

Newton Clóvis Freitas da Costa

**DIVERSIDADE GENÉTICA E DINÂMICA DO FLUXO DE  
PÓLEN DE *Araucaria angustifolia* NO ESPAÇO E NO TEMPO**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
graduação em Recursos Genéticos  
Vegetais da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do  
Grau de Doutor em Ciências  
Orientador: Prof. Dr. Rubens Onofre  
Nodari

Florianópolis  
2019

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

Costa, Newton Clóvis Freitas da  
Diversidade genética e dinâmica do fluxo de pólen  
de Araucária angustifolia no espaço e no tempo /  
Newton Clóvis Freitas da Costa ; orientador, Rubens  
Onofre Nodari, 2019.  
187 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de  
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais,  
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. pinhão. 3.  
análises de paternidade. 4. imigração de pólen. 5.  
fluxo gênico. I. Nodari, Rubens Onofre. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III.  
Título.

Newton Clóvis Freitas da Costa

**DIVERSIDADE GENÉTICA E DINÂMICA DO FLUXO DE  
PÓLEN DE *Araucaria angustifolia* NO ESPAÇO E NO TEMPO**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Ciências” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais

Florianópolis, 21 de março de 2019.

---

Prof. Paulo Emilio Lovato, Dr.  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Rubens Onofre Nodari, Dr.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Mauricio Sedrez dos Reis, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Adelar Mantovani, Dr.  
Universidade do Estado de Santa Catarina

---

Prof. Valdir Marcos Stefenon, Dr.  
Universidade Federal do Pampa



Dedicado aos meus amigos e minha  
querida noiva Lilian.



## AGRADECIMENTOS

A tudo e a todos que me conduziram até aqui expresso sincera gratidão!

Em especial agradeço a minha noiva Lilian, pelo amor e carinho destinado a mim nestes 13 anos união, agradeço de coração a esta incansável mulher por toda dedicação e apoio.

Aos meus pais, Newton e Lilyan, meu padrasto Luis Claudio e meu irmão Geovane pelo apoio incondicional nos momentos difíceis.

Aos familiares, em especial, a minha Tia Enedina.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari pelo incentivo e motivação, pelos ensinamentos e experiências repassados, e, sobretudo amizade! Agradeço também aos churrascos dos orientados.

Aos amigos conquistados durante o percurso da minha vida e aos momentos de descontração concedidos por eles, que são fundamentais. Aos amigos de Lages e aos agora compadres Homero de Melo, Fabio de Melo, Cristiano de Farias com as respectivas comadres.

Ao amigo e co-orientador informal Prof. Dr. Adelar Mantovani principalmente pela confiança e pelos ensinamentos.

Agraço também ao amigo e segundo co-orientador informal Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis, pelo acolhimento, dedicação, exemplo e pelas experiências e ensinamentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Altamir Guidolin e ao Laboratório DNA UDESC por todo apoio logístico e operacional na condução das etapas laboratoriais.

Aos colegas do LFDGV agradeço a oportunidade de convivência e a contribuição de todos para a minha formação acadêmica e pessoal.

A UDESC e seu Ribeiro por concederem as áreas para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos da UFSC, aos professores e funcionários (em especial a Bernadete Ribas).

A todos do Núcleo de Pesquisas em Florestas Tropicais (NPFT) pela inesgotável parceria e capacidade de desempenhar com grande alegria diversas de atividades acadêmicas, de campo, laboratório e lazer. Deixo minha gratidão a Alison Bernardi, Miguel Lauterjung, Tiago Montagna, Juliano Zago, Marcia Hoeltgebaum, Andrea Mattos, Rafael Ribeiro, Juan Aguierre-Neira.

Aos relatores e membros da banca avaliadora deste trabalho de tese.



Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e à FAPESC pelos recursos financeiros do projeto.

Gentilmente expresso toda minha gratidão as pessoas importantes que direta ou indiretamente cruzaram meu caminho e aqueles que injustamente eu tenha esquecido de mencionar.



Os recursos da terra estão a ser depredados também por causa de formas imediatistas de entender a economia e a atividade comercial e produtiva. A perda de florestas e bosques implica simultaneamente a perda de espécies que poderiam constituir, no futuro, recursos extremamente importantes não só para a alimentação mas também para a cura de doenças e vários serviços. As diferentes espécies contêm genes que podem ser recursos-chave para resolver, no futuro, alguma necessidade humana ou regular algum problema ambiental.

(Papa Francisco, 2015)



## RESUMO

Este estudo objetivou caracterizar a dinâmica da diversidade e estrutura genética, do sistema reprodutivo e do fluxo de pólen de duas populações de *Araucaria angustifolia*, inseridas em paisagem de campo. Na áreas estudadas foram demarcadas foram demarcadas uma parcela circular de 34 ha e uma parcela retangular de 2 ha. Foram feitas genotipagens com 12 locos microssatélites, das 181 plantas adultas encontradas na primeira área, juntamente com 400 sementes no ano de 2015 e 450 sementes nos anos de 2016 e 2017 (coletadas de 16 a 18 plantas mãe). Para segunda área as genotipagens foram feitas para 68 adultos e 300 sementes coletadas em 2017 de 12 plantas mães. Em geral, os índices de diversidade genética foram similares para adultos e sementes, com índices de fixação significativos em todos os casos. Uma estrutura genética espacial não significativa foi detectada em ambos os locais. Diferenças interanuais nos resultados do sistema reprodutivo foram verificadas principalmente nas estimativas referentes a estrutura e parentesco, o que demonstra a existência de diferenças associadas a diferentes eventos reprodutivos. O fluxo gênico, verificado pela análise de paternidade, demonstrou a ocorrência de elevada taxa de imigração de pólen, cerca de 50%, em todos os anos e em ambos os locais. Também foram encontradas diferenças entre os anos no número e na diversidade de pais que fertilizaram as sementes. Além disso, variações anuais também foram verificadas para distância média de dispersão de pólen, e a distribuição das frequências de distâncias dos cruzamentos realizados, demonstrando uma variação substancial na movimentação de pólen ao longo dos anos. De maneira geral, os resultados encontrados indicam que pequenos fragmentos ou árvores isoladas presentes em áreas abertas, como paisagens de campos, não estão em uma situação geneticamente isolada. Isso demonstra que essas populações possuem um alto valor para conservação *in situ*, e ao mesmo tempo fontes úteis para a obtenção de sementes para programas de melhoramento, restauração e conservação *ex situ*. Contudo, os padrões de movimentação de pólen demonstram que as coletas devem envolver mais de um ano, de modo a abranger o máximo da variabilidade genética e do potencial adaptativo da população.

**Palavras-chave:** Mata Atlântica, pinhão, análises de paternidade, sistema reprodutivo, imigração de pólen, distância de polinização, dinâmica da movimentação do pólen, fluxo gênico



## ABSTRACT

This study aimed to characterize the dynamics of the diversity and genetic structure, mating system and the pollen flow of two *Araucaria angustifolia* populations inserted in grassland landscapes. In the first study area (FSR), a circular plot of 34 ha was demarcated and, in the second area (FECAV) a rectangular plot of 2 ha. From 181 adult plants found in the FSR area, genotyping with twelve microsatellite loci were performed to 400 seeds collected from 16 seed-trees in the year 2015 and 450 seeds collected from 18 seed-trees in the years 2016 and 2017. From FECAV area 68 adults and 300 seeds collected in 2017 were genotyped. In general, the diversity indexes were similar in adults and seeds, with significant fixation indexes in all cases. A non-significant spatial genetic structure was detected in the adult trees of both sites. Differences in the reproductive system were verified mainly in the structure and parentage estimates, associated with different reproductive events. Gene flow, verified by paternity analysis, demonstrated the occurrence of a high rates of pollen migration, around 50%, in all years and in both areas. Differences among years were also found in the number of fathers and consequently in the diversity of fathers that contributed to seed fertilization. In addition, annual variations were verified in average pollen dispersion distance, as well as the distribution distances of crosses performed, demonstrating a substantial variation in the pollen movement over years. Overall, the results indicate that small fragments or isolated trees located in open areas, such as grassland landscapes, are not genetically isolated. This demonstrates that these populations have a great value for *in situ* conservation and, at the same time, useful sources for obtaining seeds for breeding, restoration and *ex situ* conservation programs. However, patterns of pollen movement demonstrate that the seed collections should involve more than one year, in order to cover the maximum genetic variability and the populations fitness.

**Keywords:** Atlantic Forest, *pinhão*, paternity analysis, mating system, pollen immigration, pollination distance, dynamics of pollen movement, gene flow



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Mapa de localização das áreas FSR e FECAV, contendo as populações as populações estudadas de *Araucaria angustifolia*, presentes no município de Lages, Santa Catarina, Brasil. 49
- Figura 2 - Imagem aérea da paisagem da Fazenda Santa Rita (FSR) com destaque (círculo branco) para a parcela de estudo, contendo as plantas amostradas de *Araucaria angustifolia*, região da Coxilha Rica, Lages - SC..... 51
- Figura 3 - Imagem aérea da paisagem da Fazenda Experimental do Centro de Ciências Agroveterinárias (FECAV) com destaque (retângulo vermelho) para a parcela de estudo, , contendo as plantas amostradas de *Araucaria angustifolia*, Lages - SC..... 52
- Figura 4 - Análise do padrão de distribuição espacial das plantas de *Araucaria angustifolia*, em duas paisagens de campo, nas áreas FSR e FECAV, no município de Lages-SC. Linha em preto são valores da estatística L(d), calculada pela função K de Ripley. Linhas em vermelho representam o envelope do intervalo de confiança a 95%. Pontos representam a disposição das plantas no espaço, para cada área..... 60
- Figura 5 - Correlograma de coancestria médio ( $\theta_{xy}$ ) por classe de distância para as populações adultas de *Araucaria angustifolia* nas áreas FECAV e FSR. A linha sólida representa os valores médios de  $\theta_{xy}$  por classe de distância. Linhas tracejadas representam o intervalo de confiança para média (95%)..... 67
- Figura 6 – Frequência das distâncias potenciais de polinização (distâncias entre pares de plantas) e polinizações efetivas nos anos de 2015, 2016 e 2017 na área FSR, presente em uma população de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo. .... 107
- Figura 7 – Frequência das distâncias potenciais de polinização (distâncias entre pares de plantas) e polinizações efetivas no ano 2017 na área FECAV, presente em uma população de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo. .... 107
- Figura 8 - Escalonamento Multidimensional Não Métrico - NMDS, gerado para os grupos de pais que polinizaram sementes de 18 plantas mães de *Araucaria angustifolia*, durante os anos de 2015, 2016 e 2017, em uma paisagem de campo no município de Lages. .... 133
- Figura 9 – Gráfico *scree plot* onde a linha preta do gráfico (*Ordination*) corresponde ao número de variáveis sintetizadas pelos componentes principais e a linha vermelha corresponde ao padrão aleatório (*Broken Stike*). .... 134

Figura 10 – Distribuição das plantas mãe de *Araucaria angustifolia* e dos vetores das variáveis na análise de componentes principais - PCA. Quanto menor o ângulo formado entre vetores maior a correlação entre as variáveis. .... 136

Figura 11 – Imagem da distribuição espacial das 18 plantas mãe de *Araucaria angustifolia* utilizadas para análises das variáveis genéticas e ambientais. Círculo vermelho representa a área da parcela (43,7 ha), círculos tracejados representam os agrupamentos formados pelas plantas mãe (pontos brancos). .... 137

Figura 12 – Análise direcional da movimentação de pólen em *Araucaria angustifolia* em 18 plantas mãe localizadas em uma paisagem de campo no município de Lages, SC. Os vetores indicam o ângulo médio da direção de pólen e linhas em vermelho indicam o intervalo de confiança a 95%. .... 138

Figure 13 - Electrophoregram representing an inconsistency in the Aang14 marker, between the seed genotype (Ab13\_III\_1), which presents alleles 207 and 223 with the genotype of the mother (Aa13), which has alleles 211 and 225. .... 155

Figure 14– Frequency of minimum difference between inconsistent genotypes found in the mother-progeny comparison with 12 microsatellite markers of the *Araucaria angustifolia* (minimum mutational steps). .... 161

