pelo coeficiente de coancestralidade entre as fazendas ( $F_{FA} = 0.002$ ,  $P > 0,05$ ). Esses resultados sugerem que existiu uma conectividade histórica entre os locais. Índices de fixação significativos foram verificados nas sementes da Fazenda Z ( $F = 0,076$ ,  $P < 0,05$ ) e no conjunto total de sementes analisadas ( $F = 0,052$ ,  $P < 0,05$ ), indicando fixação para alguns alelos, possivelmente pelo cruzamento entre aparentados. A divergência genética verificada entre populações de adultos e de sementes ( $F_{AS} = 0,029$ ,  $P < 0,05$ ) aliado com a ocorrência de alelos exclusivos em todas as populações, sugere que nem toda variabilidade genética dos indivíduos adultos analisados está sendo passada para as sementes, especialmente na Fazenda Z, por outro lado houve contribuição de pólen vindo de fora dos capões para formação das sementes em ambas as fazendas.

**Palavras chave:** Plantios florestais, pequenos capões, divergência genética, índice de fixação

## ABSTRACT

Landscape features may structure genetic variation within and among populations and affect the pollen flow of plant populations. To investigate the effects of landscape on genetic diversity and the structure of *A. angustifolia* populations, eight microsatellite loci were used to analyze 400 seeds and their respective reproductive individuals (87), present in four forest remnants (Patches) occurring in different landscape matrices, two in natural pastures (X Farm) and two in *Pinus* forestation (Z Farm). The analysis showed high populations genetic diversity ( $H_e$ , ranged from 0.16 to 0.83) with no significant difference between adults. No differences between farms were verified by coancestry coefficient ( $F_{FA} = 0.002$ ,  $P > 0.05$ ). These results suggesting that there was a connectivity between locations. Significant fixation indexes were detected in Z Farm

seeds ( $F = 0.076$ ,  $P < 0.05$ ) and in the analyzed pooled seeds ( $F = 0.052$ ,  $P < 0.05$ ), indicating alleles fixation, possibly by crossing among relatives. The genetic divergence observed among adults and seeds populations ( $F_{AS} = 0.029$ ,  $P < 0.05$ ) coupled with the presence of private alleles in all populations, suggest that seeds did not contained all potential genetic diversity observed in analyzed adults, especially in Z farm, however, there was pollen contribution from outside patches for seed formation in both farms.

**Keywords:** Forest plantations, small patches, genetic divergence, fixation index

## INTRODUÇÃO

Características da paisagem podem estruturar a variação genética dentro e entre as populações, bem como influenciar processos genéticos evolutivos como fluxo gênico, deriva genética e seleção (MANEL *et al.*, 2013). Tais processos podem ser afetados pelo isolamento de populações de espécies arbóreas em pequenos fragmentos reduzindo o número de indivíduos reprodutivos e a densidade populacional (YOUNG; BOYLE, 2000). Espécies isoladas em pequenos fragmentos que não forem capazes de manter o fluxo através da porção não florestal da paisagem (matriz), poderão limitar sua ocorrência e, por consequência reduzirão a probabilidade de persistência da população (FAHRIG, 2003).

Contrapor os efeitos negativos do isolamento é essencial para que populações fragmentadas mantenham reduzidos níveis de endogamia e aumentem seu tamanho efetivo. Para isso, é preciso que se mantenham na paisagem fragmentada pequenos remanescentes e árvores isoladas, afim de promoverem o fluxo de pólen (BITTENCOURT; SEBBENN 2007, 2009). A dispersão por pólen possui o potencial de transportar gametas masculinos a longas distâncias, contrapondo efeitos do “isolamento” de genes em populações especialmente isoladas (ENNOS, 1994). Além do isolamento por distância decorrente da fragmentação, alterações antrópicas podem causar isolamento pela formação de barreiras ao fluxo de pólen de populações naturais. A remoção da floresta e a alteração da paisagem natural, por meio da agricultura, pastoreio e reflorestamento com espécies exóticas, têm mudado claramente a vegetação original do Sul do Brasil (BEHLING *et al.*, 2009). A paisagem sul brasileira, caracterizada hoje por mosaicos de campos e Floresta com Araucária (BEHLING *et al.*, 2004), está sob forte pressão de uso, onde vastas áreas



de campo estão sendo substituídas por florestamentos com *Pinus* e *Eucalyptus* (BEHLING *et al.*, 2009).

Como espécie determinante da Floresta com Araucária, *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze (Araucariaceae) é uma conífera, dioica, polinizada pelo vento que ocorre comumente em contínuos florestais e em remanescentes (capões) em meio a paisagem campestre. Condições naturais da Floresta com Araucária, como as barreiras físicas formadas pela alta densidade vegetal dessas formações, podem dificultar a movimentação do pólen da *A. angustifolia* (SOUZA; HATTEMER, 2003). Assim, a substituição do campo por plantios florestais, implica na formação de barreiras físicas com densidades vegetais superiores a enfrentada naturalmente pela espécie.

Neste cenário, o objetivo deste estudo foi analisar a diversidade genética de adultos e sementes inseridos em diferentes matrizes de paisagens (campo e florestamento com *Pinus*), a fim de investigar como a variabilidade genética está distribuída nas populações destes diferentes ambientes. As seguintes questões foram abordadas: (1) O florestamento com *Pinus* circundando os capões com Araucária afetam a chegada de alelos por fluxo de pólen e, conseqüentemente, reduzem a diversidade genética destas populações em comparação com as populações remanescentes em campo. (2) O florestamento causa um aumento na diferenciação genética entre populações? (3) Em função da barreira formada pelos plantios de *Pinus* há um aumento da endogamia na nova geração (sementes) de *Araucaria angustifolia*?

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Áreas de estudo e amostragem

As áreas de estudo estão localizadas na região serrana de Santa Catarina, no município de Lages, que possui elevação média de 950 m. O clima da região, segundo a classificação Köppen, é do tipo Cfb (Clima mesotérmico subtropical úmido com verões frescos, sem estação seca, com geadas severas), com precipitação média anual de 1200 mm e temperaturas oscilando entre -7°C a 35°C e médias de 16° C (KLAUBERG *et al.*, 2010).

O estudo envolveu dois ambientes compostos por diferentes matrizes de paisagem: o primeiro ambiente representa a matriz de paisagem plantios

florestais, onde os fragmentos com Araucária (Capões) se encontram em meio a plantios de *Pinus*; e o segundo representa a matriz de paisagem campos, em que os capões com Araucária estão presentes em áreas de campos naturais. As coletas para análise de DNA contemplaram 400 sementes e 87 indivíduos adultos reprodutivos, presentes em quatro capões, dois inseridos na área de campos naturais, denominados Capão A e Capão B, localizados na Fazenda Cruz de Malta (Fazenda X), e dois entremeados com plantios de *Pinus*, denominados Capão C e Capão D, localizados na Fazenda Espigão (Fazenda Z). A fazenda Cruz de Malta (27°46' S e 50°20' W), apresenta histórico de uso com pecuária extensiva e a fazenda Espigão (27°50 S e 50°22 W), possui seu histórico de uso na pecuária extensiva e conversão para silvicultura de *Pinus* na metade da década de 1960. As distâncias médias são de 9000 m entre fazendas, de 360 m entre os capões A e B, e 270 m entre os capões C e D.

Todos os indivíduos de *A. angustifolia* com diâmetro à altura do peito (DAP) acima de 20 cm foram mapeados e identificados quanto ao sexo. Para a coleta das sementes, foram selecionadas cinco árvores matrizes por capão, das quais coletou-se cinco pinhas cada, e de cada uma destas pinhas foram retiradas quatro sementes, o que equivale a 20 sementes, consideradas meias-irmãs, por matriz. Foram coletadas amostras foliares individualizadas (acículas) de cada planta matriz e de todos os indivíduos machos reprodutivos de cada capão.

### **Amplificação dos microssatélites e genotipagem**

Para a extração do DNA, foram utilizados cerca de 150 mg de acículas para os adultos e o eixo embrionário inteiro para as sementes. O DNA genômico total foi extraído usando o método de Mazza e Bittencourt (2000), com adaptações realizadas para extração de DNA das sementes. A amplificação via PCR (reação em cadeia da polimerase) foi realizada utilizando os locos Ag23, Ag45, Ag20, Ag56, Ag94, desenvolvidos por Salgueiro *et al.* (2005), CRCAC1 e CRCAC2 desenvolvidos por Scott *et al.* (2003) e Aang24 desenvolvido por Schimdt *et al.* (2007). As temperaturas de anelamento ( $T_a$ °C) foram otimizadas para quatro reações biplex: Biplex 1 (Ag94 e Aang24;  $T_a$  = 55°C); Biplex 2 (Ag23 e Ag45;  $T_a$  = 56°C); Biplex 3 (Ag20 e Ag56;  $T_a$  = 60°C); Biplex 4 (CRCAC1 e CRCAC2;  $T_a$  = 54°C). Para amplificação das amostras foi utilizada uma reação contendo 30 ng de DNA, 0,2  $\mu$ M de cada primer, 0,2 mM de DNTP, 1x Tampão, 1,5 mM Cloreto de Magnésio, 0,8 U de Platinum® *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e água

ultrapura para um volume final de 15  $\mu\text{L}$ . Foi utilizado um termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler para realização da PCR da seguinte maneira: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, 30 ciclos com as etapas de desnaturação a 94°C por 45 s,  $T_a$ °C por 45 s, extensão a 72°C por 45 s e extensão final: Biplex 1 e 2 a 72°C por 7 min; e Biplex 3 e 4 a 60°C 60 min. Para genotipagem de cada amostra foi feita uma reação com 1,2  $\mu\text{L}$  de produto da PCR, 0,4  $\mu\text{L}$  de GS600 LIZ® e 8,6  $\mu\text{L}$  de formamida HI-DI™, para realização da eletroforese capilar em Sequenciador Automático ABI 3130 (Applied Biosystems). O tamanho dos fragmentos (alelos) de cada reação biplex foi determinado por interpretação dos picos de fluorescência gerados nos eletroferogramas por meio do software GeneMapper v.3.2 (Applied Biosystems). Todos esses procedimentos foram desenvolvidos no Laboratório DNA UDESC.

### **Análise dos dados**

A diversidade genética para cada população foi caracterizada por meio da riqueza alélica (R), número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (Ho), e heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (He). Os níveis de endogamia para cada uma das populações foram estimados pelos valores de F, calculados pela expressão  $\hat{F} = 1 - (\hat{H}_o/\hat{H}_e)$  de Nei (1978). A significância dos valores de F foi obtida pelos intervalos de confiança (95%) calculados por meio de *bootstrap* com 1000 permutações e o erro padrão (EP) das estimativas foi estimado por *Jackknife* entre os locos, com 1000 repetições. A fim de investigar diferenças nos níveis de diversidade genética (R, Ho e He) entre as populações foi utilizado o teste unilateral descrito por Goudet (2002), com significância testada por permutação, com 1000 repetições. Todas essas análises foram computadas com auxílio do programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 1995).

Para avaliar o efeito da barreira causada pelos plantios de *Pinus* nas frequências alélicas das populações estimou-se as estatísticas F de Wright por meio dos coeficientes de coancestralidade de Weir e Cockerham (1984), para quatro níveis hierárquicos de subdivisão (Figura 2). O índice de fixação da população total ( $F_{IT}$ ) foi então particionado em componentes para verificar a variação genética dentro das subpopulações locais ( $F_{IS}$ ) e entre as subdivisões das populações, comparado entre Adultos e Sementes ( $F_{AS}$ ), entre Fazendas ( $F_{FA}$ ) e entre Capões ( $F_{CA}$ ). Foram obtidos os intervalos de confiança (IC) para as estimativas, com significância a 95%, por meio de reamostragens *bootstrap* entre locos,

utilizando 1000 permutações. Esse tipo de análises foi feito com auxílio do programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 1999).

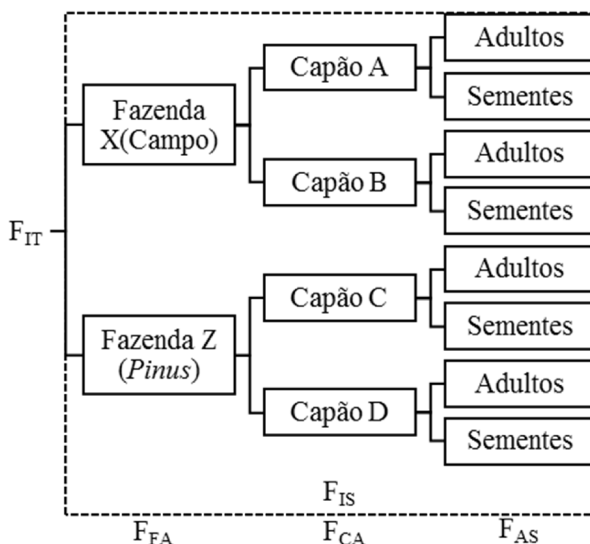


Figura 1 – Modelo dos níveis hierárquicos com os componentes da estatística F utilizado para análise de populações de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo e plantios de *Pinus*. (Hierarchical level model with F-statistic components used in *Araucaria angustifolia* populations in natural grasslands and *Pinus* plantations areas).