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das reações de amplificação de DNA para 12 marcadores microssatélites (SSR) usados na caracterização genética em <i>Araucaria angustifolia</i> .....	55
Tabela 2: Valores médios dos índices de diversidade genética para número de alelos (A), número de alelos efetivos (Ae), índice de informação de Shannon (I), riqueza alélica (baseada em 18 plantas) (R), Heterozigosidade observada (Ho), Heterozigosidade esperada (He) e índice de fixação (f) em duas populações de <i>Araucaria angustifolia</i> , em paisagem de campo, no município de Lages-SC.....	61
Tabela 3 - Estatísticas F de Wright, calculadas para diferentes classes de plantas reprodutivas de duas populações adultas de <i>Araucaria angustifolia</i> , em paisagem de campo, no município de Lages - SC.....	62
Tabela 4: Frequência de alelos exclusivos para locos microssatélites em relação as classes de plantas adultas de <i>Araucaria angustifolia</i> inseridas em paisagem de campo, no município de Lages - SC.....	62
Tabela 5: Valores médios e intervalos de confiança (entre colchetes) dos índices de diversidade genética para número de alelos (A), número de alelos efetivos (Ae), índice de informação de Shannon (I), riqueza alélica (baseada em 67 plantas) (R), Heterozigosidade observada (Ho), Heterozigosidade esperada (He) e índice de fixação (f) em duas populações adultas e quatro coortes de sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> , em paisagem de campo, no município de Lages-SC.....	63
Tabela 6: Frequência de alelos exclusivos para locos microssatélites em relação em populações de adultos e coortes de sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> inseridas em paisagem de campo, no município de Lages - SC.....	64
Tabela 7 - Estatísticas F de Wright calculadas para população de adultos e coortes de sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> , em duas áreas de campo, no município de Lages - SC.....	65
Tabela 8 – Valores de divergência genética ( $F_{ST}$ ) par a par por classe de adultos ou coorte de sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> avaliados em duas áreas em paisagem de campo (FSR e FECAV), no município de Lages - SC.....	66
Tabela 9 - Resultados das estimativas do sistema reprodutivo e de estrutura e parentesco avaliados em 2015 e 2016 em <i>Araucaria angustifolia</i> .....	69

Tabela 10 - Número de sementes com paternidade determinada (NPD), Taxa de imigração de pólen ( $m$ ), Distância média de movimentação do pólen ( $D\bar{y}$ ), Desvio padrão (DP), Distância máxima de fluxo de pólen ( $D_{m\acute{a}x}$ ), Distância mínima de fluxo de pólen ( $D_{m\acute{i}n}$ ) e Intervalos de confiança Superior e Inferior (IC.Inf/IC.Sup.), de 16 plantas de uma população de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo (FSR), avaliadas em 2015, no município de Lages-SC..... 97

Tabela 11 - Número de sementes com paternidade determinada (NPD), Taxa de imigração de pólen ( $m$ ), Distância média de movimentação do pólen ( $D\bar{Y}$ ), Desvio padrão (DP), Distância máxima de fluxo de pólen ( $D_{m\acute{a}x}$ ), Distância mínima de fluxo de pólen ( $D_{m\acute{i}n}$ ) e Intervalos de confiança Superior e Inferior (IC.Inf/IC.Sup.), de 18 plantas de uma população de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo (FSR), avaliadas em 2016, no município de Lages-SC..... 98

Tabela 12 - Número de sementes com paternidade determinada (NPD), Taxa de imigração de pólen ( $m$ ), Distância média de movimentação do pólen ( $D\bar{Y}$ ), Desvio padrão (DP), Distância máxima de fluxo de pólen ( $D_{m\acute{a}x}$ ), Distância mínima de fluxo de pólen ( $D_{m\acute{i}n}$ ) e Intervalos de confiança Superior e Inferior (IC.Inf/IC.Sup.), de 18 plantas de uma população de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo (FSR), avaliadas em 2017, no município de Lages-SC..... 99

Tabela 13 - Número de sementes com paternidade determinada (NPD), Taxa de imigração de pólen ( $m$ ), Distância média de movimentação do pólen ( $D\bar{Y}$ ), Desvio padrão (DP), Distância máxima de fluxo de pólen ( $D_{m\acute{a}x}$ ), Distância mínima de fluxo de pólen ( $D_{m\acute{i}n}$ ) e Intervalos de confiança Superior e Inferior (IC.Inf/IC.Sup.), de 12 plantas de uma população de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo (FECAV), avaliadas em 2017, no município de Lages-SC..... 100

Tabela 14 - Número de sementes com paternidade determinada (NPD), Taxa de imigração de pólen ( $m$ ), Distância média de movimentação do pólen ( $D\bar{Y}$ ), Desvio padrão (DP), Distância máxima de fluxo de pólen ( $D_{m\acute{a}x}$ ), Distância mínima de fluxo de pólen ( $D_{m\acute{i}n}$ ) e Intervalos de confiança Superior e Inferior (IC.Inf/IC.Sup.), de 18 plantas de uma população de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo (FSR), avaliada por três anos (2015, 2016 e 2017), no município de Lages-SC..... 101

Tabela 15 - Número efetivo de doadores de pólen ( $N_{ep}$ ) por planta mãe e por população determinadas por análise de paternidade de sementes em diferentes anos de avaliação em duas populações de *Araucaria angustifolia* no município de Lages - SC..... 102

Tabela 16 - Número de sementes com paternidade atribuída (NSPA), distâncias média ( $D_{\bar{y}}$ ), mínima ( $D_{\min}$ ) e máxima ( $D_{\max}$ ) e Sucesso reprodutivo ( $S_{rp}$ ) das 10 árvores com maior número de atribuições de paternidade de sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> , nos anos de 2015, 2016 e 2017 para duas áreas avaliadas.....	104
Tabela 17 - Número de sementes com paternidade atribuída (NSPA), distâncias média ( $D_{\bar{y}}$ ), mínima ( $D_{\min}$ ) e máxima ( $D_{\max}$ ) e Sucesso reprodutivo $S_{rp}$ das 10 plantas com maior número de atribuições de paternidade para o conjunto de sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> , analisadas ao longo dos anos de 2015, 2016 e 2017 na área FSR.....	105
Tabela 18 - Distribuição da diversidade de pais por local, determinados por análises de paternidade de coortes de sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> em paisagens de campo.....	106
Tabela 19 - Características da área de estudo e taxa de imigração de pólen encontrados em estudos de análise de paternidade de sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	109
Tabela 20 – Valores das variáveis genéticas e ecológicas, utilizadas na análise de Componentes Principais (PCA), avaliados em 18 plantas mãe de <i>Araucaria angustifolia</i> presentes em paisagens de campo, no município de Lages, SC.....	131
Tabela 21– Valores de <i>loading</i> (correlação de Pearson entre os scores de cada eixo e as variáveis) das variáveis utilizadas na análise de Componentes Principais (PCA).....	135
Table 22- Aspect evaluated and the strategy of analysis for determination of genotyping deviations in mother progeny comparisons in <i>Araucaria angustifolia</i> . .....	156
Table 23 – Frequency of null alleles in <i>Araucaria angustifolia</i> microsatellite loci, estimated by program ML-NULL in three adult populations (FSR, FECAV and CCM) and six seed cohorts (2014X, 2014z, 2015, 2016, 2017A and 2017B).....	158
Table 24 – Number of Mother progeny comparisons (N), number of inconsistencies (In), number of null alleles and total number of genotyping errors (Er) evaluated in 12 microsatellite loci in six seed cohorts (2014X, 2014z, 2015, 2016, 2017A and 2017B) of <i>Araucaria angustifolia</i> .....	159
Table 25- Non-Exclusion Probability (NE-P), polymorphic information content (PIC), allele number (A), and rate of errors, null alleles and inconsistencies (potential mutations) found in 1972 <i>Araucaria angustifolia</i> mothers-progenies genotypes.....	160

Table 26– Paired Spearman's rank correlation between Polymorphic Information Content (PIC), allele number (A), Combined Non-Exclusion Probability (NE-P), genotyping errors (Er), null alleles (Nu) and inconsistencies (In), in 12 *Araucaria angustifolia* microsatellite loci. Below diagonal are presented the p-values and in the upper diagonal the Spearman correlations. .... 161

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
1.1	OBJETIVOS .....	29
1.1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>29</b>
1.1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>29</b>
1.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	30
1.3	REFERÊNCIAS.....	35
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO I – ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL E VARIACÃO TEMPORAL DO SISTEMA REPRODUTIVO E DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM COORTES DE SEMENTES DE <i>Araucaria angustifolia</i> EM PAISAGENS DE CAMPO</b> .....	<b>47</b>
2.1	INTRODUÇÃO .....	47
2.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	48
2.2.1	<b>Áreas de estudo</b> .....	<b>48</b>
2.2.2	<b>Estrutura demográfica e distribuição espacial</b> .....	<b>52</b>
2.2.3	<b>Coleta e conservação do material genético</b> .....	<b>53</b>
2.2.4	<b>Extração e amplificação do DNA</b> .....	<b>54</b>
2.2.5	<b>Genotipagem</b> .....	<b>56</b>
2.2.6	<b>Estrutura genética espacial (SGS)</b> .....	<b>56</b>
2.2.7	<b>Diversidade e estrutura genética</b> .....	<b>57</b>
2.2.8	<b>Sistema reprodutivo</b> .....	<b>58</b>
2.3	RESULTADOS.....	59
2.3.1	<b>Estrutura populacional</b> .....	<b>59</b>
2.3.2	<b>Diversidade e estrutura genética</b> .....	<b>60</b>
2.3.2.1	Análises por classe das populações de adultos.....	60
2.3.2.2	Análises entre gerações, anos e locais.....	63
2.3.3	<b>Estrutura genética espacial (SGS)</b> .....	<b>66</b>
2.3.4	<b>Sistema reprodutivo</b> .....	<b>68</b>
2.4	DISCUSSÃO .....	69
2.4.1	<b>Padrão espacial e estrutura interna da população</b> .....	<b>69</b>

2.4.2	Diversidade e estrutura genética .....	70
2.4.3	Estrutura genética espacial.....	74
2.4.4	Sistema reprodutivo.....	76
2.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	79
2.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO II – PATERNIDADE DE SEMENTES E FLUXO DE PÓLEN EM <i>Araucaria angustifolia</i>: UMA COMPARAÇÃO ENTRE ANOS E ENTRE LOCAIS .....</b>	<b>91</b>
3.1	INTRODUÇÃO .....	91
3.2	MATERIAL E METODOS .....	93
3.2.1	Análises de paternidade.....	93
3.2.1.1	Análises de paternidade direta .....	93
3.2.2	Número efetivo de doadores de pólen e sucesso reprodutivo por pai.....	94
3.2.3	Fluxo de pólen e distâncias de polinização.....	95
3.2.4	Distribuição das distâncias de polinização.....	96
3.3	RESULTADOS .....	96
3.3.1	Determinação de paternidade e fluxo de pólen .....	96
3.3.2	Variação no sucesso reprodutivo.....	103
3.4	DISCUSSÃO .....	108
3.4.1	Movimentação de pólen e taxa de imigração.....	108
3.4.2	Número efetivo de doadores de pólen .....	112
3.4.3	Contribuição paterna e sucesso reprodutivo .....	113
3.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	116
3.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO III – MOVIMENTAÇÃO DE PÓLEN EM <i>Araucaria angustifolia</i> E ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS AMBIENTAIS.....</b>	<b>127</b>
4.1	INTRODUÇÃO .....	127
4.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	128
4.2.1	Obtenção dos dados .....	128

4.2.2	Análise da época de oferta e paternidade de sementes ..	129
4.2.3	Associação entre variáveis genéticas e ambientais .....	130
4.2.4	Análise direcional da movimentação do pólen.....	131
4.3	RESULTADOS.....	132
4.3.1	Época de oferta e paternidade de sementes .....	132
4.3.2	Associação entre variáveis genéticas e ecológicas.....	133
4.3.3	Análise direcional da movimentação do pólen.....	138
4.4	DISCUSSÃO .....	139
4.4.1	Época de oferta e paternidade de sementes .....	139
4.4.2	Associação da movimentação de pólen por matriz com outras variáveis.....	140
4.4.3	Análise direcional da movimentação do pólen.....	143
4.5	COSIDERAÇÕES FINAIS.....	145
4.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146
5	<b>CAPÍTULO IV - ESTIMATING GENOTYPING DEVIATIONS FROM FIRST-DEGREE RELATIVES IN ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA <i>Araucaria angustifolia</i></b> .....	151
5.1	INTRODUCTION .....	151
5.2	MATERIAL AND METHODS .....	153
5.2.1	Data Collection .....	153
5.2.2	Null alleles frequency estimates .....	154
5.2.3	Analyses of error rate, inconsistencies and null alleles..	154
5.3	RESULTS .....	157
5.3.1	Null alleles.....	157
5.3.2	Genotyping deviations .....	158
5.4	DISCUSSION .....	162
5.4.1	Genotyping deviations in parentage analyzes.....	162
5.4.2	Null alleles.....	164
5.4.3	Inconsistencies (potential mutations) .....	166

<b>5.4.4</b>	<b>Implications and recommendations on genotyping deviations .....</b>	<b>167</b>
<b>5.5</b>	<b>FINAL CONSIDERATIONS .....</b>	<b>170</b>
<b>5.6</b>	<b>REFERENCES .....</b>	<b>171</b>
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO DA <i>Araucaria angustifolia</i>.....</b>	<b>179</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>183</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A rapidez e a capacidade do homem em modificar e explorar ambientes naturais, usando somente critérios para benefício próprio, esperando um retorno a curto prazo, têm superado na maioria das vezes a habilidade desses ambientes em se recompor. Os resultados dessas sobre-explorações, podem ir desde a redução da resiliência dos ambientes até a degradação dos ecossistemas, causadas principalmente pela fragmentação de habitats e perda de biodiversidade. Essas alterações geram implicações diretas na variabilidade genética e no potencial de adaptabilidade das populações naturais. Conhecer os efeitos que essas alterações causam nos ecossistemas é de fundamental importância para conservação e uso sustentável de toda a biodiversidade do planeta. No entanto, gerar esse tipo de conhecimento para todas as espécies afetadas pela ação antrópica seria uma tarefa demasiadamente grande, porém, é essencial que essas informações sejam geradas para espécies típicas de uma paisagem ou região.

Na paisagem em que está inserida, a *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze apresenta uma enorme importância, devido às suas relevantes funções ecológicas, econômicas e sociais. É capaz de fornecer grande quantidade de recursos que contribuem para manutenção de diversas espécies, inclusive o homem. No entanto, seu alto valor, principalmente pelo potencial madeireiro, fez com que a *A. angustifolia* passasse por um intenso processo de exploração que a levaram a ser considerada uma espécie criticamente em perigo por órgãos nacionais e internacionais. Contornar este fato pode não ser uma tarefa simples, mas gerar informações e conhecimento para este processo pode subsidiar a criação e incentivo a alternativas viáveis a exploração madeireira de florestas nativas, como o uso de suas sementes.

Dada a importância e o grau de ameaça em que a *A. angustifolia* se encontra, é possível considerar que a paisagem em que está inserida oferece um modelo fundamental para tentar entender o funcionamento de ecossistemas florestais. Sendo assim, a espécie torna-se prioritária para estudos acerca dos efeitos de exploração, fragmentação e dos níveis de diversidade genética destes ambientes. Pois, é comum a ocorrência da *A. angustifolia* na forma de árvores isoladas ou pequenos fragmentos em uma paisagem não permeada por floresta contínua, e isso pode representar um importante papel na conectividade genética das populações, por meio do fluxo gênico. Portanto, o conhecimento da

dinâmica temporal do fluxo gênico e suas implicações na estrutura e diversidade genética da espécie, nesses ambientes, pode fornecer importantes informações, capazes de subsidiar programas de melhoramento e exploração sustentável, que visem aliar o uso de seus recursos com a conservação. Pois, a dispersão de pólen, em espécies dioicas, é um dos fatores primordiais para que ocorra a produção de sementes. A partir das sementes é possível gerar alimento e renda para os produtores, e ainda aliar este uso a conservação da espécie.

Estudos que contemplam a variação anual e a dinâmica do comportamento do fluxo de pólen no ambiente envolvendo a *A. angustifolia* são escassos na literatura. Sendo assim, o presente estudo investiga a dinâmica do fluxo de pólen de *A. angustifolia* em paisagens fragmentadas, quantificando as trocas genéticas entre árvores da espécie em diferentes eventos reprodutivos.

Dessa forma, primeiro capítulo investiga se os mecanismos reprodutivos da espécie mantêm índices de diversidade e estrutura genética semelhantes entre populações de adultos e coortes de sementes de diferentes anos. Além disso, o capítulo aborda análises do sistema reprodutivo e da estrutura genética interna de adultos. Com isso são trazidas discussões sobre o status de conservação e possíveis implicações para manutenção das populações visando a conservação e uso.

O Capítulo 2 utiliza análises de paternidade de sementes, para caracterizar a variação na movimentação de pólen entre diferentes anos, bem como, entre diferentes locais num mesmo ano. As informações geradas acerca da dinâmica da movimentação de pólen são então discutidas abordando questões como distância entre plantas, distribuição de frequência da movimentação de pólen, variação anual, sucesso reprodutivo, bem como recomendações para conservação.

No capítulo 3 são exploradas possíveis associações entre a movimentação de pólen (variáveis genéticas) com variáveis ecológicas, de modo a tentar explorar como estas variáveis podem influenciar o fluxo de pólen. Neste capítulo, também é investigado a associação entre o período de oferta de sementes por plantas mãe e a presença de grupos de doadores de pólen, bem como a influência dos ventos no fluxo de pólen.

O Capítulo 4, analisa desvios de genotipagem presentes na genotipagem com marcadores microssatélites desenvolvidos para *Araucaria angustifolia*. O capítulo visa destacar a importância de não negligenciar a ocorrência destas alterações, como tentar evita-las ou

como acomodá-las, principalmente em estudos de migração que trazem implicações para conservação de diversas espécies, inclusive ameaçadas.

Finalmente o quinto capítulo trata das considerações gerais como um capítulo de fechamento das informações obtidas nos capítulos anteriores, discutindo algumas das implicações e como as descobertas do estudo de maneira integrada podem auxiliar e contribuir para o conhecimento a respeito da conservação e do uso sustentável da *Araucaria angustifolia*.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a dinâmica espaço-temporal do fluxo de pólen de populações de *Araucaria angustifolia*, com base na quantificação das variações da troca genética mediada pelo pólen entre fragmentos e árvores isoladas na paisagem.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a diversidade e estrutura genética de sementes de *Araucaria angustifolia* durante anos de 2015, 2016 e 2017 e verificar se o fluxo de pólen realizado mantém os mesmos índices de diversidade e estrutura genética observados em populações adultas nas coortes de sementes, que irão compor as próximas gerações da espécie.

- Descrever a variação nos níveis movimentação de pólen em populações de *Araucaria angustifolia*, com ocorrência natural em ambientes de campo, entre os anos de 2015, 2016 e 2017 e entre diferentes locais no ano de 2017.

- Verificar a variação causada pela diferença da distância entre árvores de *Araucaria angustifolia* na distribuição de frequência da movimentação de pólen.

- Estimar a taxa de mutação, erros de genotipagem e alelos nulos em locos microssatélites existentes para *Araucaria angustifolia* a partir da análise dos genótipos de plantas-mães e progênes.

- Analisar se existem diferenças entre a paternidade das sementes e o período de maturação das sementes de diferentes plantas mãe.

- Verificar se existe uma direção predominante no fluxo de pólen de *Araucaria angustifolia* e, se esta é dependente da direção predominante do vento na região durante o período de polinização.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A atual distribuição global dos recursos genéticos florestais é o resultado da combinação de processos naturais geológicos, ecológicos e genéticos, ao longo de milhares de anos, juntamente com a ação humana, que resultam em adaptações à ambientes locais (ALBERTO et al., 2013; ALFARO et al., 2014).

O bioma Mata Atlântica historicamente tem sofrido os efeitos das alterações humanas, e a fragmentação de habitats tem deixado um reflexo direto em sua área de cobertura, que atualmente limita-se a 12% da extensão territorial original (RIBEIRO et al., 2009). Efeitos potenciais da fragmentação podem ser a redução das populações, redução da sobrevivência individual, estresse relacionado ao ambiente e perda de micro sítios para germinação e estabelecimento de plantas (LANDER; BOSHIER; HARRIS, 2010). Aliado a isso, essas alterações antrópicas na biodiversidade têm causado impactos genéticos negativos em populações de plantas (AULER et al., 2002; AGUILAR et al., 2008; ECKERT et al., 2010; MORAES; SEBBENN, 2011; QUESADA et al., 2013), uma vez que a fragmentação pode interferir no sistema de cruzamento e no fluxo gênico de populações pequenas e árvores isoladas, alterando processos ecológicos e evolutivos (LIENERT, 2004; CUARTAS-HERNÁNDEZ; NÚÑEZ-FARFÁN; SMOUSE, 2010; QUESADA et al., 2013).

Entretanto, os efeitos negativos previstos na teoria da genética de populações pequenas podem ser mínimos ou ausentes em fragmentos florestais, se estes apresentarem efetivo fluxo gênico de pólen e sementes a longas distâncias (i.e. longas distâncias de dispersão de pólen e sementes) (HAMRICK, 2004; KRAMER et al., 2008). Portanto, o elemento chave para prever os efeitos da fragmentação é o nível de fluxo gênico entre as populações (HAMRICK, 2004), uma vez que este é o principal mecanismo que mantém a coesão genética entre populações (FUCHS; HAMRICK, 2011).

O fluxo gênico é um dos componentes determinantes da persistência e adaptação das populações às mudanças ambientais (WHITLOCK; MCCAULEY, 1999), capaz de fornecer variação genética para população e suprimir a diferenciação genética entre

populações (SLATKIN, 1985; ENNOS, 1994). Assim, um elevado fluxo gênico entre populações contribui para que todas elas evoluam de maneira conjunta, porém, se o fluxo gênico é baixo estas podem divergir, o que contribui para o isolamento reprodutivo e o estabelecimento de linhagens evolutivamente diferentes (SLATKIN, 1985). Além disso, o fluxo gênico é um dos fatores mais importantes na formação da estrutura genética das populações (BURCZYK; DIFAZIO; ADAMS, 2004). Longas distâncias de fluxo gênico tem o potencial de homogeneizar as populações e reduzir a estrutura genética espacial local (DICK et al., 2008). Contudo, o fluxo gênico via pólen ou sementes é um fenômeno altamente complexo e influenciado por muitos processos ecológicos (ASHLEY, 2010).

Em populações de espécies florestais, a dispersão limitada de pólen e sementes tende a criar uma estrutura genética espacial (SGS), que é uma distribuição não aleatória dos genótipos dentro das populações, onde o parentesco genético será maior entre vizinhos mais próximos do que mais distantes (VEKEMANS; HARDY, 2004). Embora a SGS seja principalmente uma consequência dos padrões de dispersão de pólen e sementes (LOISELLE et al., 1995), há muitos outros fatores que podem interagir e influenciar a SGS em fragmentos florestais, como a densidade de adultos, sistema reprodutivo, histórico de colonização e seleção natural (VEKEMANS; HARDY, 2004; JONES et al., 2006).

Estudos acerca do fluxo gênico em plantas demonstram que o fluxo de pólen é o principal contribuinte do fluxo gênico comparativamente ao fluxo de sementes (LOVELESS; HAMRICK, 1984; NASON; HAMRICK, 1997; ELLSTRAND, 2014), principalmente quando se trata de espécies florestais polinizadas pelo vento (DYER; SORK, 2001; GRIVET; SMOUSE; SORK, 2005; ROBLEDO-ARNUNCIO; GIL, 2005). Nesse contexto, fragmentos florestais e árvores isoladas podem servir como importantes trampolins para movimentação de alelos, favorecendo a conectividade e aumentando a variabilidade da população (CHASE et al., 1996; DICK, 2001; WHITE; BOSHIER; POWELL, 2002; LANDER; BOSHIER; HARRIS, 2010; MEDINA-MACEDO et al., 2016). Deste modo, em espécies dioicas polinizadas pelo vento, longas distâncias de fluxo de pólen podem impedir os impactos da fragmentação e isolamento genético (KRAMER et al., 2008; LOWE et al., 2015). No entanto, o fluxo gênico pode ocorrer ao longo de largas escalas espaciais e as

vizinhanças reprodutivas se estenderem além dos limites dos fragmentos (ASHLEY, 2010).

A dispersão por pólen possui o potencial de transportar gametas masculinos a longas distâncias, contrapondo efeitos do “isolamento” de genes em populações espacialmente isoladas (ENNOS, 1994). Assim, a fragmentação pode até fazer com que o fluxo de pólen atinja maiores distâncias, principalmente em espécies cujo vetor de polinização é o vento (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996a). Em alguns casos o fluxo de pólen é melhorado pela fragmentação, ao invés de ser inibido (ASHLEY, 2010), pois, quando há menos árvores próximas disponíveis, como fontes de pólen, a proporção de pólen vindo de árvores distantes (não relacionadas) aumenta e, conseqüentemente, a distância média da polinização realizada será maior (ROBLEDO-ARNUNCIO et al., 2004; BACLES; ENNOS, 2008; WANG et al., 2010; VRANCKX et al., 2014). Entretanto, esse aumento no fluxo gênico não necessariamente causa um aumento na diversidade genética ou redução da endogamia se somente um número limitado de fontes de pólen estiverem efetivamente contribuindo para o pool gênico (SORK et al., 2002).