Fonte: Produção do próprio autor

## RESULTADOS

### Diversidade genética

O número de indivíduos machos reprodutivos presentes nos capões foi de 16 para o capão A, 21 para o B, 14 para o C e 13 para o capão D. Os resultados encontrados para as estimativas da diversidade genética pela análise de oito locos microssatélites estão sumarizados na Tabela 1. A amostra de 480 indivíduos (adultos e sementes), foi caracterizada por 477 genótipos diferentes, ou seja, houve três genótipos que foram representados por dois indivíduos. O número total de alelos foi de 89, com número médio de alelos por loco de 11,1 oscilando de quatro

(Ag45) a 21 (Ag20). A Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) variou entre locos de 0,165 a 0,829 com média de 0,674, a Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,178 a 0,877 com média de 0,661, e o índice de fixação para cada loco variou de -0,034 a 0,105 com média de 0,052.

O índice de fixação ( $\hat{F}$ ) foi positivo e significativamente diferente de zero ( $P < 0.01$ ) para população de sementes amostradas na Fazenda Z (florestamento com *Pinus*), com valor de  $\hat{F} = 0,076$  (IC a 95% = 0,031-0,135), para o conjunto total de sementes amostradas ( $\hat{F} = 0,062$ ; IC a 95% = 0,026-0,104) e para população total que apresentou valor de  $\hat{F}$  de 0,052 (IC a 95% = 0,011-0,104) (Tabela 1). Entretanto, a população de sementes amostradas na Fazenda X (campo natural) e as demais populações de adultos não apresentaram valores de  $F$  significativamente diferente de zero.

Não foram verificadas diferenças significativas na diversidade genética para  $\hat{R}$ ,  $\hat{H}_o$  e  $\hat{H}_e$  nas populações de adultos da Fazendas X e da Fazenda Z, nas populações de adultos e de sementes da Fazenda X e para as populações de sementes das Fazendas X e Z (Tabela 1). Porém, houve diferença significativa para os valores de  $\hat{R}$  ( $p = 0,036$ ),  $\hat{H}_o$  ( $p = 0,014$ ) e  $\hat{H}_e$  ( $p = 0,025$ ), nas populações de adultos com a de sementes da Fazenda Z, que apresentou menores índices de  $\hat{H}_o$  e  $\hat{H}_e$ , e maior  $\hat{R}$ .

Tabela 1 – Diversidade genética de adultos e sementes de *Araucaria angustifolia* em áreas de campo natural e florestamento com *Pinus*. (Genetic diversity in *Araucaria angustifolia* adults and seeds in natural grasslands and *Pinus* plantations areas).

População	n	$\hat{R}$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{F}$ (EP)
Fazenda X (campo)					
Adultos	47	7,1a	0,669a	0,684a	0,03(0,035)
Sementes	198	8,6ab	0,646ab	0,662ab	0,048(0,022)
Fazenda Z ( <i>Pinus</i> )					
Adultos	37	6,8a	0,694a	0,691a	0,003(0,027)
Sementes	198	7,8b	0,637b	0,661b	0,076(0,03)*
Média					
Adultos	84	6,9A	0,681A	0,687A	0,02(0,023)
Sementes	396	8,8B	0,641B	0,661B	0,062(0,022)*
Total	480	6,8	0,661	0,674	0,052(0,021)*

n, tamanho da amostra;  $\hat{R}$ , riqueza alélica com base em um número mínimo de 19 indivíduos;  $\hat{H}_o$ , heterozigosidade observada;  $\hat{H}_e$ , heterozigosidade esperada;  $\hat{F}$ , índice de fixação (erro padrão); Estimativas seguidas de letras minúsculas e maiúsculas são comparações feitas entre fazendas e conjunto de adultos e sementes, respectivamente. \*(p < 0,01).

Fonte: Produção do próprio autor

Das populações analisadas, o número de alelos encontrados foi menor para população de indivíduos adultos do Capão D (51 alelos) e maior para a população de sementes do Capão B (68 alelos). Foram encontrados 21 alelos exclusivos em todas as populações analisadas (Tabela 2), sendo que estes estão presentes em maior número nas populações de indivíduos adultos (13) do que nas populações de sementes (8), de ambas as fazendas analisadas. A presença de alelos exclusivos verificada nos capões de cada fazenda mostra que as populações em inseridas em área de campo natural possuem menor número de alelos exclusivos (8), do que as populações em área de florestamento com *Pinus* (13).

Tabela 2 – Número de alelos total e exclusivos em populações de adultos e sementes de *Araucaria angustifolia* sob diferentes paisagens. (Total number and private alleles in adults and seeds *Araucaria angustifolia* populations under different landscapes).

População	n	Número de alelos	Número de alelos exclusivos
Capão A adultos <sup>a</sup>	21	56	3
Capão B adultos <sup>a</sup>	26	59	2
Capão C adultos <sup>b</sup>	19	54	2
Capão D adultos <sup>b</sup>	18	51	6
Capão A sementes <sup>a</sup>	100	61	2
Capão B sementes <sup>a</sup>	98	68	1
Capão C sementes <sup>b</sup>	100	53	2
Capão D sementes <sup>b</sup>	98	67	3
Total	480	89	21

n, tamanho da amostra; a Fazenda X (campo natural); b Fazenda Z (florestamento com *Pinus*).

Fonte: Produção do próprio autor

### Estrutura e organização da variação genética

O resultado da estrutura genética das populações analisada de forma hierarquizada apresentou índice de fixação da população total  $F_{IT}$  próximo de 5% e significativamente diferente de zero (Tabela 3). A análise revelou que o índice de fixação dentro da população  $F_{IS}$ , não foi significativo, e que entre as populações os coeficientes de coancestralidade foram significativos na comparação entre capões ( $F_{CA}$ ) e entre gerações, de adultos e sementes ( $F_{AS}$ ), sugerindo divergência genética. Entretanto, não foi detectado divergência genética na comparação entre fazendas, pois o valor de  $F_{FA}$  não foi significativamente diferente de zero.

Tabela 3 - Estatísticas F obtidas pelos coeficientes de coancestralidade para oito locos microssatélites em populações de *Araucaria angustifolia* (F statistics obtained by the coancestry coefficients for eight microsatellite loci in *Araucaria angustifolia* populations).

Locos	F <sub>IT</sub>	F <sub>IS</sub>	F <sub>FA</sub>	F <sub>CA</sub>	F <sub>AS</sub>
Ag23	0,142	0,108	-0,021	0,033	0,037
Ag45	0,082	0,071	0,011	0,02	0,012
Ag20	0,035	-0,01	0,016	0,046	0,044
Ag56	0,024	-0,002	0,021	0,031	0,025
Ag94	0,046	0,018	-0,003	0,019	0,028
Aang24	-0,009	-0,034	0,002	0,025	0,024
CRCAC1	0,024	-0,021	0,012	0,042	0,044
CRCAC2	0,09	0,067	-0,009	0,031	0,024
Média	0,054*	0,026	0,002	0,03*	0,029*
IC (95%)	0,022	-0,009	-0,008	0,024	0,023
	0,093	0,064	0,012	0,036	0,036

Estimativas do índice de fixação da população total (F<sub>IT</sub>) e dentro das subpopulações locais (F<sub>IS</sub>); Coeficientes de coancestralidade entre Adultos e Sementes (F<sub>AS</sub>), entre Capões (F<sub>CA</sub>) e entre Fazendas (F<sub>FA</sub>); Intervalo de Confiança (IC); \*(p < 0,05).

Fonte: Produção do próprio autor

## DISCUSSÃO

### Diversidade genética

As populações de *Araucaria angustifolia* estudadas apresentaram índices elevados de diversidade genética, com Heterozigosidade esperada (He = 0,674) semelhante a outros estudos com a espécie utilizando marcadores microssatélites (CRISTOFOLINE, 2013, He = 0,596; SANT'ANNA *et al.*, 2013, He = 0,639). Os resultados indicam que a população adulta não diferiu entre as fazendas em termos de diversidade genética, sugerindo que estas populações são oriundas do acúmulo de vários eventos de reprodução e dispersão, bem como da sobreposição de gerações. A longevidade de espécies florestais favorece a manutenção da diversidade por um longo período, mesmo depois da exploração/fragmentação, conforme mencionado por Nason e Hamrick



(1997) e Hamrick (2004). Assim, é confirmado que populações remanescentes de *A. angustifolia* contém ampla diversidade genética apesar desta representar somente uma pequena fração das populações outrora existentes (STEFENON *et al.*, 2007; AULER *et al.*, 2002; SOUSA *et al.*, 2009)

Segundo Carvalho (2010) a Araucária foi intensamente explorada no século passado, com auge nas décadas de 1940 e 1950, o que reduziu o tamanho das populações e, conseqüentemente, a diversidade genética. A diferença verificada nos índices de diversidade genética entre adultos e sementes (Tabela 1), pode ser um efeito da diminuição do número de indivíduos que estão se reproduzindo nas populações remanescentes em relação às populações originais. Ou pelo fato de que nem todos os indivíduos adultos reprodutivos podem ter sido representados na amostra de sementes. No entanto, resultados semelhantes para a diversidade genética de adultos e progênes de *A. angustifolia* foram encontrados por Sant'Anna *et al.* (2013). A análise da diversidade das sementes refere-se apenas ao fluxo realizado de pólen de um único evento reprodutivo, mas que traz informações substanciais sobre o quanto do *pool* gênico das populações atuais pode ser transmitido para as próximas gerações.

A riqueza alélica significativamente menor nos indivíduos adultos em relação as sementes, pode ser explicada pelo menor número de indivíduos amostrados. Isto pode ter ocorrido na população adulta do Capão D (Tabela 2), a qual apresentou o menor número de alelos encontrados. Entretanto, a quantidade maior de alelos presente nas sementes do que na população adulta do Capão D, sugere que alguns alelos podem ser oriundos de indivíduos reprodutivos localizados fora dos capões analisados. Aliado a isso, a presença de alelos exclusivos em todas as populações analisadas sugere duas hipóteses: a primeira, é que nem todos os alelos presentes nos indivíduos reprodutivos foram passados para as sementes analisadas, sugerindo deriva genética no processo de reprodução; a segunda é que os alelos exclusivos encontrados nas sementes são oriundos de fluxo gênico externo ou pelo processo de mutação, onde ambos podem, de certa forma contrapor processos de deriva genética. Sendo estes, fatores muito importantes para manutenção da espécie, pois os capões estudados apresentam um número de indivíduos reprodutivos consideravelmente baixo para evitar, por si só os efeitos genéticos negativos de populações pequenas (Tabela 2). Segundo Bittencourt e Sebbenn (2007), para *A. angustifolia* esse número seria insuficiente para manutenção da população por um longo período sem

que tenha o efeito da endogamia. Contudo, para a espécie o fluxo gênico é capaz de aumentar o número efetivo da população e ajudar a manter a coesão genética entre os fragmentos, minimizando os efeitos da endogamia.

Teoricamente, espere-se níveis de endogamia baixos para espécies dioicas (WAYCOTT *et al.*, 1996), como a Araucária. Dessa forma, os resultados encontrados neste trabalho mostraram, em geral, índices de fixação baixos, de acordo com o esperado para a espécie, porém significativos para alguns casos, sugerindo endogamia. Valores de  $F$  não significativos em populações naturais de Araucária foram encontrados nos estudos de Mantovani *et al.* (2006) e Patreze e Tsai (2010), e significativos nos estudos de Auler *et al.* (2002), Stefenon *et al.* (2007), Bittencourt e Sebbenn (2009) e Sant'Anna *et al.* (2013). O índice de fixação esperado para sementes coletadas de uma única matriz é de no mínimo 0,125, por se tratar de indivíduos meio irmãos. Porém para o conjunto de sementes oriundas da coleta de 20 matrizes o valor de  $F$  foi de 0,062, metade do valor encontrado em indivíduos meio irmãos, indicando que na formação das sementes de cada matriz estão ocorrendo cruzamentos com diferentes doadores de pólen, assim como encontrado por Cristofolini (2013).

O índice de fixação não significativo encontrado para as sementes amostradas nos capões em área de campo natural (Fazenda X), indica baixa endogamia na formação das sementes, e que estas possuem uma heterogeneidade genética oriunda possivelmente de um elevado fluxo de pólen, assim como resultados encontrados por Bittencourt e Sebbenn (2009). O que torna essas populações aptas a servirem como fonte para coleta de sementes. O conjunto de sementes amostradas na área de florestamento com *Pinus* (Fazenda Z), por sua vez, apresentou índice de fixação significativo, com valor em torno de 7%, o que sugere a presença de endogamia possivelmente causado por um menor fluxo de pólen. Isso pode ser um indício de que o florestamento com *Pinus* forma uma barreira ao fluxo de pólen, porém, não o impede, diminuindo a migração de alelos entre os fragmentos. Devendo-se levar em conta que esse efeito pode ter ocorrido devido a características do local e que se referem ao evento reprodutivo apenas de um ano.