Importantes avanços científicos acerca do fluxo gênico via pólen tem sido obtido (BURCZYK; DIFAZIO; ADAMS, 2004; SMOUSE; SORK, 2004; ROBLEDO-ARNUNCIO; GIL, 2005; BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; BACLES; ENNOS, 2008; MEDINA-MACEDO et al., 2015; BEZEMER et al., 2016; RAMOS et al., 2018), demonstrando que fragmentos espacialmente “isolados” podem estar geneticamente conectados. Além disso, pequenos fragmentos tendem a receber proporcionalmente mais imigração de pólen do que fragmentos maiores, por causa de uma escassez local de doadores de pólen (SMOUSE; SORK, 2004). Dessa forma, os padrões de fluxo de pólen entre fragmentos não são simétricos, pois o pólen é preferencialmente transferido de grandes para pequenos fragmentos do que vice-versa (ELLSTRAND; ELAM, 1993; BACLES; ENNOS, 2008). Assim, o tamanho da população de origem pode ter um efeito igualmente importante sobre o fluxo de pólen (BACLES; ENNOS, 2008), bem como a distância entre populações (ELLSTRAND; ELAM, 1993).

Adicionalmente, se uma proporção substancial de pólen é dispersa a curtas distâncias, cruzamentos entre aparentados irão ocorrer inevitavelmente (BITTENCOURT; SEBBENN, 2009), podendo reduzir a adaptabilidade da progênie devido a ocorrência de depressão por endogamia (JONES et al., 2006). Desta forma, mesmo que pólen em quantidade suficiente chegue a uma árvore isolada para fecundar todos

os óvulos potenciais, uma redução na diversidade da nuvem de pólen, devido a um menor número de doadores de pólen, pode reduzir a adaptabilidade familiar ao permitir a fertilização por autofecundação, por aparentados ou por pais mal adaptados (ROCHA; AGUILAR, 2001).

Portanto, informações sobre distância de dispersão de pólen e SGS são cruciais no desenvolvimento de estratégias de conservação e restauração de florestas (MEDINA-MACEDO et al., 2015). Assim como, a informação do sistema reprodutivo é essencial para contribuir com este esforço de conservação (PICANÇO-RODRIGUES et al., 2015). Além do mais, estratégias de conservação tendem a se tornar mais complexas e difíceis de gerenciar a medida que os efeitos das mudanças climáticas aceleram (JARVIS; LANE; HIJMANS, 2008; ALFARO et al., 2014).

Pequenas populações isoladas favorecem a realização de estudos sobre o sistema de cruzamento e dispersão de pólen, pois o reduzido número de indivíduos presentes nos pequenos fragmentos, potencialmente, permite discriminar as contribuições dos doadores de pólen e as taxas de imigração para a população (ROBLEDO-ARNUNCIO; GIL, 2005). Dentro das populações, as análises de paternidade podem revelar a variabilidade da contribuição paterna para a próxima geração, bem como, o padrão dos eventos reprodutivos (SORK et al., 1999; JONES et al., 2010).

Métodos baseados em análise de paternidade têm sido largamente usados para caracterizar os padrões de dispersão de pólen em espécies florestais (DOW; ASHLEY, 1996; ROBLEDO-ARNUNCIO; GIL, 2005; BURCZYK et al., 2006; BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; MORAES; SEBBENN, 2011; SANT'ANNA et al., 2013b; MEDINA-MACEDO et al., 2015; BEZEMER et al., 2016), pois fornecem estimativas precisas do efetivo fluxo de pólen e da distância de polinização a partir da localização dos pais potenciais dentro da população local (BURCZYK; DIFAZIO; ADAMS, 2004). Esse fluxo pode ser observado nas sementes e nas plantas regenerantes, se a localização destes e todos os pais potenciais masculinos e femininos dentro da população local são conhecidos e analisados por marcadores genéticos (BURCZYK; DIFAZIO; ADAMS, 2004). Os pais são determinados por atribuição de máxima probabilidade de paternidade (MEAGHER, 1986), devido a herança codominante e o nível elevado de polimorfismo dos marcadores microssatélites (DOW; ASHLEY, 1996, 1998). Complementarmente, pela genotipagem de algumas centenas de

sementes uma visão detalhada da distribuição das distâncias de polinização, direções e sucesso reprodutivo paterno emergem (ASHLEY, 2010).

Estudos genéticos iniciais revelaram a existência de importante variação genética entre distintas procedências de *Araucaria angustifolia* (GURGEL; GURGEL FILHO, 1965; REITZ; KLEIN, 1966; BALDANZI; ARAUJO, 1971; FAHLER; LUCCA, 1979; GURGEL FILHO, 1979; MONTEIRO; SPELTZ, 1979; SHIMIZU; HIGA, 1979). Mais tarde, a variação genética entre e dentro de populações foi também verificada por marcadores alozímicos (SHIMIZU; JAEGER; SOPCHAKI, 2000; SOUZA, 2000; AULER et al., 2002; MONTAGNA et al., 2012; REIS et al., 2012). Posteriormente, também foram conduzidos para a espécie, estudos acerca de características da dispersão do pólen (SOUSA; HATTEMER, 2003), taxa de cruzamento (SOUSA et al., 2005; MANTOVANI; MORELLATO; REIS, 2006), e estrutura genética interna das populações (MANTOVANI; MORELLATO; REIS, 2006).

Análises da diversidade genética, considerando várias populações, incluindo plantas adultas e regenerantes demonstram de maneira geral uma diversidade genética moderada para espécie, mas com uma tendência para a ocorrência de índices de fixação significativos (MONTAGNA et al., 2017; LAUTERJUNG et al., 2019). Estudos envolvendo a genética da espécie têm sido utilizados para demonstrar efeitos da domesticação de paisagens com *A. angustifolia* (REIS; LADIO; PERONI, 2014; LAUTERJUNG et al., 2018; REIS et al., 2018; ZECHINI et al., 2018), bem como, análises do sistema reprodutivo (FERREIRA et al., 2012; MEDINA-MACEDO et al., 2016), fluxo gênico histórico (STEFENON; GAILING; FINKELDEY, 2008; KLABUNDE, 2012; LAUTERJUNG et al., 2018) e contemporâneo (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; SANT'ANNA et al., 2013b; COSTA et al., 2015; MEDINA-MACEDO et al., 2015). No entanto, nenhum desses estudos demonstram variações anuais em suas avaliações, as quais deveriam ser consideradas prioritárias nestes tipos de estudos (LOWE et al., 2005), principalmente em espécies longevas como *A. angustifolia*. Estudos do sistema reprodutivo em múltiplos anos são necessários para desenvolver uma compreensão aprofundada de seu impacto a longo prazo sobre a diversidade genética e a adaptabilidade das populações (GERBER et al., 2014).

Em algumas espécies pode haver uma assimetria no sucesso reprodutivo masculino, onde árvores que florescem mais cedo possuem

uma maior participação como doadores de pólen do que árvores com florescimento mais tardio (GÉRARD et al., 2006). Em plantas de *A. angustifolia* já foi verificada uma variação individual no tempo e na intensidade de produção de estruturas reprodutivas, indicando que, em estações reprodutivas diferentes, algumas árvores tendem a produzir mais estruturas reprodutivas do que outras (MANTOVANI; MORELLATO; REIS, 2006).

Contudo, o estudo em apenas uma estação pode não capturar a variabilidade temporal na troca de pólen, especialmente em plantas perenes onde o florescimento é desigual entre os anos (IRWIN et al., 2003). Além deste tipo de variação, erros na análise dos genótipos devem ser levados em conta no cálculo das estimativas de fluxo de pólen (POMPANON et al., 2005). Assim, inconsistências na análise de genótipos até mesmo entre plantas mãe e progênies podem ocorrer (BACLES; ENNOS, 2008), gerando, assim, estimativas imprecisas.

### 1.3 REFERÊNCIAS

ALBERTO, F. J.; AITKEN, S. N.; ALÍA, R.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C.; HÄNNINEN, H.; KREMER, A.; LEFÈVRE, F.; LENORMAND, T.; YEAMAN, S.; WHETTEN, R.; SAVOLAINEN, O. Potential for evolutionary responses to climate change - evidence from tree populations. **Global Change Biology**, v. 19, n. 6, p. 1645–1661, jun. 2013.

ALFARO, R. I.; FADY, B.; VENDRAMIN, G. G.; DAWSON, I. K.; FLEMING, R. A.; SÁENZ-ROMERO, C.; LINDIG-CISNEROS, R. A.; MURDOCK, T.; VINCETI, B.; NAVARRO, C. M.; SKRØPPA, T.; BALDINELLI, G.; EL-KASSABY, Y. A.; LOO, J. The role of forest genetic resources in responding to biotic and abiotic factors in the context of anthropogenic climate change. **Forest Ecology and Management**, v. 333, p. 76–87, 2014.

ASHLEY, M. V. Plant Parentage, Pollination, and Dispersal: How DNA Microsatellites Have Altered the Landscape. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 3, p. 148–161, 2010.

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**, v. 25, n. 3, p. 329–338, 2002.

BACLES, C. F. E.; ENNOS, R. a. Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior* L. in a chronically fragmented landscape. **Heredity**, v. 101, n. 4, p. 368–380, 2008.

BALDANZI, G.; ARAUJO, A. J. Investigação sobre a variação geográfica na *Araucaria angustifolia* na Estação de Pesquisas Florestais de Rio Negro, Paraná. **Floresta**, v. 3, n. 2, p. 37–42, 1971.

BEZEMER, N.; KRAUSS, S. L.; PHILLIPS, R. D.; ROBERTS, D. G.; HOPPER, S. D. Paternity analysis reveals wide pollen dispersal and high multiple paternity in a small isolated population of the bird-pollinated *Eucalyptus caesia* (Myrtaceae). **Heredity**, v. 117, n. 6, p. 460–471, 2016.

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, v. 99, n. 6, p. 580–591, 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**, v. 5, n. 4, p. 573–582, 8 out. 2009.

BURCZYK, J.; ADAMS, W. T.; BIRKES, D. S.; CHYBICKI, I. J. Using genetic markers to directly estimate gene flow and reproductive success parameters in plants on the basis of naturally regenerated seedlings. **Genetics**, v. 173, n. 1, p. 363–372, 2006.

BURCZYK, J.; DIFAZIO, S. P.; ADAMS, W. T. Gene flow in forest trees: How far do genes really travel? **Forest Genetics**, v. 11, n. 3–4, p. 179–192, 2004.

CHASE, M. R.; MOLLER, C.; KESSELI, R.; BAWA, K. S. Distant gene flow in tropical trees. **Nature**, v. 383, n. 6599, p. 398–399, 3 out. 1996.

COSTA, N. C. F.; GUIDOLIN, A. F.; VARGAS, O. F.; MANTOVANI, A. Efeitos da paisagem de campo e florestamento com *Pinus* na diversidade e estrutura genética de pequenas populações remanescentes de *Araucaria angustifolia*. **Scientia Forestalis**, v. 43, n. 107, p. 551–560, 2015.

CUARTAS-HERNÁNDEZ, S.; NÚÑEZ-FARFÁN, J.; SMOUSE, P. E. Restricted pollen flow of *Dieffenbachia seguine* populations in fragmented and continuous tropical forest. **Heredity**, v. 105, n. 2, p. 197–204, 2010.

DICK, C. W. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. Proceedings of the Royal Society B: **Biological Sciences**, v. 268, n. 1483, p. 2391–2396, 22 nov. 2001.

DICK, C. W.; HARDY, O. J.; JONES, F. A.; PETIT, R. J. Spatial Scales of Pollen and Seed-Mediated Gene Flow in Tropical Rain Forest Trees. **Tropical Plant Biology**, v. 1, n. 1, p. 20–33, 2008.

DOW, B. D.; ASHLEY, M. V. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. **Molecular Ecology**, v. 5, n. 5, p. 615–627, 1996.

DOW, B. D.; ASHLEY, M. V. Factors influencing male mating success in bur oak, *Quercus macrocarpa*. **New Forests**, v. 15, n. 2, p. 161–180, 1998.

DYER, R. J.; SORK, V. L. Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 4, p. 859–866, abr. 2001.

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 systems in a changing world. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 1, p. 35–43, jan. 2010.

ELLSTRAND, N. C. Is gene flow the most important evolutionary force in plants? **American Journal of Botany**, v. 101, n. 5, p. 737–753, 2014.

ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant Conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 217–242, 1993.