É importante salientar que, apesar de haver um indício de uma barreira ao fluxo de pólen formada pelos florestamentos com *Pinus*, as

populações desta área não apresentam elevados índices de endogamia, sugerindo que os mecanismos de fluxo gênico da espécie estão sendo capazes de manter consideráveis níveis de diversidade genética na população. Atribuindo-se ao fato da espécie se reproduzir por vários anos, ocupar o dossel das florestas e principalmente pelo pólen atingir longas distâncias (BITTENCOURT; SEBBENN 2007).

### **Estrutura e organização da variação genética**

A presença de divergência genética entre capões e entre adultos e sementes (Tabela 3), é consistente com os resultados encontrados nas comparações da diversidade genética, indicando que a variação genética difere entre capões para o conjunto das populações de adultos e sementes. Sant'Anna *et al.* (2013) também encontraram divergência genética entre adultos e sementes. A amostra da população reprodutiva e sua descendência, permitiu inferir que essas divergências genéticas foram originadas principalmente pelo fluxo realizado de pólen, e que as eventuais divergências podem estar ocorrendo tanto pela baixa taxa de troca de pólen entre indivíduos reprodutivos dentro dos capões, ou pela elevada taxa de imigração de pólen.

A estimação dos coeficientes de coancestralidade permitiu avaliar a estrutura genética em diferentes níveis da população total, dessa forma, foi possível verificar que a presença dos plantios de *Pinus* não foi suficiente para que se fixassem divergências genéticas entre as fazendas (Tabela 3). Todavia, os plantios florestais iniciaram nos últimos 50 anos, período em que a *Araucaria angustifolia* tinha uma distribuição natural contínua na região (KLEIN, 1960; REITZ; KLEIN, 1966), permitindo que houvesse uma conectividade entre as áreas. Segundo Kramer *et al.* (2008) a baixa divergência genética entre populações pode ocorrer se longas distâncias forem alcançadas na dispersão de pólen. O fato das áreas estarem próximas em uma escala de ocorrência da espécie, cerca de 9000 m, permitiu que as comparações entre as fazendas fossem feitas evitando-se o viés de características de ambientes diferentes, uma vez que diferenças para a população adulta não foram detectadas tanto por meio dos índices de diversidade quanto pela divergência genética entre fazendas.

Alguns estudos de estrutura genética da *A. angustifolia*, encontraram que a maior parte da variabilidade genética está distribuída

dentro das populações (AULER *et al.*, 2002; STEFENON *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2009). Esses resultados convergem com o presente estudo ao verificar que houve uma ausência de estrutura genética entre Fazendas, entretanto, os resultados são divergentes ao verificar que a maior parte da variação foi verificada entre os capões. No entanto, isso pode ter ocorrido por considerar-se cada capão como sendo uma população. Porém as distâncias verificadas entre um capão e outro, para cada fazenda, são menores do que as distâncias em que comumente verifica-se o alcance do fluxo gênico para *A. angustifolia* (287 m, BITTENCOURT; SEBBENN 2007; 325 m, SANT'ANNA *et al.* 2013; 334 m, CRISTOFOLINI, 2013). Desse modo, sugere-se que os diferentes capões dentro dessas fazendas representem apenas subdivisões de uma mesma população.

Uma estratégia para conservação *in situ* das populações em meio aos plantios florestais é a manutenção da vegetação natural dos capões e a formação de corredores de fluxo genético entre estes, que podem ser compostos de uma rede de pequenos fragmentos (capões ou árvores sozinhas). Pois importantes informações acerca do fluxo gênico via pólen (BURCZYK *et al.*, 2004; SMOUSE; SORK, 2004; ROBLEDO-ARNUNCIO; GILL, 2005; BITTENCOURT; SEBBENN, 2007) tem mostrado que populações espacialmente “isoladas” podem estar conectadas geneticamente por meio da dispersão de pólen e sementes. Para espécies com dispersão ou polinização pelo vento, a diminuição da densidade vegetal dos plantios florestais, pela abertura estradas e aceiros, pode aumentar ainda mais o alcance da dispersão, podendo ainda estes mecanismos serem utilizados como meios de proteção florestal.

## CONCLUSÃO

As sementes amostradas nos remanescentes inseridos em meio aos plantios florestais apresentaram em geral menores índices de diversidade genética e maiores índices de fixação. Os resultados demonstram que há indícios de que o florestamento entre os capões tende a reduzir o fluxo de pólen, entretanto, são necessários acompanhamentos de várias estações de reprodução para afirmação deste fato. De qualquer forma, sugere-se que estes capões representam importantes repositórios de diversidade da espécie *Araucaria angustifolia* e sua manutenção se concretiza como uma conservação *in situ*, no entanto, o manejo da paisagem no sentido de proporcionar maior fluxo de pólen é essencial para manter a diversidade da espécie nas gerações futuras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**. São Paulo, v. 25, n. 3, 2002.

BEHLING, H., PILLAR, V.D.P., ORLÓCI, L. & BAUERMANN, S.G. Late Quaternary *Araucaria* forest, grassland (“campos”), fire and climate dynamics, studied by high resolution pollen, charcoal and multivariate analysis of the Cambará do Sul core in southern Brazil.

**Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, California, v. 203: p. 277-297, n. 3, fev. 2004.

BEHLING, H.; JESKE-PIERUSCHKA, V.; SCHÜLER, L.; PILLAR V. P. Dinâmica dos campos no sul do Brasil durante o Quaternário Tardio, In: PILLAR V. P.; MÜLLER, S.C.; CASTILHOS, Z.M.S.; JACQUES, A.V.A. **Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: MMA, 2009. p. 13-24.

BITTENCOURT, J.M.; SEBBENN, A.M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, London, v. 99, n. 6, p.580–591, out. 2007.

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

BURCZYK, J.; DIFAZIO, S.P.; ADAMS, W.T. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 11, n.3 p. 179-192, ago. 2004.

CARVALHO, M.M.X. **O desmatamento das florestas de araucária e o Médio Vale do Iguaçu: uma história de riqueza madeireira e colonizações**. 2010. 313 f.. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em História) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

CRISTOFOLINI, C. **Dinâmica da diversidade genética de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze em paisagem de campo no estado de Santa Catarina** 2013. 93 f.. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

ENNOS, R.A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, London, v. 72, n. 3, p. 250–259, mar. 1994.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. Palo Alto, v. 34, p. 487–515, ago. 2003.

GOUDET, J. **FSTAT version 2.9.3.2**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Lausanne: Institute of Ecology, 2002. Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>. Acesso em: 20 ago.2013.

HAMRICK, J.L. Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management**. Amsterdam, v. 197, n.3, p. 323–335, ago. 2004.

JUMP, A.S.; PENUELAS, J. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 21, p. 8096–8100, 2006.

KLAUBERG, C.; PALUDO, G. F.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Florística e estrutura de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista no Planalto Catarinense. **Biotemas**, v. 23, n.1, p. 35–47, mar. 2010.

KLEIN, R.M. O aspecto dinâmico do pinheiro-brasileiro. **Sellowia**, Itajaí, v. 12, n. 12, p. 17–48, 1960

KRAMER, A.T.; ISON, J.; ASHLEY, M.V.; HOWE, H.F. The paradox of forest fragmentation genetics. **Conservation Biology**, Boston, v. 22, n.4, p. 878–885, ago. 2008.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **GDA-Genetic data analysis**: Computer program for the analysis of allelic data, version 1.0 (d16c) for windows. Albuquerque: The University of New Mexico. 1999. 39 p.

MANEL, S.; SCHWARTZ, M.K.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam v. 18, p. n. 4, 189–197, abr. 2003.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, A.P.C. e REIS, M.S. Internal genetic structure and outcrossing rate in a natural population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Journal of Heredity**, London, v. 97, n. 5, p. 466-472, set. 2006.

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

NASON, J.D.; HAMRICK, J.L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: Two case studies of Neotropical Canopy trees. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 88, p. 264-276, 1997.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Austin, v. 89, n. 3, p. 583–590, jul. 1978.

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

REITZ, R.; KLEIN, R.M. **Flora Ilustrada Catarinense**: Araucariaceaes. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1966, 62 p.  
ROBLED0-ARNUNCIO, J.J.; GIL, L. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total exclusion paternity analysis. **Heredity**, London, v. 94, n. 1, p. 13–22, jan. 2005.

SALGUEIRO, F.; CARON, H.; DE SOUSA, M.I.F.; KREMER, A.; MARGIS, R. Characterization of nuclear microsatellite loci in South

American Araucariaceae species. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 256–258, fev. 2005.

SANT'ANNA, C.S.; SEBBENN, A.M.; KLABUNDE, G.H.F.; BITTENCOURT, R.; NODARI, R.O.; MANTOVANI, A.; REIS, M.S. Realized pollen and seed dispersal within a continuous population of the dioecious coniferous Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze). **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 14, n. 3, p. 601–613, jun. 2013.

SCHMIDT, A.B.; CIAMPI, A.Y.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 340–342, mar. 2007.

SCOTT, L.J.; SHEPHERD, R.; HENRY, R.J. Characterization of highly conserved microsatellite loci in *Araucaria cunninghamii* and related species. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 236, p. 115–123, fev. 2003.

SMOUSE, P.E.; SORK, V.L. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. n.3, 197, p. 21–38, ago. 2004.

SOUSA, V.A.; HATTEMER, H.H. Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**, Victoria, v. 51, n. 3, p. 309–317, jun. 2003.

SOUZA, M.I.F.; SALGUEIRO, F.; CARNAVALE-BOTTINO, M.; FÉLIX, D.B.; ALVES-FERREIRA, M.; 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**. Ribeirão Preto, v. 32, n. 3, p. 546–556, jun. 2009.

STEFENON, V.M.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. Genetic structure of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) populations in Brazil: implications for the in situ conservation of genetic resources. **Plant Biology**, New York, v. 9, n. 4, p. 516–525, jul. 2007.



WAYCOTT, M.; WALKER, D.I.; JAMES, S.H. Genetic uniformity in a dioecious sea grass, *Amphibolis antarctica*. **Heredity**, London, v. 76, n. 6, p. 578–58, jun. 1996.

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

YOUNG, A.G.; BOYLE, T.J. Forest fragmentation. In: Young, A.G.; Boshier, D.; Boyle, T.J. **Forest conservation genetics: principles and practice**. Melbourne, 2000, p. 123–134.

## **CAPÍTULO II**

**Fluxo contemporâneo de pólen em *Araucaria angustifolia* em pequenas populações remanescentes (capões) em paisagem de campo e plantios florestais**

Grupo de pesquisa Uso e Conservação de Recursos Florestais, Centro de Ciências Agroveterinárias de Lages, Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages, Santa Catarina.

## RESUMO

Um dos principais mecanismos que mantém a coesão genética entre as populações é o fluxo de pólen entre elas. Objetivou-se investigar a influência de plantios de *Pinus* no padrão de dispersão de pólen de pequenas populações remanescentes (Capões) de *Araucaria angustifolia*. Para isso, foram conduzidas análises de paternidade com oito locos microssatélites para quatro populações de *A. angustifolia*, onde duas se encontravam em área de campo e duas em áreas de plantios de *Pinus*, ambas no município de Lages, SC. Nas áreas de estudo (Capões) foram mapeados e genotipados todos os 68 indivíduos machos reprodutivos e mais 400 sementes retiradas de 20 plantas matrizes (cinco por população). A análise de paternidade revelou, para a área de campo a que distância média de polinização foi de 170 m e o número efetivo de polinizadores  $N_{ep}$  foi de 9,8 e para área de plantio a distância média de polinização foi de 67 m e o número de polinizadores efetivos foi de 6,7. Maiores distâncias de pólen foram encontradas nas áreas de campo que apresentaram uma taxa de imigração de pólen de 46%, enquanto a área de plantio apresentou 33%. Sendo esses resultados um indicio de que os plantios de *Pinus* podem agir como barreira ao fluxo de pólen, embora ainda ocorra fluxo através dos plantios. Verificou-se a presença de estrutura genética espacial não significativa para os indivíduos adultos em ambas as áreas. Nem todos os indivíduos reprodutivos presentes nos remanescentes contribuíram para a formação da amostra de sementes, entretanto o fluxo de pólen externo contribuiu efetivamente para formação das sementes de dentro do capão.