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

FAHLER, J. C.; LUCCA, C. M. DI. Variación geográfica de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.: informe preliminar a los 5 años. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, Curitiba, **FUPEF**, 1979.

FERREIRA, D. K.; NAZARENO, A. G.; MANTOVANI, A.; BITTENCOURT, R.; SEBENN, A. M.; DOS REIS, M. S. Genetic analysis of 50-year old Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) plantations: Implications for conservation planning. **Conservation Genetics**, v. 13, n. 2, p. 435–442, nov. 2012.

FUCHS, E. J.; HAMRICK, J. L. Mating system and pollen flow between remnant populations of the endangered tropical tree, *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae). **Conservation Genetics**, v. 12, n. 1, p. 175–185, 21 fev. 2011.

GÉRARD, P. R.; KLEIN, E. K.; AUSTERLITZ, F.; FERNÁNDEZ-MANJARRÉS, J. F.; FRASCARIA-LACOSTE, N. Assortative mating and differential male mating success in an ash hybrid zone population. **BMC evolutionary biology**, v. 6, p. 96, 2006.

GERBER, S.; CHADOEUF, J.; GUGERLI, F.; LASCoux, M.; BUIITEVELD, J.; COTTRELL, J.; DOUNAVI, A.; FINESCHI, S.; FORREST, L. L.; FOGELQVIST, J.; GOICOECHEA, P. G.; JENSEN, J. S.; SALVINI, D.; VENDRAMIN, G. G.; KREMER, A. High rates of gene flow by pollen and seed in oak populations across Europe. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

GRIVET, D.; SMOUSE, P. E.; SORK, V. L. A novel approach to an old problem: Tracking dispersed seeds. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 11, p. 3585–3595, 2005.

GURGEL FILHO, O. A. *Silvica da Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: IUFRO MEETINGS ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA. Curitiba: **FUPEF**, 1979.

GURGEL, J. T. A.; GURGEL FILHO, O. A. Evidências de raças geográficas no pinheiro brasileiro *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Ciência e Cultura**, v. 17, n. 1, p. 33–39, 1965.

HAMRICK, J. . Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management**, v. 197, n. 1–3, p. 323–335, ago. 2004.

IRWIN, A. J.; HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; SMOUSE, P. E. A multiyear estimate of the effective pollen donor pool for *Albizia julibrissin*. **Heredity**, v. 90, n. 2, p. 187–194, 2003.

JARVIS, A.; LANE, A.; HIJMANS, R. J. The effect of climate change on crop wild relatives. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 126, n. 1–2, p. 13–23, jun. 2008.

JONES, A. G.; SMALL, C. M.; PACZOLT, K. A.; RATTERMAN, N. L. A practical guide to methods of parentage analysis. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 1, p. 6–30, 2010.

JONES, F. A.; HAMRICK, J. L.; PETERSON, C. J.; SQUIERS, E. R. Inferring colonization history from analyses of spatial genetic structure within populations of *Pinus strobus* and *Quercus rubra*. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 3, p. 851–861, 9 jan. 2006.

KLABUNDE, G. **Análise filogeográfica entre populações de Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze em sua área de distribuição natural**. Universidade Federal de Santa Catarina, p. 85, 2012.

KRAMER, A. T.; ISON, J. L.; ASHLEY, M. V.; HOWE, H. F. The Paradox of Forest Fragmentation Genetics. **Conservation Biology**, v. 22, n. 4, p. 878–885, ago. 2008.

LANDER, T. A.; BOSHIER, D. H.; HARRIS, S. A. Fragmented but not isolated: Contribution of single trees, small patches and long-distance pollen flow to genetic connectivity for *Gomortega keule*, an endangered Chilean tree. **Biological Conservation**, v. 143, n. 11, p. 2583–2590, 2010.

LAUTERJUNG, M. B.; BERNARDI, A. P.; MONTAGNA, T.; CANDIDO-RIBEIRO, R.; DA COSTA, N. C. F.; MANTOVANI, A.; DOS REIS, M. S.; CLÓVIS, N.; MANTOVANI, A.; SEDREZ, M. Phylogeography of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*): integrative evidence for pre-Columbian anthropogenic dispersal. **Tree Genetics & Genomes**, v. 14, n. 3, p. 36, 2018.

LAUTERJUNG, M. B.; MONTAGNA, T.; BERNARDI, A. P.; DA SILVA, J. Z.; DA COSTA, N. C. F.; STEINER, F.; MANTOVANI, A.; DOS REIS, M. S. Temporal changes in population genetics of six threatened Brazilian plant species in a fragmented landscape. **Forest Ecology and Management**, v. 435, p. 144–150, mar. 2019.

LIENERT, J. Habitat fragmentation effects on fitness of plant populations? a review. **Journal for Nature Conservation**, v. 12, n. 1, p. 53–72, jul. 2004.

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**, v. 82, n. 11, p. 1420–1425, 1995.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 65–95, 1984.

LOWE, A. J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C. F. E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, v. 95, n. 4, p. 255–273, 2005.

LOWE, A. J.; CAVERS, S.; BOSHER, D.; BREED, M. F.; HOLLINGSWORTH, P. M. The resilience of forest fragmentation genetics—no longer a paradox—we were just looking in the wrong place. **Heredity**, v. 115, n. 2, p. 97–99, 2015.

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

MEAGHER, T. R. Analysis of Paternity within a Natural Population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of Most-Likely Male Parents. **The American Naturalist**, v. 128, n. 2, p. 199–215, 1986.

MEDINA-MACEDO, L.; DE LACERDA, A. E. B.; SEBBENN, A. M.; RIBEIRO, J. Z.; SOCCOL, C. R.; BITTENCOURT, J. V. M. Using genetic diversity and mating system parameters estimated from genetic markers to determine strategies for the conservation of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae). **Conservation Genetics**, v. 17, n. 2, p. 413–423, 2016.

MEDINA-MACEDO, L.; SEBBENN, A. M.; LACERDA, A. E. B.; RIBEIRO, J. Z.; SOCCOL, C. R.; BITTENCOURT, J. V. M. High levels of genetic diversity through pollen flow of the coniferous *Araucaria angustifolia*: a landscape level study in Southern Brazil. **Tree Genetics & Genomes**, v. 11, n. 1, p. 814, 2015.

MONTAGNA, T.; FERREIRA, D. K.; STEINER, F.; SILVA, F. A. L. S. da; BITTENCOURT, R.; SILVA, J. Z. da; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. A importância das Unidades de Conservação na manutenção da diversidade genética de araucária (*Araucaria angustifolia*) no Estado de Santa Catarina. **Biodiversidade Brasileira**, v. 2, p. 17–24, 2012.

MONTAGNA, T.; GASPER, A. L. de; OLIVEIRA, L. Z.; LINGNER, D. V.; AGUIAR, M. D. de; SCHORN, L. A.; BERNARDI, A. P.; MATTOS, A. G.; STEINER, F.; SILVA, J. Z. da; HOELTGEBAUM, M. P.; LAUTERJUNG, M. B.; COSTA, N. C. F. da;

CANDIDO-RIBEIRO, R.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. dos; VIBRANS, A. C. Situação atual e recomendações para conservação de 13 espécies de alto valor para uso e conservação no estado de Santa Catarina. In: GASPER, A. L. DE; OLIVEIRA, L. Z.; LINGNER, D. V.; VIBRANS, A. C. (Ed.). **Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina**, Vol. VII, Espécies arbóreas raras de Santa Catarina. Blumenau: Edifurb, 2017. p. 159–241.

MONTEIRO, R. F. R.; SPELTZ, R. M. Ensaio de 24 procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, Curitiba: **FUPEF**, 1979.

MORAES, M. L. T. de; SEBBENN, A. M. Pollen Dispersal Between Isolated Trees in the Brazilian Savannah: A Case Study of the Neotropical Tree *Hymenaea stigonocarpa*. **Biotropica**, v. 43, n. 2, p. 192–199, 2011.

NASON, J. D.; HAMRICK, J. L. Reproductive and Genetic Consequences of Forest Fragmentation: Two Case Studies of Neotropical Canopy Trees. **Journal of Heredity**, v. 88, n. 4, p. 264–276, 1 jul. 1997.

PICANÇO-RODRIGUES, D.; ASTOLFI-FILHO, S.; LEMES, M. R.; GRIBEL, R.; SEBBENN, A. M.; CLEMENT, C. R. Conservation implications of the mating system of the *Pampa Hermosa* landrace of peach palm analyzed with microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 1, p. 59–66, 2015.

POMPANON, F.; BONIN, A.; BELLEMAIN, E.; TABERLET, P. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 11, p. 847–846, 2005.

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**, v. 100, n. 6, p. 1095–1101, 2013.

RAMOS, S. L. F.; DEQUIGIOVANNI, G.; SEBBENN, A. M.; LOPES, M. T. G.; MACÊDO, J. L. V. de; VEASEY, E. A.; ALVES-PEREIRA, A.; SILVA, P. P. da; GARCIA, J. N.; KAGEYAMA, P. Y. Paternity analysis, pollen flow, and spatial genetic structure of a natural population of *Euterpe precatoria* in the Brazilian Amazon. **Ecology and Evolution**, v. 8, n. 22, p. 11143–11157, 2018.

REIS, M. S. dos; LADIO, A.; PERONI, N. Landscapes with Araucaria in South America: evidence for a cultural dimension. **Ecology and Society**, v. 19, n. 2, p. art43, 2014.

REIS, M. S.; MANTOVANI, A.; SILVA, J. Z.; MARIOT, A.; BITTENCOURT, R.; NAZARENO, A. G.; FERREIRA, D. K.; STEINER, F.; MONTAGNA, T.; SILVA, F. A. L. S.; FERNANDES, C. D.; ALTRAK, G.; FIGUEREDO, L. G. U. Distribuição da diversidade genética e conservação de espécies arbóreas em remanescentes florestais de Santa Catarina. In: VIBRANS, A. C.; SEVEGNANI, L.; GASPER, A. L. DE; LINGNER, D. V. (Ed.). **Inventário florístico florestal de Santa Catarina**, vol. 1, Diversidade e Coinservação dos remanescentes florestais. Blumenau: Edifurb, 2012. 1p. 143–169.

REIS, M. S.; MONTAGNA, T.; MATTOS, A. G.; FILIPPON, S.; MARQUES, A. da C.; ZECHINI, A. A.; PERONI, N.; MANTOVANI, A. Domesticated landscapes in Araucaria forests, Southern Brazil: A multispecies local conservation-by-use system. **Frontiers in Ecology and Evolution**, 2018.

REITZ, R.; KLEIN, R. M. Araucariáceas. In: REITZ, R. (Ed.). **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1966. p. 62.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, 2009.

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**, v. 94, n. 1, p. 13–22, 2005.

ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; SMOUSE, P. E.; GIL, L.; ALÍA, R. Pollen movement under alternative silvicultural practices in native populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in central Spain. **Forest Ecology and Management**, v. 197, n. 1–3, p. 245–255, 2004.

ROCHA, O. J.; AGUILAR, G. Variation in the breeding behavior of the dry forest tree *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) in Costa Rica. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 9, p. 1600–1606, 2001.

SANT'ANNA, C. S.; SEBBENN, A. M.; KLABUNDE, G. H. F.; BITTENCOURT, R.; NODARI, R. O.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S.; 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**, v. 14, n. 3, p. 601–613, jan. 2013.

SHIMIZU, J. Y.; HIGA, A. . Variação genética entre procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. na região de Itapeva, SP, estimada até o 60 ano de idade. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA,: **FUPEF**, 1979.

SHIMIZU, J. Y.; JAEGER, P.; SOPCHAKI, A. S. Variabilidade Genética em uma População Remanescente de Araucária no Parque Nacional do Iguaçu, Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 41, p. 18–36, 2000.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 16, p. 393–430, 1985.

SMOUSE, P. E.; SORK, V. L. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. **Forest Ecology and Management**, v. 197, n. 1–3, p. 21–38, ago. 2004.

SORK, V. L.; DAVIS, F. W.; SMOUSE, P. E.; APSIT, V. J.; DYER, R. J.; FERNANDEZ-M, J. F.; KUHN, B. Pollen movement in declining populations of California Valley oak, *Quercus lobata*: where

have all the fathers gone? **Molecular Ecology**, v. 11, n. 9, p. 1657–1668, set. 2002.

SORK, V. L.; NASON, J.; CAMPBELL, D. R.; FERNANDEZ, J. F. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. Trends in **Ecology & Evolution**, v. 14, n. 6, p. 219–224, jun. 1999.

SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H. Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**, 2003.

SOUSA, V. A.; SEBBENN, A. M.; HATTEMER, H. H.; ZIEHE, M. Correlated mating in populations of a dioecious Brazilian conifer, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Forest Genetics**, v. 12, n. 2, p. 107–119, 2005.

SOUZA, V. A. Population genetic studies in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. 2000. **Cuvillier**, 2000.

STEFENON, V. M.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. The role of gene flow in shaping genetic structures of the subtropical conifer species *Araucaria angustifolia*. **Plant Biology**, v. 10, n. 3, p. 356–364, 2008.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 4, p. 921–935, abr. 2004.

VRANCKX, G.; MERGEAY, J.; COX, K.; MUYS, B.; JACQUEMYN, H.; HONNAY, O. Tree density and population size affect pollen flow and mating patterns in small fragmented forest stands of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). **Forest Ecology and Management**, v. 328, p. 254–261, 2014.

WANG, H.; SORK, V. L.; WU, J.; GE, J. Effect of patch size and isolation on mating patterns and seed production in an urban population of Chinese pine (*Pinus tabulaeformis* Carr.). **Forest Ecology and Management**, v. 260, n. 6, p. 965–974, ago. 2010.

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**, v. 99, n. 4, p. 2038–2042, 19 fev. 2002.

WHITLOCK, M. C.; MCCAULEY, D. E. Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST}$  not equal to  $1/(4Nm + 1)$ . **Heredity**, v. 82 ( Pt 2), p. 117–25, fev. 1999.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 10, p. 413–418, 1996.

ZECHINI, A. A.; LAUTERJUNG, M. B.; CANDIDO-RIBEIRO, R.; MONTAGNA, T.; BERNARDI, A. P.; HOELTGEBAUM, M. P.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. dos. Genetic conservation of brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) through traditional land use. **Economic Botany**, v. 72, p. 1–14, 2018.

## 2 CAPÍTULO I – ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL E VARIÇÃO TEMPORAL DO SISTEMA REPRODUTIVO E DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM COORTES DE SEMENTES DE *Araucaria angustifolia* EM PAISAGENS DE CAMPO

### 2.1 INTRODUÇÃO

Degradações de habitat por causas antropogênicas podem promover mudanças em padrões de cruzamentos e numerosos estudos têm mostrado uma alta variabilidade em parâmetros reprodutivos, tais como a taxa de cruzamento e a correlação de paternidade entre as espécies (ECKERT et al., 2010). Alguns estudos sobre perda de habitats e fragmentação alertam para que pesquisas futuras priorizem escalas espaciais pequenas com o objetivo de avaliar a variação genética antes e depois de distúrbios, ou serem conduzidas ao longo de escalas temporais, descrevendo principalmente variações temporais e sazonais (LOWE et al., 2005). Outros estudos também recomendam que a variação nos níveis de diversidade e estrutura genética e do sistema reprodutivo em várias estações deveriam ser documentada (WARD et al., 2005; QUESADA et al., 2013), visto que variações sazonais significativas foram constatadas quando investigadas (ROCHA; AGUILAR, 2001; IRWIN et al., 2003; ALBALADEJO et al., 2009).

Variações nos sistemas de reprodução e troca genética são altamente dependentes do contexto histórico da população e refletem a influência de diversos fatores ecológicos, tais como, heterogeneidade ambiental, estrutura da vegetação e tipo de vizinhança local das plantas da mesma espécie (GARCÍA et al., 2005; DE-LUCAS et al., 2008; NORA; APARICIO; ALBALADEJO, 2016). A influência da variação anual tem implicações diretas em estratégias de conservação das espécies, recomendação para coleta, programas de melhoramento, restauração de áreas e indicação de áreas prioritárias a conservação.

Sistemas de cruzamento e de dispersão de genes têm sido amplamente estudados, descrevendo a variação existente na taxa de cruzamento entre diferentes populações da mesma espécie (LOWE et al., 2005), no entanto, poucos estudos têm descrito a variação ano a ano na taxa de cruzamento para uma mesma população (IRWIN et al., 2003; DA SILVA CARNEIRO et al., 2007; BRAGA; COLLEVATTI, 2011; QUESADA et al., 2013). Outros estudos têm mostrado variação substancial entre anos, também para correlação de paternidade

(ROCHA; AGUILAR, 2001; MANOEL et al., 2015) e composição de pólen (IRWIN et al., 2003; BRAGA; COLLEVATTI, 2011)

Em plantas perenes, o estudo de uma simples estação pode fornecer uma caracterização geracional limitada dos padrões de cruzamento (IRWIN et al., 2003). Padrões do sistema reprodutivo e de fluxo gênico em espécies florestais longevas, como a *Araucaria angustifolia*, são determinantes da dinâmica de recombinação genética de uma população reprodutiva para sua população descendente, afetando a diversidade genética dentro das famílias, taxas de cruzamento e cruzamento entre indivíduos aparentados (SEBBENN, 2006; SEBBENN et al., 2011). Além disso, a existência de cruzamentos entre indivíduos aparentados é atribuída a existência de uma estrutura genética espacial interna na população (MEDINA-MACEDO et al., 2016). Dessa forma, por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção (THOMAS, 2013) e extremamente importante, entender os mecanismos reprodutivos e trocas genéticas ao longo dos anos da *A. angustifolia* se torna prioritário para subsidiar programas de conservação e uso consciente de seus recursos.

Com isso, o objetivo deste estudo foi descrever a variação nos níveis de diversidade e estrutura genética e do sistema reprodutivo de populações adultas e coortes de sementes de *Araucaria angustifolia*, com ocorrência em ambientes de campo, comparando três diferentes anos e dois locais. Além disso, o estudo teve por objetivo verificar a estrutura genética interna das populações adultas de ambos os locais.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Áreas de estudo

O presente estudo foi realizado em duas áreas localizadas ao sul do Brasil, especificamente na região do planalto serrano do estado de Santa Catarina. A primeira área de estudo pertence a uma propriedade particular denominada Fazenda Santa Rita (FSR), que se encontra entre as latitudes 28°01'54'' e 28°03'12'' S, longitudes 50°17'12'' e 50°17'34'' O, e com altitude média de 1040 m acima do nível do mar. A FSR pertence a uma microrregião dentro do município de Lages denominada de Coxilha Rica, e distancia-se ao sul, cerca de 30 km do centro urbano do município.

A segunda área está situada na Fazenda Experimental do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (FECAV), e se encontra entre as latitudes 27°44'37'' e

27°44'60'' S e longitudes 50°04'10'' e 50°04'10'' O. A FECAV possui uma altitude média de 900 m, e distancia-se, em direção Leste, cerca de 25 km do centro urbano do município de Lages e cerca de 30 km da FSR (Figura 1).

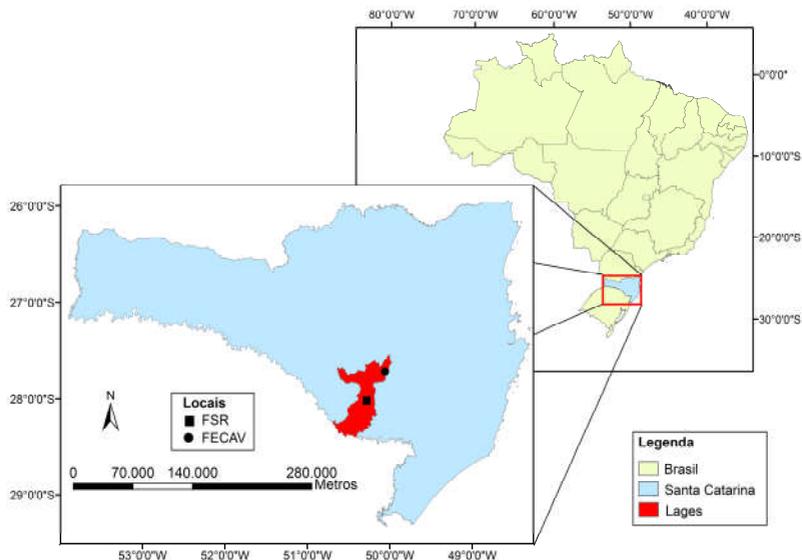


Figura 1 – Mapa de localização das áreas FSR e FECAV, contendo as populações as populações estudadas de *Araucaria angustifolia*, presentes no município de Lages, Santa Catarina, Brasil.

As áreas estão inseridas na fitofisionomia Floresta Ombrófila Mista, também conhecida como Floresta com Araucária. A vegetação da região intercala-se na paisagem de campos naturais, onde fragmentos de floresta ocorrem na forma de pequenos capões em meio a vegetação campestre e ao longo de rios e encostas (KLEIN, 1978; MATTOS, 2011). Essa vegetação, inicialmente chamada de “pinhais”, é caracterizada por agrupamentos de mata em manchas, com maiores concentrações ao longo de rios, vales e encostas, enquanto nos terrenos ondulados predominam os campos com capões de mata (REITZ; KLEIN; REIS, 1978). O clima da região é temperado húmido, do tipo Cfb Köppen, com chuvas bem distribuídas durante todo o ano, precipitação anual até 3500 mm, sem estação seca definida, verões quentes apresentado temperatura média do ar no mês mais quente maior

do que 22°C (ALVARES et al., 2013), com ocorrência de geada nas épocas mais frias do ano.

Na década de 1970, as áreas de floresta da FSR passaram por exploração com corte principalmente de plantas de *A. Angustifolia* e *Pdocarpus lambertii*, para uso madeireiro, segundo informações do proprietário (J.A.R.R., comunicação pessoal, 2013). Atualmente, na paisagem ocorrem áreas de mata, pequenos capões e também árvores isoladas em meio a vegetação predominante de campo, na qual é feito manejo por roçadas para pastagem rotativa de bovinos, prática comum na região. Grande parte da população adulta de dentro da parcela são plantas reprodutivas jovens, ao consirar a longevidade da espécie e são resultantes do processo de exploração do passado. No entanto, cabe ressaltar que na paisagem de entorno da parcela de estudo existe um remanescente florestal contendo altas densidades de árvores de *A. Angutifolia*, típico de florestas com Araucária (Figura 2).

A FECAV possui histórico de uso com bovinocultura extensiva, com poucas informações disponíveis sobre processos de exploração madeireira, no entanto, por ser uma prática comum na região, é provavel que isso ocorreu no passado. Após a aquisição em 2011, parte de suas áreas de campo foram destinadas a agricultura mecanizada, e áreas de mata destinadas a conservação. Assim como a FSR, a FECAV também possui seus remanescentes de mata e algumas árvores isoladas em meio a vegetação predominante de campo. É possível notar que áreas de mata e plantios florestais são mais comuns na paisagem onde está inserida a FECAV do que na paisagem onde se encontra a FSR (Figura 3).

Figura 2 - Imagem aérea da paisagem da Fazenda Santa Rita (FSR) com destaque (círculo branco) para a parcela de estudo, contendo as plantas amostradas de *Araucaria angustifolia*, região da Coxilha Rica, Lages - SC.



Fonte: Google Earth (modificado, 2016). Legenda: símbolos amarelos representam as plantas de *Araucária angustifolia* e símbolos vermelhos representam as plantas-mães utilizadas para coleta de sementes.

Figura 3 - Imagem aérea da paisagem da Fazenda Experimental do Centro de Ciências Agroveterinárias (FECAV) com destaque (retângulo vermelho) para a parcela de estudo, contendo as plantas amostradas de *Araucaria angustifolia*, Lages - SC.



Fonte: Google Earth (modificado, 2016). Legenda: símbolos amarelos representam as plantas de *Araucária angustifolia* e símbolos vermelhos representam as plantas-mães utilizadas para coleta de sementes.

### 2.2.2 Estrutura demográfica e distribuição espacial

Na área FSR foi instalada uma parcela circular com aproximadamente 43 ha, sendo que no interior da parcela há um açude

que ocupa 5,8 ha. Desta forma, para efeitos de densidade de indivíduos considerou-se uma área efetiva de 37,2 ha. O levantamento demográfico realizado no interior da parcela abrangeu todas as árvores de *Araucaria angustifolia* com CAP (Circunferência a Altura do Peito) acima de 30 cm. Na área da FECAV, o levantamento demográfico foi realizado em uma parcela retangular de 2 ha (100 x 200 m), na qual todas as plantas de *A. angustifolia* foram avaliadas, com o mesmo critério de inclusão da área anterior.

No levantamento demográfico as árvores foram georreferenciadas com auxílio de um GPS de navegação, mensuradas quanto ao CAP e identificadas com placa de alumínio. Além disso, foi realizada a sexagem das plantas, com auxílio de um binóculo, tomando-se por base a presença das estruturas reprodutivas microstróbilo (machos) e megastróbilo (fêmeas), em eventos reprodutivos distintos (2015 e 2017). Na ausência de estrutura reprodutiva visível, as árvores foram consideradas como indeterminadas quanto ao sexo. Após o levantamento demográfico, foram determinados o número de árvores por hectare e a proporção de árvores masculinas e femininas.