Palavras chave: isolamento por barreira, estrutura genética espacial, sistema reprodutivo, distância de polinização, análise de paternidade

## INTRODUÇÃO

Grande parte das populações remanescentes de espécies florestais encontram-se fragmentadas e o elemento chave para prever os efeitos da fragmentação é o nível de fluxo gênico entre as populações (HAMRICK, 2004). A fragmentação pode interferir no sistema de cruzamento e no fluxo gênico de pequenas populações e árvores isoladas, alterando os processos ecológicos e evolutivos das populações (CUERTAS-HERNANDES *et al.*, 2010) resultando em significativos níveis de endogamia, coancestria, divergência populacional e redução de diversidade genética (WHITE *et al.*, 2002; BURCZYK *et al.*, 2004; HANSON *et al.* 2008; SEBBENN *et al.*, 2011; BREED *et al.*, 2012. Entretanto, os efeitos negativos previstos na teoria da genética de pequenas populações podem ser ausentes em fragmentos florestais se estes apresentarem efetivo fluxo gênico de pólen e sementes a longas distâncias (HAMRICK 2004; KRAMER *et al.* 2008).

O fluxo gênico é um dos fatores mais importantes na formação da estrutura genética das populações (BURCZYK *et al.*, 2004), sendo o principal mecanismo que mantém a coesão genética entre populações (FUCHS e HAMRICK 2010). O fluxo de pólen, por sua vez, tem sido considerado como o maior componente do fluxo gênico de espécies florestais polinizadas pelo vento (DOW e ASHLEY 1998; DYER e SORK 2001; ROBLEDO-ARNUNCIO e GILL 2005; SMOUSE e SORK 2004). Nesse contexto, fragmentos florestais e árvores isoladas podem servir de importantes trampolins para fluxo gênico, favorecendo a conectividade e aumentando a variabilidade da população (CHASE *et al.*, 1996; DICK, 2001; WHITE *et al.*, 1999, 2002).

Pequenas populações isoladas fornecem uma interessante oportunidade para estudos do sistema de cruzamento e dispersão de pólen. O reduzido número de indivíduos presente nos pequenos fragmentos potencialmente permite discriminar as contribuições dos doadores de pólen na população e as taxas de imigração de pólen (ROBLEDO-ARNUNCIO e GILL 2005). Métodos baseados em análise de paternidade tem sido largamente usados para caracterizar os padrões de dispersão de pólen em espécies florestais (BURCZYK *et al.*, 1996; DOW e ASHLEY, 1998; KONUMA *et al.*, 2000; LIAN *et al.*, 2001; BURCZYK *et al.*, 2002; ROBLEDO-ARNUNCIO; GILL, 2005, BITTENCOURT e SEBBENN 2007; MORAES e SEBBENN 2011, SANT'ANNA *et al.*, 2013),

fornecendo estimativas precisas do efetivo fluxo de pólen e da distância de polinização a partir da localização dos pais potenciais dentro da população local (BURCZYK *et al.*, 2004). Essas informações fornecem importantes suposições a respeito da conservação e elaboração de estratégias de manejo (BAWA 1992; ÁLVAREZ-BUYLLA *et al.* 1996; REIS *et al.* 2000, NAZARENO 2013).

Vários são os estudos já realizados caracterizando a estrutura e a diversidade genética de indivíduos adultos de *Araucaria angustifolia* (AULER *et al.*, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2006, STEFENON *et al.*, 2008, SOUZA *et al.*, 2009; BITTENCOURT e SEBBENN 2009), bem como evidenciando o fluxo gênico (BITTENCOURT e SEBBENN, 2007, 2008, SANT'ANNA *et al.*, 2013, CRISTOFOLINI, 2013) com intuito de promover a conservação genética da espécie. Esses estudos fornecem várias informações acerca da organização da variabilidade genética, fluxo gênico bem como os efeitos genéticos da fragmentação de habitats em pequenas populações isoladas. De fato a fragmentação pode isolar populações devido à distância, porém esse isolamento pode ser ainda maior, pela presença de barreiras físicas formadas pela substituição da paisagem natural de campo por plantios florestais e, para *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze, atualmente os estudos verificando esses efeitos são inexistentes.

Neste estudo investigou-se os padrões de reprodução e dispersão de pólen em pequenos remanescentes de floresta (Capões) com *A. angustifolia* inseridos em paisagens de campo e florestamento com *Pinus*, por meio da análise de paternidade a partir dos genótipos obtidos com oito locos microssatélites. Avaliou-se também os efeitos da paisagem na distância de polinização e na taxa de imigração de pólen, para cada situação. Foram testadas três principais hipóteses: Primeiro, a matriz florestal formada por plantios de *Pinus* age como barreira ao fluxo de pólen entre capões com *A. angustifolia* localizados em meio a estes plantios florestais, e dessa forma, o fluxo de pólen é maior em áreas de campo do que em ambientes florestais; Segundo, capões com *A. angustifolia* em meio aos florestamentos com *Pinus* possuem um isolamento e as sementes geradas nesses ambientes são oriundas de cruzamento entre indivíduos mais próximos; e por fim testou-se se o número de pais que contribuem na formação das sementes de *A. angustifolia* é maior em áreas de campo, pelo maior fluxo de pólen, do que em áreas sujeitas a altas densidades vegetais como florestamento com *Pinus*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Espécie de estudo

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze (Araucariaceae) é uma conífera, dioica, polinizada pelo vento que ocorre exclusivamente na Floresta Ombrófila Mista. A Araucária possui uma distribuição geográfica de ocorrência natural com maior concentração nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná e em pequenas manchas nas partes mais altas de São Paulo e Minas Gerais (CARVALHO, 1994). Exemplares da espécie podem apresentar 20 a 25 metros de altura com tronco geralmente cilíndrico (KLEIN, 1960; REITZ *et al.*, 1979; CARVALHO 1994). A formação das suas sementes ocorre num período compreendido de 29 a 34 meses, com início a partir da diferenciação celular para formação da estrutura reprodutiva, seguido pela polinização, que ocorre um ano depois e finalmente a maturação das sementes ocorre 20 meses após a polinização (ANSELMINI *et al.*, 2006).

### Áreas de estudo

O estudo foi realizado em duas propriedades privadas localizadas no município de Lages próximo ao entroncamento com a BR 116 e a BR 282, região do Planalto Sul Catarinense. As fazendas estão localizadas entre a latitude 27° 46' Sul e longitude 50°22' Oeste, com altitude em torno de 950 m. O clima predominante na região é do tipo Cfb de Köppen (mesotérmico subtropical úmido, com verões frescos, sem estação seca definida, com ocorrência de geadas severas e frequentes durante o inverno). A precipitação média anual é de 1200 mm, com temperaturas oscilando entre -7°C a 35°C e média de 16°C. A cobertura vegetal original desta região é descrita por Klein (1978) como Vegetação Ombrófila Mista. Segundo Mattos (1994) é comum nesta região a formação de capões de Mata com Araucária espalhados pelos campos. A vegetação dos campos possui uma predominância de agrupamentos herbáceos associados a capões e matas de galeria, muitas vezes se alargando e formando bosques de pinhais em meio a vegetação campestre (Klein, 1978).

Das fazendas selecionadas a Fazenda Cruz de Malta representa matriz de campo e a Fazenda Espigão representa a matriz de paisagem de plantios florestais, que neste estudo denominaram-se de Fazenda X e Fazenda Z, respectivamente. A paisagem que constitui a Fazenda X é um mosaico entre fragmentos de floresta com Araucária (Capões) em meio

aos campos naturais, com histórico de uso com pecuária extensiva e atualmente está sendo convertida para silvicultura. O segundo ambiente apresenta fragmentos com Araucária (Capões) em meio a florestamentos de *Pinus*, e possui um histórico de uso da área com pecuária e bovinocultura de leite, que foi convertida para silvicultura de *Pinus* na metade da década de 1960 e atualmente os povoamentos de *Pinus* encontram-se no final do terceiro ciclo, com altura superior as árvores de Araucária presente nos capões.

## **Demografia**

O levantamento demográfico feito em cada ambiente (Fazenda) amostrou dois fragmentos (capões) por fazenda, sendo os fragmentos da Fazenda X denominados de Capão A e Capão B e os fragmentos da Fazenda Z denominados de Capões C e D (Figura 2). Com distâncias médias de 9000 metros entre as fazendas, 360 metros entre os Capões A e B e 270 metros entre os capões C e D. Dentro dos capões todos os indivíduos de *A. angustifolia* foram mapeados (georrefenciados com um GPS), mensurados e, aqueles com DAP (Diâmetro a altura do peito) acima de 20 cm foram etiquetados com placa de alumínio contendo o nome da fazenda, capão e número do indivíduo. A sexagem foi verificada através das estruturas reprodutivas microestróbilo e megastróbilo com auxílio de um binóculo. Aqueles indivíduos que não apresentaram estrutura reprodutiva foram considerados como *não reprodutivos*.

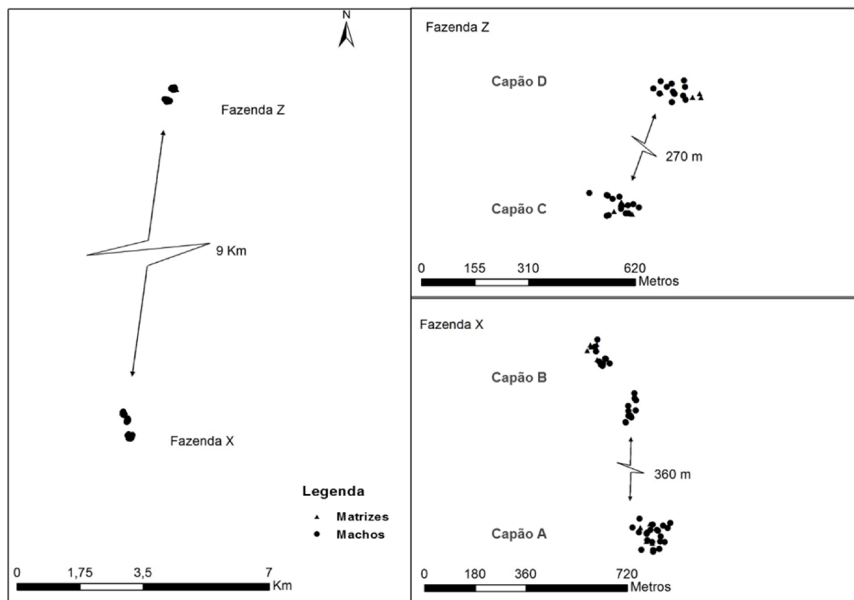


Figura 2 – Mapa dos indivíduos de *Araucaria angustifolia* analisados em paisagem de Campo (Fazenda X) e em paisagem de plantios de *Pinus* (Fazenda Z).

Fonte: Produção do próprio autor

### Coleta para análise genética

Para análise genética e de paternidade foi realizada coleta de pequenos ramos contendo cerca de 50 acículas, para todos indivíduos reprodutivos identificados como masculinos e para as matrizes das quais foram coletas sementes. Cinco plantas mãe por capão foram selecionadas para coleta de sementes, onde coletou-se de cada uma delas cinco pinhas, e destas foram retiradas quatro sementes de cada. Em síntese foram amostrados, quatro sementes por pinha, cinco pinhas por matriz e cinco matrizes por capão. Em número isso representa um total de 400 sementes, 100 pinhas e 20 matrizes. A coleta dos ramos dos indivíduos machos e das matrizes foi realizada com uso de estilingue, sendo cada ramo armazenado em sacos individuais e acondicionados em caixas térmicas com gelo para posteriormente serem armazenados no laboratório. A coleta das sementes foi feita através de escalada e retirada das pinhas. As amostras de ramos foram armazenadas em Freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  e as sementes



em geladeira a  $-4^{\circ}\text{C}$ , ambas no Laboratório DNA UDESC da Universidade do Estado de Santa Catarina. O número de indivíduos masculinos reprodutivos analisados para os capões A, B, C, e D foi de 16, 21, 14 e 13, respectivamente.

### Extração de DNA e amplificação

O procedimento utilizado para extração do DNA foi pelo método CTAB (brometo de cetil trimetil amônio) de acordo com o protocolo de extração proposto por Mazza e Bittencourt (2000), com pequenos ajustes feitos para extração das sementes e adequação as condições do laboratório. Para extração do DNA das sementes foi utilizado o tecido do embrião.

Para as reações de amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) testou-se 11 locos microssatélites descritos para espécie, mas apenas oito foram selecionados para análise, por serem classificados como aptos a detecção fiel dos alelos nos eletroferogramas. Dos oito locos utilizados neste estudo foram feitas reações de otimização para quatro reações chamadas de biplex (Tabela 4). Para amplificação das amostras foi utilizada uma reação contendo 30 ng de DNA,  $0,2\text{ }\mu\text{M}$  de cada primer,  $0,2\text{ mM}$  de cada DNTP,  $1\times$  Tampão,  $1,5\text{ mM}$  Cloreto de Magnésio,  $0,8\text{ U}$  de Platinum® *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultrapura para um volume final de  $15\text{ }\mu\text{L}$ . Foi utilizado um termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler para realização da PCR da seguinte maneira: desnaturação inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  por 3 min, 30 ciclos com as etapas de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 45 s,  $T_a^{\circ}\text{C}$  por 45 s, extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por 45 s e extensão final conforme descrição na Tabela 4.

Tabela 4 – Locos microssatélites otimizados em reações biplex para análise e caracterização genética em *Araucaria angustifolia*.

Locos	Reação	$T_a^{\circ}\text{C}$	Extensão final	Autores
Ag94	Biplex 1	55	$72^{\circ}\text{C}$ por 7 min	Salgueiro <i>et al.</i> , (2005)
Aang24	Biplex 1	55	$72^{\circ}\text{C}$ por 7 min	Schimidt <i>et al.</i> , (2007)
Ag23	Biplex 2	56	$72^{\circ}\text{C}$ por 7 min	Salgueiro <i>et al.</i> , (2005)
Ag45	Biplex 2	56	$72^{\circ}\text{C}$ por 7 min	Salgueiro <i>et al.</i> , (2005)
Ag20	Biplex 3	60	$60^{\circ}\text{C}$ por 60 min	Salgueiro <i>et al.</i> , (2005)
Ag56	Biplex 3	60	$60^{\circ}\text{C}$ por 60 min	Salgueiro <i>et al.</i> , (2005)
CRCAc1	Biplex 4	54	$60^{\circ}\text{C}$ por 60 min	Scott <i>et al.</i> , (2003)
CRCAc2	Biplex 4	54	$60^{\circ}\text{C}$ por 60 min	Scott <i>et al.</i> , (2003)

$T_a$ , temperatura de anelamento. Fonte: Produção do próprio autor

## Genotipagem

A genotipagem foi realizada através da leitura de fluorescência de cada amostra amplificada, por uma reação com contendo 1,2 µL de produto amplificado, 0,4 µL de GS600 LIZ® e 8,6 µL de formamida HI-DI™. A detecção da fluorescência foi através da técnica de eletroforese capilar em Sequenciador Automático ABI 3130 (Applied Biosystems). O tamanho dos fragmentos (alelos) de cada reação biplex foi determinado por interpretação dos picos de fluorescência gerados nos eletroferogramas através do software GeneMapper v.3.2 (Applied Biosystems).

## Análise da diversidade genética

A diversidade genética de adultos e sementes verificada por meio de oito locos microssatélites foi caracterizada pelo número de alelos por loco, Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para as populações estudadas e para o conjunto de locos utilizado estimou-se probabilidade de exclusão para o par de parentes paterno ( $P_{(ex)}$ ) (Tabela 6). Essas análises foram conduzidas utilizando-se o programa CERVUS 3.0 (MARSHALL *et al.*, 1998; KALINOWSKI *et al.*, 2007).

## Estrutura genética espacial

A distribuição espacial dos genótipos adultos para cada fazenda foi analisada utilizando-se a estimativa do coeficiente de coancestria entre pares de árvores ( $\theta_{xy}$ ) proposto por J. Nason e descrito por Loiselle *et al.* (1995). O coeficiente  $\theta_{xy}$  é a extensão da similaridade entre os indivíduos  $x$  e  $y$ , relativo à similaridade genética média entre dois indivíduos aleatórios da amostra (HARDY e VEKEMANS, 2002). Este coeficiente é definido para cada  $k$ -ésimo alelo do  $l$ -ésimo loco em cada par de indivíduos,  $x$  e  $y$ , como:  $\hat{\theta}_{xy} = \left[ \frac{\sum_l \sum_k (p_{xlk} - \bar{p}_{lk}) (p_{ylik} - \bar{p}_{lk})}{\sum_l \sum_k \bar{p}_{lk} (1 - \bar{p}_{lk})} \right] + \left[ \sum_l \frac{1}{(2n_l - 1)} \right]$ , em que  $p_{xlk}$  e  $p_{ylik}$  são as frequências do alelo  $k$  no loco  $l$  no indivíduo  $x$  e  $y$ , respectivamente (assumindo valores de zero, 0,5 e 1 em homozigotos para alelos alternativos, heterozigotos e indivíduos homozigotos para o alelo em consideração, respectivamente).  $\bar{p}_{lk}$  é a frequência média do alelo  $k$  no loco  $l$  na população amostrada;  $n_l$  é o número de alelos existentes no loco  $l$ . Para visualização da estrutura genética espacial, os valores de  $\theta_{xy}$  foram calculados para a média de pares de indivíduos dentro de dez classes de distância determinadas para contemplar os dados

e para fins de comparação com outros estudos. Foram determinadas dez classes (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500) todas de tamanho de 50 m. Para testar se os valores dentro de cada classe eram significativamente diferentes de zero, um intervalo de confiança a 95% de probabilidade foi calculado para cada valor observado em cada classe de distância, usando 10.000 permutações de indivíduos em diferentes classes de distância. O intervalo de confiança e os valores médios foram utilizados para construir o correlograma. Essas análises foram realizadas utilizando o programa SPAGEDI versão 1.3 (HARDY e VEKEMANS 2002).

### **Sistema reprodutivo, número efetivo de doadores de pólen e coancestria**

O sistema reprodutivo foi analisado com base no modelo de cruzamento misto e o modelo de cruzamento correlacionado, implementado no software Multilocus MLTR versão 3.1 (RITLAND, 2004). Estimou-se para as duas fazendas os parâmetros de taxa de cruzamento multiloco (tm), taxa de cruzamento uniloco (ts) e taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados (tm-ts). O erro padrão das estimativas foi calculado por 1.000 permutações entre indivíduos e usado para obter o intervalo de confiança de 95%. O número efetivo de doadores de pólen foi estimado, de acordo com Burczik *et al.* (1996), a partir do número de doadores de pólen detectados por análise de paternidade ( $n_p$ ), como sendo  $\hat{N}_{ep} = 1 / \sum_{i=1}^{np} p_i^2$ , onde  $n_p$  é o número de sementes analisadas e  $p_i$  é a proporção de sementes geradas pelo pai  $i$ . A partir do número efetivo de doadores de pólen de cada fazenda estimou-se a correlação de paternidade como  $\hat{r}_p = 1 / \hat{N}_{ep}$ . Com base na correlação de paternidade, o coeficiente médio de coancestria dentro das famílias ( $\Theta_{xy}$ ) foi estimado como  $\hat{\Theta}_{xy} = 0,125(1 + \hat{F}_p)(1 + \hat{r}_p)$ , onde  $\hat{F}_p$  é o coeficiente de endogamia na população reprodutiva (Sousa *et al.* 2005). A variância no tamanho efetivo ( $N_{e(v)}$ ) para as famílias foi estimado como  $\hat{N}_{e(v)} = 0,5 / \hat{\Theta}_{xy}$  (COCKERHAM 1969).

### **Análises de paternidade**

A Análise de paternidade, de cada semente coletada das árvores matrizes, foi realizada por meio da atribuição de máxima-probabilidade de paternidade (*maximum-likelihood paternity assignment*) (MEAGHER 1986, MEAGHER e THOMPSON, 1986). A paternidade foi atribuída pela comparação dos genótipos obtidos por meio de oito locos

microsatélites, para os indivíduos machos, plantas mãe e sementes utilizando o programa CERVUS 3.0 (MARSHALL *et al.* 1998; KALINOWSKI *et al.* 2007), empregando-se como referência as frequências alélicas estimadas apenas na geração parental, como sugerido por Meagher e Thompson (1987). Os alelos imigrantes, detectados nas sementes e que não se encontravam na população adulta reprodutiva, tiveram sua frequência estimada e foram adicionados ao arquivo com as frequências alélicas de referência da geração parental. O pai mais provável foi determinado pelo valor de  $\Delta$  (MARSHALL *et al.* 1998, KALINOWSKI *et al.* 2007) e que é a diferença dos escores LOD (logaritmo natural da probabilidade de um indivíduo ser atribuído como pai acumulada entre os locos) dos dois mais prováveis pais de um indivíduo. Foi atribuído um valor crítico de  $\Delta$ , através de um nível de confiança, onde simulações foram conduzidas usando 1000 repetições, 0.01 como a proporção de erros de digitação, 0.99 como percentagem de locos digitados e como prováveis candidatos a pai para cada semente teve-se 44 e 27 para as Fazendas X e Y, respectivamente. Usou-se para os intervalos de confiança 95% como restrito e 80% como relaxado, assim como sugerido por Marshall *et al.*, (1998). Como todos os machos e matrizes da população tinham o seu genótipo determinado e sua posição espacial conhecida em termos de coordenadas X e Y, as sementes que tiveram o pai determinado foram utilizadas para determinar as efetivas distâncias mínima, máxima e média de dispersão de pólen, que correspondia a distância linear entre a matriz e o putativo pai. No caso em que o pai não foi determinado dentro do capão, não foi possível calcular a distância de pólen pelo fato do doador de pólen estar fora da amostra. A taxa de imigração de pólen ( $m$ ) foi calculada como a proporção de sementes que não tiveram um candidato a pai determinado dentro do capão, ( $n_{imigrante}$ ) em relação ao total de sementes genotipados ( $n_{total}$ ) dentro da população,  $\hat{m} = \hat{n}_{imigrante}/n_{total}$ .

O fluxo gênico crítico ( $FG_C$ ), que é a probabilidade de encontrar um candidato compatível como pai dentro da população, quando o verdadeiro pai encontra-se fora da população, foi calculado segundo Dow e Ashley (1998),  $FG_C = 1 - (1 - P_{nExc})^n$ , em que  $P_{nExc}$  é o poder de não exclusão (probabilidade de não excluir o verdadeiro parental materno ou paterno de um indivíduo) determinado para o par de parentes (pai e mãe) e  $n$  é o número de candidatos a pai encontrados como putativos parentais paternos na análise de paternidade.

## RESULTADOS

### Estrutura genética espacial

Verificou-se que não houve estrutura genética espacial significativa, de acordo com o coeficiente de coancestria, para as classes de distância avaliadas (Figuras 3 e 4). O coeficiente de coancestria médio estimado para todas as classes foi de 0,0034 e 0,00014, para as fazendas X e Z, respectivamente. De acordo com o intervalo de confiança de 95% estimado por *jackknife* entre locos, o coeficiente de coancestria não foi significativamente diferente de zero para todas as classes de distâncias analisadas, tanto para a fazenda X quanto para a fazenda Z.

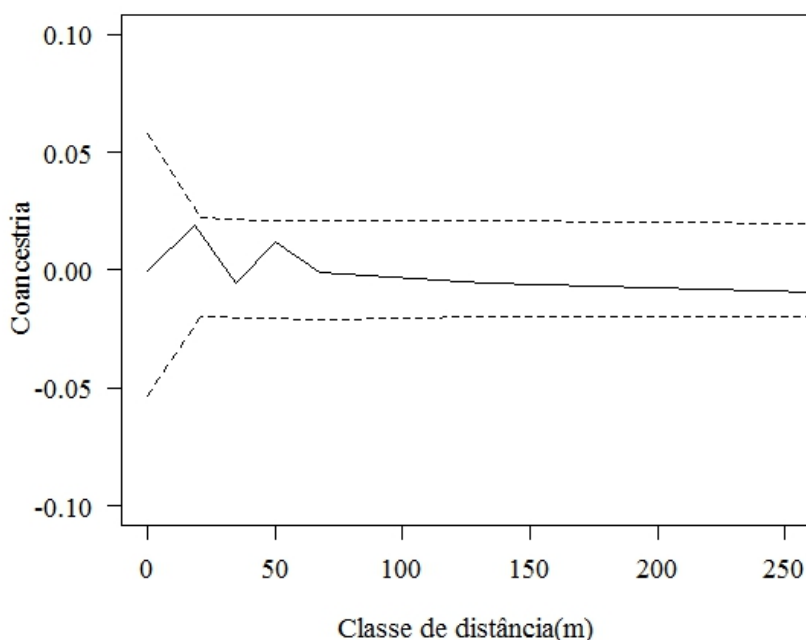


Figura 3 – Estrutura genética espacial nos indivíduos adultos reprodutivos de *Araucaria angustifolia* em capões em meio ao campo. A linha contínua refere-se a estimativa do coeficiente de coancestria médio e as linhas pontilhadas referem-se a estimativa do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade da hipótese de ausência de estrutura genética. ( $H_0: \theta_{xy} = 0$ ).