A partir da posição de cada planta, foi elaborada uma matriz de distâncias entre os pares de plantas reprodutivas masculinas e femininas, que corresponde as distâncias potenciais de ocorrência de cruzamentos. A análise do padrão de distribuição espacial foi verificada pela estatística K de Ripley (RIPLEY, 1976), calculada em função das distâncias entre pares de plantas (d). Para visualização dos resultados, a função K(d) foi transformada para função  $L(d)$  (RIPLEY, 1979), e plotada para as diferentes classes de distância analisadas. Para determinação do padrão espacial foram plotados os valores do intervalo de confiança a 95%, para completa aleatoriedade espacial, estimados usando 1000 simulações Monte Carlo, respectivos as distâncias analisadas. Essas análises foram computadas no programa PAST 3.0 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

### **2.2.3 Coleta e conservação do material genético**

Nas análises genéticas da população adulta (machos, fêmeas e indeterminados) foram utilizadas amostras de acículas, de todas as plantas (com CAP > 30 cm) existentes dentro das parcelas, coletadas com auxílio de um estilingue. Cada amostra foi individualmente armazenada de maneira adequada para garantir a eficácia das análises posteriores do DNA. A coleta das sementes foi feita por escalada e

retirada das pinhas diretamente da planta mãe. Na FSR isso foi feito em 16 plantas mãe durante o ano de 2015, e em 18 plantas mãe (incluindo as 16 do ano anterior) nos anos de 2016 e 2017. Na FECAV foram coletadas sementes em um único evento reprodutivo, de 12 plantas mãe no ano de 2017.

Sempre que possível eram coletadas cinco pinhas de cada planta mãe, mas, em 2015, houve um caso que a planta mãe apresentou apenas três pinhas e outros dois casos em que as plantas mãe apresentaram apenas quatro pinhas. No ano de 2017, na FSR, houveram três casos em que só foi possível coletar duas, três e quatro pinhas, respectivamente, para cada planta mãe; já para FECAV, houveram três casos em que apenas quatro pinhas foram coletadas. Nas coletas dos anos de 2016 e 2017 (nas duas áreas) foi registrada a orientação geográfica de cada uma das pinhas coletadas. Após cada coleta, as pinhas foram armazenadas individualmente até o processamento, que envolveu a pesagem da pinha, contagem dos pinhões e pesagem dos pinhões. Posteriormente, 25 pinhões foram aleatoriamente tomados de cada pinha para formar a amostra destinada a realização das análises genéticas. Essas sementes compuseram as coortes de sementes, dos anos de 2015, 2016 e 2017 da área FSR e a coorte de 2017 da área FECAV. O armazenamento adequado de todo material coletado foi realizado no Laboratório de Genética do IMEGEM (Instituto de Melhoramento e Genética Molecular), da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC. As coortes de sementes serão denominadas daqui para frente com prefixo “Se” seguido dos últimos dígitos do ano de coleta (e.g. Se15, Se16 e Se17). Para diferenciação dos locais avaliados será utilizado a sigla de cada local após a denominação de cada população/coorte (e.g. Se17 FECAV, denominação da coorte de sementes do ano de 2017 para área FECAV). Da mesma forma, para diferenciação das populações de adultos das duas áreas avaliadas, será utilizada, a denominação com o prefixo “Ad”, seguido da sigla de cada área, ou seja, Ad FSR e Ad FECAV. No caso de comparações entre populações de adultos e coortes de sementes será utilizado a denominação comparação entre gerações.

## **2.2.4 Extração e amplificação do DNA**

O procedimento utilizado para extração do DNA das acículas e também do embrião, obtido das sementes, foi o método CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) de acordo com o protocolo de extração proposto por Doyle e Doyle (1990). Após a extração a

qualidade e a quantidade do DNA das amostras foram analisadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000® (Thermo Scientific) e diluídas para uma concentração padrão de 10 ng.µL<sup>-1</sup>.

Nas reações de amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram utilizados 12 locos microssatélites (Tabela 1), otimizados em três as reações multiplex (A, B e C). No processo de otimização também foram testados os marcadores Aang01, Aang07, Aang27, Aang47 (SCHMIDT et al., 2007), e Ag62 (SALGUEIRO et al., 2005), porém estes foram descartados por não possuir uma reprodutibilidade fiel dos resultados gerados. As reações foram realizadas com o Multiplex PCR Kit da QIAGEN (Qiagen Inc., Valencia, CA), seguindo as recomendações do fabricante. Porém, com cada reação ajustada para um volume final de 6.2 µL. A ciclagem foi realizada em um termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler, segundo as condições recomendadas pelo fabricante (Qiagen Inc., Valencia, CA). Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Genética do IMEGEM da UDESC.

Tabela 1 - Características das reações de amplificação de DNA para 12 marcadores microssatélites (SSR) usados na caracterização genética em *Araucaria angustifolia*.

Loco	Reação multiplex	Dye*	Sequência motivo	T° C	Autores
Ag94	A	6-FAM	(TC)12	60	(SALGUEIRO et al., 2005)
CRCAc1	A	6-FAM	(GA)19	60	(SCOTT; SHEPHERD; HENRY, 2003)
Ag23	A	6-FAM	(TA)5(GT)4	60	(SALGUEIRO et al., 2005)
CRCAc2	A	VIC	(GA)23	60	(SCOTT; SHEPHERD; HENRY, 2003)
Ag45	B	6-FAM	(GT)4AT(GT)7	56	(SALGUEIRO et al., 2005)
Aang15	B	6-FAM	(GA)19	56	(SCHMIDT et al., 2007)
Aang24	B	NED	(CT)9	56	(SCHMIDT et al., 2007)
Ag20	B	NED	(GA)12	56	(SALGUEIRO et al., 2005)
Aang28	C	6-FAM	(CT)11	58	(SCHMIDT et al., 2007)
Aang22	C	6-FAM	(GA)10	58	(SCHMIDT et al., 2007)
Ag56	C	NED	(TC)11	58	(SALGUEIRO et al., 2005)
Aang14	C	PET	(GA)27	58	(SCHMIDT et al., 2007)

\*Marcação fluorescente do iniciador microssatélite; T° C: Temperatura de anelamento do iniciador, em graus Célsius

### 2.2.5 Genotipagem

A reação de genotipagem de cada amostra amplificada continha 1,2 µL de produto amplificado, 0,3 µL de GS600 LIZ® e 8,7 µL de formamida HI-DITM. Para leitura das amostras foi realizada eletroforese capilar em um Sequenciador Automático ABI3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems) no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Os alelos de cada amostra foram então determinados de acordo com o tamanho em pares de bases, a partir da interpretação dos eletroferogramas gerados no software GeneMapper® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Após a genotipagem foi realizada uma checagem dos alelos de cada amostra analisada com o auxílio do programa GenAIEx (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

### 2.2.6 Estrutura genética espacial (SGS)

A distribuição espacial dos genótipos foi analisada, em ambas as áreas, para toda população adulta (incluindo machos, fêmeas e indeterminados) e individualmente para machos e fêmeas, utilizando a estimativa do coeficiente de coancestria entre pares de árvores ( $\hat{\theta}_{xy}$ ), 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; VEKEMANS, 2002). Este coeficiente é definido para cada  $k$ -ésimo alelo do  $l$ -ésimo loco em cada par de indivíduos  $x$  e  $y$ , como:  $\hat{\theta}_{xy} = \left[ \frac{\sum_l \sum_k (p_{xlk} - \bar{p}_{lk})(p_{yik} - \bar{p}_{lk})}{\sum_l \sum_k \bar{p}_{lk}(1 - \bar{p}_{lk})} \right] + \left[ \sum_l \frac{1}{(2n_l - 1)} \right]$ . Onde  $p_{xlk}$  e  $p_{yik}$  são as frequências do alelo  $k$  no loco  $l$  no indivíduo  $x$  e  $y$ , respectivamente (assumindo valores de 0 para alelos alternativos; 0,5 para heterozigotos; e 1 em indivíduos homozigotos para o alelo em consideração),  $\bar{p}_{lk}$  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 a visualização da estrutura genética espacial os valores de  $\hat{\theta}_{xy}$  foram calculados para a média de pares de indivíduos dentro de 14 classes de distância (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700) para FSR e nove classes de distância (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225) para FECAV. A significância dos valores de  $\hat{\theta}_{xy}$  de cada classe foram testados pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade usando 10.000 permutações entre indivíduos. Com os valores das classes de distância, intervalos de confiança e os valores

médios foi plotado um correlograma. Essas análises foram realizadas utilizando o programa SPAGEDI versão 1.3 (HARDY; VEKEMANS 2002).

### 2.2.7 Diversidade e estrutura genética

A diversidade genética para população adulta e para as coortes (sementes) foi caracterizada pelo número de alelos por loco (A), número de alelos efetivos (Ae), índice de informação de Shannon (I), calculados por  $I = -1 * \sum [pi * \ln (pi)]$ , riqueza alélica (R), heterozigiosidade observada (Ho), e heterozigiosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (He). Esses índices e também os alelos exclusivos e raros (alelos com frequência menor que 0,05) foram estimados com auxílio do programa GenAIEx (PEAKALL; SMOUSE, 2012). A fim de investigar diferenças nos índices de diversidade genética calculados, foi utilizado o intervalo de confiança (IC) para a média, a 95% de confiança. Os ICs superior e inferior para os índices A, Ae, I e R foram calculados pela expressão  $IC = \bar{Y} \pm t_{(\alpha=0.05)} * EP$ , onde EP é o erro padrão da média entre os locos. Os ICs para os índices Ho e He foram calculados por reamostragem *bootstrap* entre plantas, computados no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015), utilizando os seguintes pacotes e funções: PopGenKit::bootstrapHet (PAQUETTE, 2012). Os índices de fixação foram estimados pelos valores de  $f$ , calculados pela expressão  $\hat{f} = 1 - (\hat{H}_o / \hat{H}_e)$  (NEI, 1978), com significância obtida por intervalos de confiança (95%) calculados por reamostragem *bootstrap*, com auxílio do programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2001).

As estatísticas F de Wright foram estimadas pelos coeficientes de coancestralidade de Weir e Cockerham (1984) e utilizadas para avaliar um possível efeito de estruturação na população adulta e também nas coortes de sementes. As estatísticas F incluem o índice de fixação da população total ( $F_{IT}$ ), o índice de fixação dentro das subpopulações locais ( $F_{IS}$ ) e entre as subdivisões das populações ( $F_{ST}$ ). Os valores médios foram gerados por reamostragem *Jackknife* entre locos, com significância obtida por intervalos de confiança (95%) calculados por *bootstrap*, geradas com auxílio do programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2001).

### 2.2.8 Sistema reprodutivo

O sistema reprodutivo foi analisado com base nos genótipos das plantas mãe e coortes de sementes (famílias) nas áreas FSR (2015, 2016 e 2017) e FECAV (2017), a partir do modelo de cruzamento misto e o modelo de cruzamento correlacionado, implementado no software Multilocus MLTR versão 3.1 (RITLAND, 2002). Foram estimadas a taxa de cruzamento multilocus ( $\hat{t}_m$ ), taxa de cruzamento unilocus ( $\hat{t}_s$ ), taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados ( $\hat{t}_m\hat{t}_s$ ), correlação de autofecundação ( $\hat{r}_s$ ) e correlação de paternidade ( $\hat{r}_p$ ) e o coeficiente de endogamia materno ( $\hat{F}_m$ ). O erro padrão das estimativas e o intervalo de confiança a 95% foi calculado por reamostragens *bootstrap* com 1000 permutações entre indivíduos dentro de famílias.

A partir dos resultados do sistema reprodutivo foram determinados outras estimativas como o número efetivo de doadores de pólen  $N_{ep}$ , baseado na correlação de paternidade ( $N_{ep} = 1/\hat{r}_p$ ) (RITLAND, 1989). A proporção de parentesco dentro das famílias foi determinada pela proporção média de meios-irmãos ( $P_{hs}$ ) e irmãos-completos ( $P_{fs}$ ) estimados como:  $P_{hs} = \hat{t}_m^2 (1 - \hat{r}_p)$  e  $P_{fs} = \hat{t}_m^2 \hat{r}_p$ . Adicionalmente, foi determinado o coeficiente de coancestria entre plantas  $\hat{\theta}$  dentro de progênies, que para espécies diploides, corresponde à metade do coeficiente de correlação entre plantas dentro de progênies ( $\hat{\theta} = r_{yx}/2$ ) (LYNCH; WALSH, 1998), que por sua vez é calculado pela expressão  $r_{yx} = 0,25 (1 + \hat{F}_m) [4\hat{s} + (\hat{t}_m + \hat{s} \hat{t}_m \hat{r}_s) (1 + \hat{r}_p)]$  (RITLAND, 1989), em que  $\hat{F}_m$  é o coeficiente de endogamia na geração parental e  $\hat{s}$  é a estimativa da taxa de autofecundação.