Fonte: Produção do próprio autor

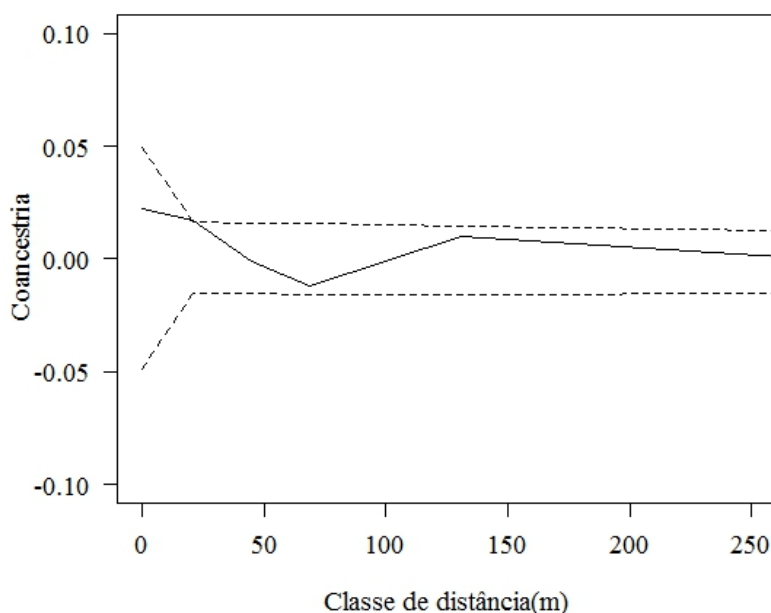


Figura 4 – Estrutura genética espacial nos indivíduos adultos reprodutivos de *Araucaria angustifolia* em capões em meio a plantios de *Pinus*. A linha contínua refere-se a estimativa do coeficiente de coancestria médio e as linhas pontilhadas referem-se a estimativa do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade da hipótese de ausência de estrutura genética. ( $H_0: \theta_{xy} = 0$ ).

Fonte: Produção do próprio autor

### Sistema reprodutivo, número efetivo de doadores de pólen e coancestria

A taxa de cruzamento multilocos estimada para os grupos formados pelos capões dentro de cada fazenda variou de 0,981 a 1,2 (em termos práticos o valor 1,2 não difere de 1) e taxa de cruzamento uniloco variou de 0,909 a 0,973, os valores médios de cada fazenda estão sumarizados na Tabela 5. A diferença entre essas taxas foi baixa, sugerindo uma baixa proporção de acasalamento entre indivíduos aparentados, com valores de  $t_m - t_s$  de 0,022 a 0,052, para as Fazendas X e Z, respectivamente.

O número efetivo de doadores de pólen calculado para Fazenda X foi de  $\hat{N}_{ep} = 16,4$  e para a Fazenda Z de  $\hat{N}_{ep} = 8,9$  (Tabela 7). O

coeficiente médio de coancestria dentro das famílias ( $\Theta_{xy}$ ) e a variação de tamanho efetivo ( $N_{e(v)}$ ) foi estimado como 0,128 e 3,9, respectivamente para Fazenda X. Para a Fazenda Z esses valores foram  $\Theta_{xy} = 0,139$  e  $N_{e(v)} = 3,59$  (Tabela 5).

Tabela 5 – Características do sistema de cruzamento em indivíduos de *Araucaria angustifolia* presentes em paisagem de campo (Fazenda X) e em área de florestamento com *Pinus* (Fazenda Z).

Estimativa	Fazenda X	Fazenda Z
Taxa de cruzamento multiloco: $t_m$	1,2 (0.00)	0,99 (0.069)
Taxa de cruzamento uniloco: $t_s$	0.971 (0.012)	0.938 (0.021)
Taxa de cruzamento entre parentes: $t_m-t_s$	0.0229 (0.012)	0.052 (0.065)
Coeficiente de coancestria dentro das famílias: $\Theta_{xy}$	0,128	0,139
Correlação de paternidade: $r_p = 1/N_{ep}$ :	0,061	0,112
Variação de tamanho efetivo: $N_{e(v)}$	3,9	3,59

Fonte: Produção do próprio autor

## Diversidade genética e análise de paternidade

Para o total de indivíduos amostrados incluindo a fazenda com campo (adultos e sementes) e a fazenda com plantios de *Pinus* (adultos e sementes), o número de alelos por loco variou de 4 a 21, com média de 11,1 e um total de 91 alelos (Tabela 6). A heterozigosidade observada variou de 0,178 a 0,875 (média de 0,649), e a heterozigosidade esperada variou de 0,146 a 0,882 (média de 0,681). A probabilidade de exclusão com o conjunto de locos utilizado foi de 0,99998 para o par de parentes. O fluxo gênico crítico verificado nas sementes foi de 0,0008 e 0,0005 para as fazendas X e Z respectivamente, o que representa um número baixo de indivíduos serem atribuídos como pai erroneamente.

Tabela 6 – Características dos oito locos microssatélites usados em populações de *Araucaria angustifolia* de campo e plantios de *Pinus*.

Locos	n	k	Ho	He	P <sub>(ex)</sub>
Ag23	484	12	0,674	0,782	0,139
Ag45	489	4	0,409	0,443	0,077
Ag20	488	21	0,816	0,832	0,02
Ag56	488	8	0,762	0,771	0,012
Ag94	487	14	0,846	0,882	0,041
Aang24	489	13	0,875	0,862	-0,015
CRCAC1	490	5	0,145	0,146	0,01
CRCAC2	484	14	0,665	0,728	0,086
Média		11,3	0,649	0,681	-
Total		91	-	-	0,99998

n: número de indivíduos; k: número de alelos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; P(ex): probabilidade de exclusão para o par de parentes paterno.

Fonte: Produção do próprio autor

Todas as sementes que o doador de pólen foi atribuído através da análise de paternidade no programa Cervus, foram atribuídas com o intervalo de confiança restrito (95%). Das 400 sementes amostradas neste estudo, a genotipagem foi possível para 398, sendo que o doador de pólen pode ser atribuído para 268 (67%) sementes. Para as sementes oriundas dos capões em área de campo (Fazenda X), das 199 sementes genotipadas o doador de pólen foi atribuído para 123 (62%), e para os capões em meio aos plantios de *Pinus* foi atribuído o doador de pólen para 145 (75%) das 198 sementes genotipadas. As demais sementes, 75 (38%) para a fazenda X e 65 (25%) para a fazenda Z, representam pólen originado de árvores de fora dos capões estudados (Tabela 7). Determinou-se que dos 69 possíveis doadores de pólen amostrados, 51 (74%) deles foram atribuídos como pai de pelo menos uma semente, as outras plantas possivelmente não entraram na amostra, ou podem não ter deixado descendentes, neste evento reprodutivo. Para cada uma das matrizes analisadas atribuiu-se a paternidade para no mínimo seis sementes (matriz ZD01-F) e para todas as sementes coletadas (matriz ZC01-F). Para a Fazenda X das 123 sementes cujo doador de pólen foi atribuído, 16 (13%) delas o doador de pólen foi encontrado no outro capão analisado, e para a Fazenda Z esse número foi 13 (9%) de 145. A contribuição mínima de doadores de pólen por matriz analisada foi encontrada na matriz ZC04-F, presente no capão



C, com apenas dois pais atribuídos para 19 sementes, e a maior contribuição de doadores de pólen por matriz foi de oito para nove sementes com paternidade atribuída (matriz XB10-F), presente no capão B.

### **Distância de polinização e fluxo gênico**

Para as sementes que não foram possíveis de atribuir o doador de pólen dentro do capão assumiu-se como imigração de pólen, assim também considerou-se quando o pai atribuído localizava-se em outro capão. Dessa forma, a taxa de imigração de pólen foi de 46% para Fazenda X e de 33% para Fazenda Z (Tabela 7). As maiores trocas dentro do capão ocorreram no capão C, e as maiores trocas entre capões ocorreram no capão B.

Para a Fazenda X, dos 46% do fluxo de pólen caracterizado como imigração, 8% migrou de um dos capões analisados para o outro, que apresentava distância média entre indivíduos reprodutivos de 365 m. Para a fazenda Z dos 33% do pólen oriundo de fora do capão, 6% foi troca entre os dois capões analisados, com distância média entre os indivíduos reprodutivos de 215 m. Apesar da fazenda Z apresentar menores distâncias médias entre os indivíduos, estes apresentaram um menor fluxo entre capões, do que a fazenda X. A distância média efetiva de polinização foi de 170 m, com mínima de cinco metros e máxima de 728 m para os capões presentes em áreas de campo (Fazenda X) e para os capões inseridos em meio aos plantios de *Pinus* (Fazenda Z) as distâncias média, mínima e máxima foram 67, quatro e 432 m, respectivamente.

Tabela 7 – Fluxo de pólen por matriz de Araucaria angustifolia inseridas em paisagem de campo natural (Fazenda X) e em florestamento com Pinus (Fazenda Z).

Matriz	n	Fluxo de pólen (proporção)			N <sub>ap</sub>	Distância	
		de dentro do capão	de outro capão	fora dos capões		dentro do capão	entre capões
XA01-F	20	15 (0.75)	2 (0.1)	3 (0.15)	4.3	27±22	647±4
XA02-F	20	12 (0.6)	2 (0.1)	6 (0.3)	5.2	22±17	691±50
XA06-F	20	12 (0.6)	0 (0)	8 (0.4)	2.1	254±11	0±0
XA14-F	20	13 (0.65)	0 (0)	7 (0.35)	4.6	38±30	0±0
XA500-F	20	13 (0.65)	2 (0.1)	5 (0.25)	4.2	29±30	661±27
XB04-F	20	7 (0.35)	2 (0.1)	11 (0.55)	3	30±5	666±37
XB08-F	20	16 (0.8)	1 (0.05)	3 (0.15)	2.6	37±67	728±0
XB10-F	20	5 (0.25)	4 (0.2)	11 (0.55)	7.4	112±127	692±15
XB11-F	20	7 (0.35)	2 (0.1)	11 (0.55)	6.2	77±87	680±2
XB12-F	19	7 (0.3)	1 (0.05)	11 (0.58)	4.6	68±84	664±0
Total Fazenda X	199	107 (0.54)	16 (0.08)	76 (0.38)	16.4	41±53.7	678±28

Continua

Continuação

Matriz	n	Fluxo de pólen (proporção)		N <sub>ep</sub>	Distância	
		de dentro do capão	de outro capão		dentro do capão	entre capões
ZC01-F	20	20 (1)	0 (0)	1.4	14±8	0±0
ZC04-F	20	19 (0.95)	0 (0)	1.4	4±0	0±0
ZC08-F	20	15 (0.75)	1 (0.05)	3.3	13±6	403±0
ZC09-F	20	17 (0.85)	1 (0.05)	4.5	27±9	417±0
ZC11-F	20	12 (0.6)	1 (0.05)	2.3	33±12	432±0
ZD01-F	20	6 (0.3)	0 (0)	4.5	72±35	0±0
ZD02-F	20	7 (0.35)	6 (0.3)	6.8	79±25	385±8
ZD05-F	19	8 (0.42)	1 (0.05)	10 (0.52)	47±28	385±0
ZD10-F	20	13 (0.65)	2 (0.1)	4.2	36±29	336.5±4
ZD11-F	20	15 (0.75)	1 (0.05)	4 (0.2)	38±23	362±0
Total Fazenda Z	199	132 (0.67)	13 (0.065)	54 (0.27)	8.9	28.8±27
						383±28

n, tamanho da amostra; fluxo de pólen de dentro do capão, do outro capão e de fora dos capões (proporção); número efetivo de doadores de pólen (N<sub>ep</sub>); distância média da polinização dentro do capão e entre os capões (média ± desvio padrão).

Fonte: Produção do próprio autor

A movimentação de pólen obtida a partir da distância entre o doador de pólen e a planta matriz oscilou de quatro a 728 m, com média geral de 90 m e desvio padrão de 167 m. Comparativamente, pela disposição espacial dos indivíduos dentro e entre os capões, as distâncias de dispersão de pólen foram maiores entre capões (média de 530 m), do que dentro dos capões (média de 35 m). Cerca de 75% do pólen foi disperso a uma distância menor que 100 m (Figuras 4a e 4b).

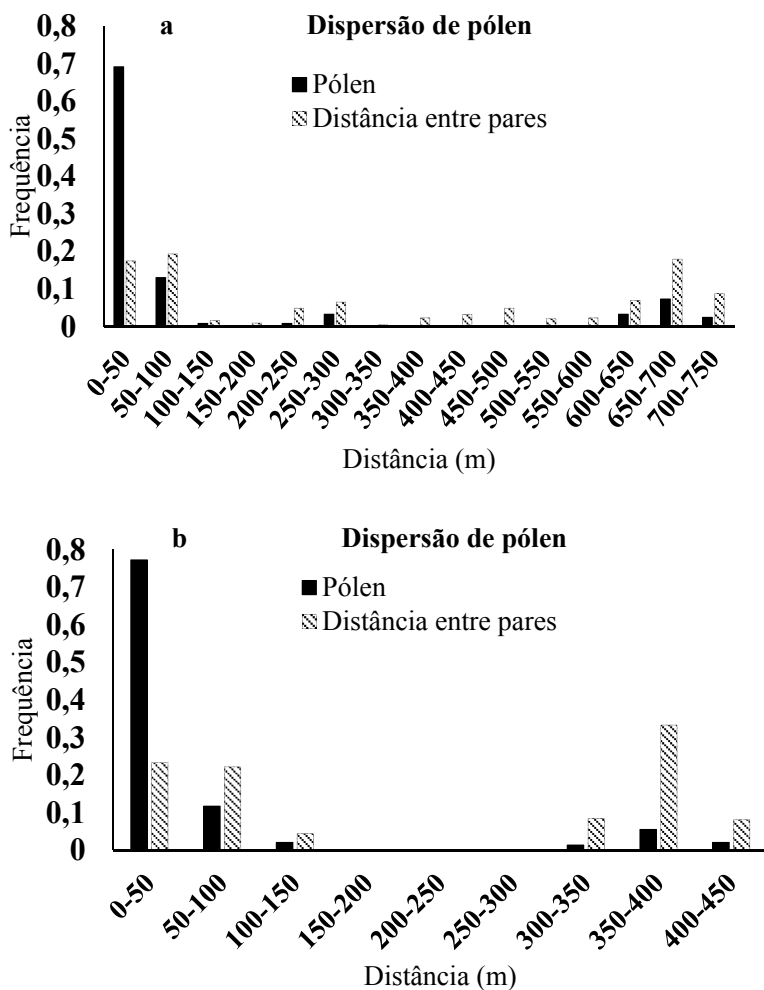


Figura 4 – Distribuição das frequências de distâncias entre pares de plantas masculinas e matrizes, e distâncias verificadas de fluxo de pólen baseada em análise de paternidade de sementes de *Araucaria angustifolia* em capões em paisagem de campo (a), e em paisagem de florestamento com *Pinus* (b).

Fonte: Produção do próprio autor

## DISCUSSÃO

### Diversidade genética e análise de paternidade

Análises de paternidade são comumente baseadas em probabilidades, obtidas com um conjunto de locos, sendo expressas por um poder de exclusão, e essa probabilidade aumenta com o número de informação polimórfica e/ou número de locos. Neste estudo, a probabilidade de ter-se atribuído um indivíduo erroneamente como pai quando o verdadeiro pai se encontra fora da amostra foi muito pequena (0,0006), ou seja a chance de um indivíduo ter sido erroneamente atribuído como pai pela análise de paternidade foi menor que 1%. No estudo, isso representa 0,12 semente (0,0006x198). Dessa forma, os níveis de fluxo gênico crítico não representaram viés na estimativa da taxa de imigração de pólen.

A coleta de sementes diretamente na planta matriz, como realizado no presente estudo, evita a necessidade de se realizar uma análise para distinguir o parental materno do paterno, onde o candidato localizado mais próximo ao suposto filho é considerado como o parental materno e o mais distante como o parental paterno. Uma vez que esse procedimento pode introduzir alguns erros na estimativa da distância direta de dispersão de pólen, isso foi evitado pela coleta das sementes diretamente na planta mãe e pela possibilidade de distinção dos genótipos maternos e paternos. Neste caso, cada pinhão representa um evento independente, e apenas dois pinhões caracterizados como irmãos completos apresentaram, para o conjunto de locos utilizados, um mesmo genótipo.

Bittencourt e Sebbenn (2007) encontraram para cada matriz um número efetivo médio de doadores de pólen de 12,6, com 124 possíveis doadores de pólen, enquanto o presente estudo encontrou uma média de quatro doadores de pólen por matriz. Isso pode ser atribuído ao menor número de doadores de pólen possíveis, que foi de 44 para a fazenda X e 27 para a fazenda Z, e ainda assim, dos possíveis doadores apenas 32 e 19 contribuíram para a fertilização das sementes para as fazendas X e Z, respectivamente. A variação de tamanho efetivo populacional médio encontrada ao analisar 20 sementes por matriz foi de 3,75, semelhante ao máximo esperado em uma população panmítica ( $N_{e(v)} = 0,5/\Theta_{\text{meios-irmãos}} = 0,5/0,125 = 4$ ). Além disso, ausência de estrutura genética verificada nas populações estudadas, sugere que os cruzamentos estejam ocorrendo ao acaso. No entanto, considerando que as matrizes produziram cerca de 100 sementes por pinha (dados não apresentados), cada pinha irá conter uma proporção de pinhões meios-irmãos e irmãos-completos.

## Estrutura genética espacial

A análise da estrutura genética espacial evidencia uma ausência de estruturação dos genótipos nas populações dentro das fazendas, semelhante a uma população panmítica. Autocorrelações não significativas encontradas para todas as classes de distância, sugere que as árvores ocorrem sem que haja uma maior semelhança genética em função da distância entre elas. Chung *et al.* (2002) também encontraram uma estrutura especial não significativa estudando populações de *Quercus robur*. Um comportamento diferente é apresentado pela *Araucaria angustifolia* quando em ambiente de contínuos florestais, onde a presença de estrutura genética interna é marcante (MANTOVANI *et al.*, 2006, SANT'ANNA *et al.*, 2013, STEFENON *et al.*, 2008) e indivíduos mais próximos tendem serem mais relacionados.

Uma explicação para este fato pode ser o baixo número de indivíduos adultos presentes nos capões, favorecendo que os genótipos estejam distribuídos aleatoriamente no espaço. A presença de fluxo gênico histórico entre as fazendas, como sugerido no capítulo anterior, pode ter contribuído para a não estruturação das populações atuais. Há ainda a possibilidade que estes indivíduos tenham sido originados a partir de eventos reprodutivos diferentes, e que indivíduos mais aparentados podem ter sido eliminados pela seleção natural. Ações antrópicas como processos de exploração madeireira da espécie na região (CARVALHO, 2010) e até mesmo o pisoteio do gado, não só eliminaram parte da geração parental dos indivíduos adultos reprodutivos, quanto possivelmente impediram que muitos regenerantes chegassem a fase adulta suavizando os efeitos de uma estruturação causada por indivíduos oriundos do cruzamento entre aparentados e dispersão a curtas distâncias. Contudo, sugere-se que os mecanismos que causam desvios nos cruzamentos aleatórios e favorecem o cruzamento de indivíduos aparentados não foram suficientes para a formação de uma estrutura genética interna nas populações estudadas.

## Sistema reprodutivo, número efetivo de doadores de pólen e coancestria

A diferença da taxa de cruzamento multiloco para a unidade (1,0) é a porcentagem dos cruzamentos que ocorrem entre indivíduos aparentados, os valores encontrados (Tabela 5), indicam que esse tipo cruzamentos não é frequente nas populações estudadas. O que de certa forma colabora para a não formação de uma estrutura genética, como verificado anteriormente.

Para cada matriz analisada, observou-se uma variação no número efetivo de doadores de pólen entre os ambientes analisados, com uma proporção de cruzamentos correlacionados de  $r_p = 0,06$  para Fazenda X e  $r_p = 0,11$  para Fazenda Z. Porém, os valores do coeficiente de coancestria dentro das famílias (Tabela 5) indicam que os cruzamentos entre aparentados não estão gerando sementes com grau de parentesco superior que se espera para indivíduos meio irmãos, ( $\Theta_{\text{meios-irmãos}} = 0,125$ ).

Resultados da correlação de paternidade, variação de tamanho efetivo e coeficiente de coancestria sugerem não expressiva taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados nas populações em área de campo, evidenciando o valor de F não significativo encontrado no capítulo I. Por outro lado, as populações em meio aos plantios de *Pinus* tendem apresentar maiores taxas de cruzamento entre parentes com a presença do índice de fixação significativo (Capítulo I).

## Fluxo gênico

Pela redução de anteparos, a remoção da floresta (ou a ausência) pode melhorar a dispersão pelo vento de espécies florestais (BACLES *et al.*, 2006). Essa constatação corrobora com os resultados encontrados pela análise de paternidade das sementes, reforçando a ideia de que as populações em área campo possuem maior fluxo de pólen do que áreas com florestamento com *Pinus*, diminuindo os efeitos da diferenciação genética e da endogamia, como verificado no capítulo I.

Os níveis de fluxo de pólen a longas distâncias encontrados neste trabalho são similares ao observado por outros autores para espécies polinizadas pelo vento (BACLES *et al.*, 2005; SATO *et al.*, 2006). Embora a disposição espacial dos indivíduos avaliados não permitiu que se constatassem distâncias de fluxo de pólen superiores a 770 m, observou-se que uma parte razoável do pólen atinge distâncias superiores a 500 m. Bittencourt e Sebbenn (2007) estudando fluxo gênico em populações de *Araucaria angustifolia* no estado do Paraná, verificaram que o fluxo de pólen entre um fragmento florestal e algumas árvores distantes 1700 m, ocorreu em uma taxa de 10%. Em uma pequena população de *Pinus sylvestris* isolada cerca de 30 km de demais povoamentos da espécie foi verificado um fluxo de pólen externo 4% (ROBLEDO-ARNUNCIO e GIL, 2005). Esses resultados sugerem que a distribuição espacial de pequenos fragmentos na paisagem é importante para manter a conectividade entre estes a longas distâncias, na forma de trampolins entre um fragmento e outro. Comparativamente com áreas de contínuos florestais, a taxa de imigração de



pólen em Araucária é maior em áreas abertas. Menores frequências de fluxo pólen foram observadas nas maiores classes de distância, reforçando a hipótese esperada de que árvores localizadas em maiores distâncias recebem menos pólen. Contudo, ao longo do tempo o fluxo gênico entre um fragmento e outro pode reduzir a diferenciação genética mesmo para populações distantes entre si, mas que estejam interligadas por outras populações. A contribuição do fluxo gênico entre capões é extremamente importante para o aumento do tamanho efetivo da população. Assim como previsto no capítulo I, entende-se que os capões analisados são subdivisões de uma população.

O fluxo de pólen detectado neste estudo dividiu-se nos componentes dentro e entre os capões. Sendo que o fluxo de pólen entre capões foi maior para aqueles localizados em área de campo (Fazenda X), do que os localizados em meio aos plantios com *Pinus* (Fazenda Z). O número efetivo de doadores de pólen também foi maior em áreas de campo natural (Tabela 7). Consequentemente, houve um maior número de cruzamento entre indivíduos aparentados nas áreas de plantios florestais, como verificado pela correlação de paternidade que foi de 0,06 e 0,11, para as fazendas X e Z, respectivamente. Sousa *et al.*, (2005) também atribuíram que cruzamentos entre indivíduos correlacionados em *A. angustifolia* estão associados com distâncias de dispersão de pólen limitadas. Isso é um indício de que a típica alta densidade dos plantios com *Pinus* pode formar uma barreira ao fluxo de pólen em *Araucaria angustifolia*. Sugere-se ainda que demais espécies que ocorrem nestes ambientes e tem polinização pelo vento possam ter seu fluxo gênico afetado pelos plantios de florestais. El-Kassaby e Jaquish (1996) estudando populações de *Larix occidentalis* em diferentes densidades encontraram uma tendência de maiores cruzamentos entre aparentados em altas densidades populacionais, sugerindo que altas densidades de árvores limitam o movimento de pólen. Dyer e Sork (2001), também observaram que as altas densidade populacionais podem afetar no fluxo de pólen, verificando uma correlação negativa entre a distância de dispersão de pólen em populações contínuas de *Pinus echinata* e densidade total de árvores. Menores distâncias de polinização são apresentadas quando a densidade de árvores é alta e o dossel é fechado (DICK *et al.*, 2008; HANSON *et al.*, 2008).

Além da densidade de árvores e a distância entre as plantas, outro fator que pode afetar o fluxo de pólen da *A. angustifolia* é quantidade de pólen produzida pelo possível doador. Mantovani *et al.* (2006), estudando a fenologia reprodutiva em populações de *A. angustifolia* por dois anos consecutivos, observaram uma variação individual no tempo e na intensidade de produção de estróbilos masculinos, indicando que algumas árvores

tendem a produzir mais estróbilos do que outras. Consequentemente maiores quantidades de pólen são liberadas, permitindo maiores chances de sucesso na polinização. Segundo Mattos (1994), as condições climáticas adversas na região principalmente pelas variações de intensidade e direções dos ventos, podem facilitar ou dificultar a movimentação do pólen, e além disso, o estágio de maturação das estruturas reprodutivas pode afetar o alcance da distância de polinização. Por exemplo, mesmo em um dia de ventos fortes em que o pólen alcance longas distâncias, se a estrutura feminina localizada nestas longas distâncias não estiver madura não haverá sucesso na polinização.

Florestas com Araucária geralmente tem altas densidades vegetais que podem agir como barreiras a dispersão de pólen (SOUSA e HATTEMER 2003). Dessa forma, os mecanismos que espécie possui para reprodução estão adaptadas a condições naturais de altas densidades vegetacionais, fazendo com que a espécie consiga realizar o fluxo de pólen até mesmo através dos povoamentos de *Pinus*, porém em uma frequência menor do que em áreas de campo. Sugerindo-se que o florestamento com espécies exóticas não representou impacto genético negativo acentuado sobre as populações estudadas de *A. angustifolia*, todavia, influenciam na taxa de imigração de pólen. Pois a alta densidade dos florestamentos é composta por apenas uma espécie, enquanto florestas naturais são compostas de uma mistura de espécies de diferentes tipos e tamanhos com distribuição variada, e dentre as quais se encontra a *A. angustifolia*. Dessa forma, as características dos florestamentos com *Pinus* convergem para uma menor permeabilidade quanto a movimentação de pólen.

Possivelmente os efeitos causados pela barreira física dos plantios de *Pinus* só sejam detectados depois de várias gerações, uma vez que o florestamento, até o momento, não impediu o fluxo de pólen, apenas o reduziu em comparação com áreas de campo, assim como ocorre para espécie quando presente em florestas contínuas (SOUSA e HATTEMER 2003, SANT'ANNA *et al.*, 2013). Em paisagem de campo, indivíduos de *A. angustifolia* apresentam naturalmente baixa densidade de indivíduos adultos, por estarem estabelecidos na forma de capões, cercados por campo, facilitando a dispersão por pólen na população (CRISTOFOLINI, 2013).

Os resultados obtidos neste estudo representam importantes considerações sobre aspectos da paisagem para elaboração de estratégias de conservação da Araucária, sendo pela coleta de material genético para programas de melhoramento, reflorestamento ou para restauração de

ambientes. Além disso, sugere-se que capões como os encontrados na área de campo natural sirvam como local de coleta de material para conservação *ex situ*, uma vez que a diversidade apresentada nas sementes oriundas destes capões é elevada devido a presença de fluxo gênico externo e ausência de estrutura genética interna, diminuindo a chance das sementes amostradas serem oriundas de indivíduos apresentados. A formação de barreiras físicas por meio do plantio de espécies florestais, ajuda a diminuir a taxa de fluxo de pólen externo, trazido pelo vento, podendo ser uma estratégia a ser utilizada no isolamento de pomares para coleta de sementes com polinização controlada. Finalmente, a elevada taxa de imigração de pólen verificada entre os capões revela que presença destes, mesmo de forma fragmentada na paisagem, é importante para manutenção da espécie pela formação de uma rede de pequenos fragmentos conectados que diminuem a diferenciação genética, a coancestria e a endogamia, aumentando o tamanho efetivo populacional. Portanto, estes fragmentos são essenciais para conservação *in situ* da espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLVAREZ-BUYLLA, E.R.; GARCÍA-BARRIOS, R.; LARA-MORENO, C.; Martínez-Ramos, M. Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest tree species. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. Palo Alto, v. 27 p. 387–421, 1996.
- ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F.; BONA, C. Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, na região de Curitiba. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 44-52, 2006.
- 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**. São Paulo, v. 25, n. 3, 2002.
- BACLES, C.F.E.; BURCZYK, J.; LOWE, A.J.; ENNOS, R.A. Historical and contemporary mating patterns in remnant populations of the forest tree *Fraxinus excelsior* L. **Evolution**, Lancaster, v. 59, p. 979–990, 2005.
- BACLES, C.F.E.; LOWE, A.J.; ENNOS, R.A. Effective seed dispersal across a fragmented landscape. **Science**, New York, v. 311, p. 628, 2006.
- BAWA, K.S. Mating systems, genetic differentiation and speciation in tropical rain forest plants. **Biotropica**, Washington, v. 24, p. 250–255, 1992.
- BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Genetic effects of forest fragmentation in high-density *Araucaria angustifolia* populations in Southern Brazil. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v.5, n.4, p.573-582, out. 2009.
- BITTENCOURT, J.M.; SEBBENN, A.M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, London, v. 99, n. 6, p.580–591, out. 2007.

BITTENCOURT, J.M.; SEBBENN, A.M. Pollen movement in a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and Two Gener analysis. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 9, p. 855–868, 2008.

BREED, M.F.; MARKLUND, M.H.K.; OTTEWELL, K.M.; GARDNER, M.G.; HARRIS, J.B.C.; LOWE, A.J. Pollen diversity matters: revealing the neglected effect of pollen diversity on fitness in fragmented landscapes. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 21, n. 24, p. 5955-5968, 2012

BURCZYK, J.; ADAMS, W.T.; SHIMIZU, J.Y. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuate* Lemmon) stand. **Heredity**, London, v. 77, p. 251–260, 1996.

BURCZYK, J.; ADAMS, W.T.; MORAN, G.F.; GRIFFIN, A.R. Complex patterns of mating revealed in a Eucalyptus regnans seed orchard using allozyme markers and the neighbourhood model. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 2379-2391, 2002.

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

CARVALHO, M.M.X. **O desmatamento das florestas de araucária e o Médio Vale do Iguaçu**: uma história de riqueza madeireira e colonizações. 2010. 313 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em História) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 640 p.

CHASE, M.R.; MOLLER, C.; KESSELI, R.; BAWA, K.S. Distant gene flow in tropical trees. **Nature**, London, v. 383, p. 398-399, 1996.

CHUNG, M.Y.; NASON, J.; CHUNG, M.G.; KIM, K.J.; PARK, C.W.; SUN, B.Y.; PAK, J.H. Landscape-level spatial genetic structure in *Quercus acutissima* (Fagaceae). *American Journal of Botany*. Columbus, v. 89, n.8, p. 1229-1236, 2002.

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, Lancaster, v. 23, p. 72-84, 1969.

CRISTOFOLINI, C. **Dinâmica da diversidade genética de Araucaria angustifolia (Bert.) Kuntze em paisagem de campo no estado de Santa Catarina** 2013. 93 f.. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

CUERTAS-HERNANDEZ, S.; FARFAN, N.; SMOUSE, P.E. Restricted pollen flow of *Dieffenbachia seguine* populations in fragmented and continuous tropical forest. **Heredity**, London, v. 105, p. 197-204, 2010.

DICK, C.W. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. **Proceedings of the Royal Society London B: Biological Sciences**. v. 268, p. 2391–2396, 2001.

DICK, C.W. New interpretations of fine-scale spatial genetic structure. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17 p. 1873–1876, 2008.

DOW, B.D.; ASHLEY, M.V. Factors influencing male mating success in bur oak, *Quercus macrocarpa*. **New Forests**, Dordrecht, v. 15, p. 161–180, 1998.

DYER, R.J.; SORK, L.J. Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 859–866, 2001.

El-Kassaby, Y.A.; Jaquish, B. Population density and mating pattern in western larch. **Journal of Heredity**, London, v.87, p. 438–443, 1996.

FORTUNA, M.A.; GARCIA, C.; GUIMARAES, P.R.; BASCOMPTE, J. Spatial mating networks in insect-pollinated plants. **Ecology Letters**, Oxford, v. 11, p. 490–498, 2008.

FUCHS, E.L.; HAMRICK, J.L. Mating system and pollen flow between remnant populations of the endangered tropical tree, *Guaiaecum sanctum* (Zygophyllaceae). **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 12, n. 1, p.175–185, 2011.

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

HANSON, T.T.; BRUNSFELD, S.J.; FINEGAN, B.; WAITS, L.P. Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, p. 2060–2073, 2008.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, p. 618–620, 2002.

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**, Oxford, v. 16, p. 1099–1106, 2007.

KLEIN, R.M. Mapa fitogeográfico de Santa Catarina. **Flora ilustrada catarinense**, Itajaí, p. 10, 1978.

KLEIN, R.M. O aspecto dinâmico do pinheiro-brasileiro. **Sellowia**, Itajaí, v. 12, n. 12, p. 17–48, 1960.

KONUMA, A.; TSUMURA, Y.; LEE, C.T.; LEE, S.L.; OKUDA, T. Estimation of gene flow in the tropical-rainforest tree *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae), inferred from paternity analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 1843–1852, 2000.

KRAMER, A.T.; ISON, J.; ASHLEY, M.V.; HOWE, H.F. The paradox of forest fragmentation genetics. **Conservation Biology**, Boston, v. 22, n.4, p. 878–885, ago. 2008.

LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, Columbus, v. 82, p. 1420–1425, 1995.

NAZARENO, A.G. **Conservação de *Butia eriospatha* (Martius ex Drude) Beccari (Arecaceae): uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção**. 2013. 141 f.. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, A.P.C. e REIS, M.S. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v. 27, p. 787-796, 2004.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, A.P.C. e REIS, M.S. Internal genetic structure and outcrossing rate in a natural population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. Journal of Heredity, London, v. 97, n. 5, p. 466-472, set. 2006.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUUK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 639-655, 1998.

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

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

MEAGHER, T.R. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of most-likely male parents. American Naturalist. Chicago, v. 128, p. 199–215, 1986.

MEAGHER, T.R.; THOMPSON, E. Analysis of parentage for naturally established seedlings of *Chamaelirium luteum* (Liliaceae). **Ecology**, Washington, v. 68, p.803-812, 1987.

MORAES, M.L.T.; SEBBENN, A.M. Pollen dispersal between isolated trees in the Brazilian Savannah: a case study of the Neotropical tree *Hymenaea stigonocarpa*. **Biotropica**, Washington, v. 43, p. 192-199, 2011.

REIS, M.S.; FANTINI, A.C.; NODARI, R.O.; REIS, A.; GUERRA, M.P.; MANTOVANI, A. Management and conservation of natural populations in Atlantic rain forest: the case study of palm heart (*Euterpe edulis* Martius). **Biotropica**. Washington, v. 32, p.894–902, 2000.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Madeiras do Brasil**: Santa Catarina. Florianópolis: Editora Lunardelli, 1979. 320 p



RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using  $n$  independent locos. **Heredity**, London, v. 88, p. 221–228, 2004.

ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J.; GIL, L. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total exclusion paternity analysis. **Heredity**, London, v. 94, n. 1, p. 13–22, jan. 2005.

SALGUEIRO, F.; CARON, H.; DE SOUSA, M.I.F.; KREMER, A.; MARGIS, R. Characterization of nuclear microsatellite loci in South American Araucariaceae species. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 256–258, fev. 2005.

SANT'ANNA, C.S.; SEBBENN, A.M.; KLABUNDE, G.H.F.; BITTENCOURT, R.; NODARI, R.O.; MANTOVANI, A.; REIS, M.S. Realized pollen and seed dispersal within a continuous population of the dioecious coniferous Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze). **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 14, n. 3, p. 601–613, jun. 2013.

SCHMIDT, A.B.; CIAMPI, A.Y.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 340–342, mar. 2007.

SCOTT, L.J.; SHEPHERD, R.; HENRY, R.J. Characterization of highly conserved microsatellite loci in *Araucaria cunninghamii* and related species. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 236, p. 115–123, fev. 2003.

SEBBENN, A.M.; CARVALHO, A.C.M.; FREITAS, M.L.M.; MORAES, S.M.B.; GAINO, A.P.S.C.; SILVA, J.M.; JOLIVET, C.; MORAES, M.L.T. Low level of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, London, v. 106, p. 134–145, 2011.

SMOUSE, P.E.; SORK, V.L. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. n.3, 197, p. 21–38, ago. 2004.

SOUSA VA, SEBBENN AM, HATTEMER H, ZIEHE M. Correlated mating in populations of a dioecious Brazilian conifer, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Forest Genetics** v. 12 p. 107–119, 2005.

SOUSA, V.A.; HATTEMER, H.H. Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**. Victoria, v. 51, n. 3, p. 309–317, jun. 2003.

SOUZA, M.I.F.; SALGUEIRO, F.; CARNAVALE-BOTTINO, M.; FÉLIX, D.B.; ALVES-FERREIRA, M.; 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**. Ribeirão Preto, v. 32, n. 3, p. 546–556, jun. 2009.

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

WHITE, G.M.; BOSHIER, D.H.; POWELL, W. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. Proceedings of the **National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 4, p. 2038–2042, 2002.

WHITE, G.M.; BOSHIER, D.H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 1899–1909, 1999.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível verificar que os plantios de *Pinus* influenciam na polinização da *Araucaria angustifolia* presente em pequenos capões. No entanto, a matriz florestal formada pelos plantios é permeável, pois foram observadas taxas expressivas de fluxo de pólen, entre capões, através da matriz florestal, embora menores que na matriz formada pelo campo.

O fluxo de pólen verificado entre os pequenos fragmentos (capões) pode ser considerado de vital importância para manter integrado os processos ecológicos e evolutivos da espécie. Isso devido ao fluxo de pólen ser um componente essencial da migração, uma força evolutiva que tem o potencial de mitigar os efeitos genéticos negativos de pequenas populações.

A partir dos resultados deste estudo sugere-se que fragmentos distantes cerca de 300 a 500 m entre si, são capazes de trocar pólen mesmo estando em meio a plantios florestais. Sugere-se ainda que é possível aliar atividades silvícolas, com a conservação *in situ* dos fragmentos desde que manejadas adequadamente respeitando princípios básicos da conservação e do manejo, como a formação de corredores ecológicos e aceiros.

Ainda, deve-se considerar o fato de que durante o ciclo de um plantio florestal a barreira física somete é formada por um determinado tempo, quando altura de copa é superior à das Araucárias, assim, vários ciclos consecutivos aliado a longevidade dos indivíduos de *A. angustifolia* poderiam garantir a manutenção do fluxo entre as populações. Contudo, é muito importante a realização de novos estudos envolvendo vários eventos reprodutivos da espécie de modo a entender a dinâmica do fluxo gênico no tempo e como isso se refletirá nas futuras gerações.