Com base na correlação de paternidade, o coeficiente médio de coancestria dentro das famílias  $\hat{\Theta}_{xy}$  foi calculado como  $\hat{\Theta} = 0.125(1 + \hat{F}_p)(1 + \hat{r}_p)$ , onde  $\hat{F}_p$  é o índice de fixação na geração paterna (SOUSA et al., 2005). Em termos práticos o valor de  $\hat{\Theta}_{xy}$  representa quantos indivíduos diferentes uma dada planta-mãe pode representar. Para determinar a estrutura genética dentro de cada família o tamanho efetivo da variância foi estimado como:  $\hat{N}_{e(v)} = 0.5/\{\Theta[(n-1)/n] + (1 + F_o)/2n\}$ , onde  $n$  é o tamanho da amostra e  $F_o$  é o coeficiente de endogamia (COCKERHAM, 1969). O número de árvores plantas mãe doadoras de sementes necessário para reter um tamanho efetivo de uma população referência ( $N_{e(r)}$ ) de 150 (LACERDA et al., 2012), foi calculado segundo (SEBBENN, 2002, 2006), como sendo:  $m = N_{e(r)}/N_{e(v)}$ .

## 2.3 RESULTADOS

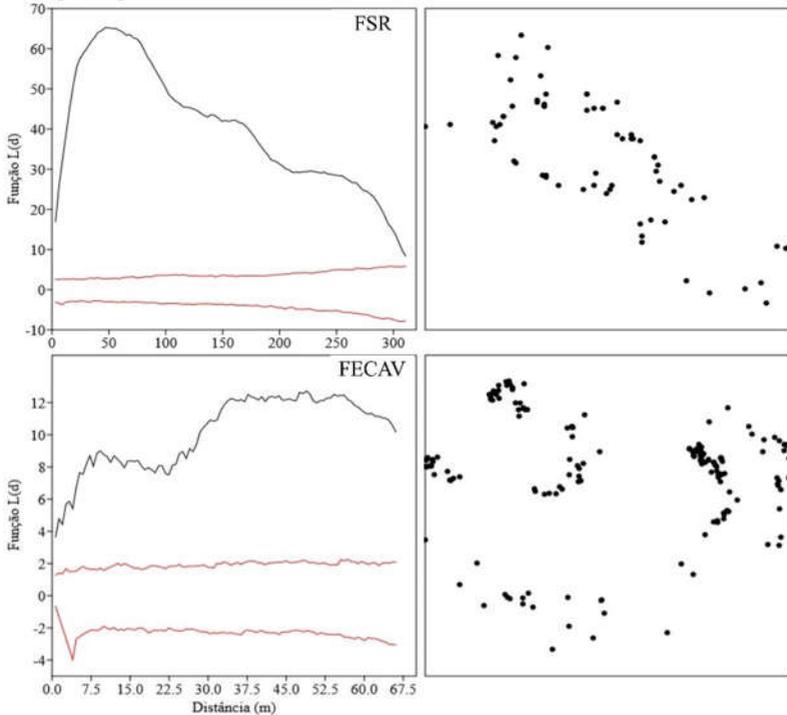
### 2.3.1 Estrutura populacional

O levantamento realizado na área FECAV encontrou 68 plantas de *A. angustifolia*, sendo 26 fêmeas, 19 machos e 23 indeterminados (plantas sem estrutura reprodutiva visível), com uma densidade de 34 indivíduos por hectare. A proporção encontrada de machos e fêmeas foi de 1:1,36, não diferente da proporção 1:1 ( $\chi^2 = 1,09$ ;  $p = 0,297$ ). A distância média entre todos os pares de plantas foi de 67 m, com mínima de um metro e máxima de 213 m.

Na área FSR a densidade encontrada foi de 4,9 indivíduos por ha, com número total de plantas de 181, sendo 63 fêmeas, 64 machos e 53 indeterminados. Em uma única árvore foi verificado a presença de monoíxia (estruturas masculina e feminina na mesma planta). A proporção encontrada de machos e fêmeas foi de 1:1,032, também não diferente da proporção 1:1 ( $\chi^2 = 0,891$ ;  $p = 0,929$ ). As distâncias entre todos os pares de plantas têm como média 304 m, mínima de 0,5 e máxima de 692 m.

A análise do padrão espacial da população adulta pela estatística K de Ripley, em ambas as áreas, revelou um padrão de distribuição agregado em todas as distâncias analisadas (Figura 4).

Figura 4 - Análise do padrão de distribuição espacial das plantas de *Araucaria angustifolia*, em duas paisagens de campo, nas áreas FSR e FECAV, no município de Lages-SC. Linha em preto são valores da estatística  $L(d)$ , calculada pela função K de Ripley. Linhas em vermelho representam o envelope do intervalo de confiança a 95%. Pontos representam a disposição das plantas no espaço, para cada área.



Fonte: Produção do próprio autor.

### 2.3.2 Diversidade e estrutura genética

#### 2.3.2.1 Análises por classe das populações de adultos

A diversidade genética avaliada conforme as classes de adultos (fêmeas, machos e indeterminados) de ambos os locais avaliados, revelou um total de 143 alelos, com mínimo de três (Crca1) e máximo de 31 (Aang15) alelos por loco. Em geral, a comparação dos índices para população adulta demonstrou não haver diferenças significativas entre classes de ambas as áreas avaliadas (Tabela 2). Quanto ao índice

de fixação ( $f$ ) foram verificados valores significativamente diferentes de zero para todas as classes avaliadas, exceto para fêmeas da área FSR.

Tabela 2: Valores médios dos índices de diversidade genética para número de alelos (A), número de alelos efetivos (Ae), índice de informação de Shannon (I), riqueza alélica (baseada em 18 plantas) (R), Heterozigosidade observada (Ho), Heterozigosidade esperada (He) e índice de fixação ( $f$ ) em duas populações de *Araucaria angustifolia*, em paisagem de campo, no município de Lages-SC.

Estimativa	População/classe					
	FSR/fêmeas		FSR/machos		FSR/indeterminados	
<b>N</b>	62	-	64	-	53	-
<b>A</b>	9,8	[6,6 - 13,0]	9,8	[6,9 - 12,7]	9,7	[6,7 - 12,6]
<b>Ae</b>	5,5	[3,6 - 7,4]	5,5	[3,7 - 7,3]	5,6	[3,5 - 7,7]
<b>I</b>	1,7	[1,3 - 2,1]	1,723	[1,3 - 2,1]	1,7	[1,3 - 2,1]
<b>R</b>	7,6	[5,5 - 9,6]	7,5	[5,5 - 9,5]	7,6	[5,6 - 9,6]
<b>Ho</b>	0,714	[0,686 - 0,744]	0,710	[0,679 - 0,735]	0,708	[0,680 - 0,740]
<b>He</b>	0,728	[0,699 - 0,731]	0,730	[0,704 - 0,736]	0,734	[0,704 - 0,732]
<b><math>f</math></b>	0,015	-	0,023*	-	0,027*	-

Estimativa	População/classe					
	FECAV/fêmeas		FECAV/machos		FECAV/indeterminados	
<b>N</b>	26	-	19	-	23	-
<b>A</b>	8,3	[5,9 - 10,7]	7,1	[5,1 - 8,9]	7,8	[5,6 - 10,1]
<b>Ae</b>	4,6	[3,2 - 6,1]	4,6	[3,3 - 5,9]	4,1	[2,9 - 5,3]
<b>I</b>	1,6	[1,2 - 1,9]	1,5	[1,2 - 1,9]	1,5	[1,1 - 1,8]
<b>R</b>	7,2	[5,2 - 9,3]	6,9	[5,1 - 8,8]	6,9	[5,0 - 8,8]
<b>Ho</b>	0,651	[0,581 - 0,716]	0,640	[0,554 - 0,681]	0,616	[0,559 - 0,706]
<b>He</b>	0,689	[0,61 - 0,698]	0,695	[0,576 - 0,683]	0,663	[0,610 - 0,689]
<b><math>f</math></b>	0,023*	-	0,049*	-	0,061*	-

Intervalos de Confiança (95%) inferior e superior entre colchetes.

\*significativamente diferente de zero.

Foram verificados índices de fixação significativos dentro das subdivisões das populações ( $F_{IS}$ ) e na população total ( $F_{IT}$ ) de acordo com as classes de adultos da área FSR. Para área FECAV o padrão encontrado foi diferente, com índices de fixação ( $F_{IS}$  e  $F_{IT}$ ) não significativos. Para ambas as áreas o valor de  $F_{ST}$  não foi significativo, indicando não haver divergência genética entre as classes de cada área (Tabela 3).

Tabela 3 - Estatísticas F de Wright, calculadas para diferentes classes de plantas reprodutivas de duas populações adultas de *Araucaria angustifolia*, em paisagem de campo, no município de Lages - SC.

Área	N	F <sub>IS</sub>	F <sub>IT</sub>	F <sub>ST</sub>
<b>FSR</b>	178	0,027* [0,002 - 0,056]	0,027* [0,002 - 0,056]	0,001 [-0,002 - 0,002]
<b>FECAV</b>	67	0,071 [-0,004 - 0,155]	0,071 [-0,004 - 0,155]	-0,002 [-0,007 - 0,004]
<b>Geral</b>	245	0,039 [0,010 - 0,073]	0,016 [0,025 - 0,087]	0,015 [0,009 - 0,021]

Intervalo de confiança (95%) apresentado entre colchetes.

A presença de alelos exclusivos foi verificada em todas as classes de acordo com a sexagem da população adulta. Um total de 22 alelos exclusivos foram verificados (Tabela 4). Todos os alelos exclusivos apresentaram frequência menor do que 0,05 e podem ser classificados também como alelos raros.

Tabela 4: Frequência de alelos exclusivos para locos microssatélites em relação as classes de plantas adultas de *Araucaria angustifolia* inseridas em paisagem de campo, no município de Lages -SC.

Área	Classe	Loco	Alelo	Frequência
<b>FSR</b>	fêmeas	Ag94	171	0.008
	fêmeas	Aang15	247	0.008
	fêmeas	Aang15	253	0.008
	fêmeas	Aang24	200	0.008
	fêmeas	Ag20	254	0.008
	indeterminados	Ag23	248	0.010
	indeterminados	Aang15	255	0.010
	indeterminados	Ag20	252	0.010
	machos	Ag23	272	0.008
	machos	CrCac2	204	0.008
	machos	Aang15	249	0.008
	machos	Aang24	202	0.008
	machos	Ag20	248	0.016
<b>FECAV</b>	fêmeas	Aang15	261	0.019
	indeterminados	Ag56	152	0.022
	indeterminados	Ag94	147	0.022
	indeterminados	Ag23	242	0.022
	indeterminados	Ag23	252	0.022
	indeterminados	Aang15	267	0.022
	indeterminados	Aang24	178	0.043
	indeterminados	Ag20	249	0.022
	machos	Aang28	168	0.028

### 2.3.2.2 Análises entre gerações, anos e locais

Os índices de diversidade observados para populações de adultos e coortes de sementes, de maneira geral, foram semelhantes. Diferenças significativas entre gerações (adultos vs coortes de sementes) foram constatadas para os índices  $H_o$  e  $H_e$ , com maiores valores encontrados na população de adultos da área FSR, exceto na comparação desta com as sementes da coorte de 2016, onde não houve diferença significativa. Índices de fixação significativos foram verificados para todas as situações analisadas (Tabela 5).

A comparação entre os anos para as coortes de sementes demonstrou que não houve diferença significativa para os índices de diversidade genética avaliados. No entanto, a comparação entre locais (análise espacial) revelou maiores índices de  $H_o$  e  $H_e$  para a população de adultos da área FSR, comparativamente a área FECAV (Tabela 5).

Tabela 5: Valores médios e intervalos de confiança (entre colchetes) dos índices de diversidade genética para número de alelos (A), número de alelos efetivos (Ae), índice de informação de Shannon (I), riqueza alélica (baseada em 67 plantas) (R), Heterozigosidade observada ( $H_o$ ), Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e índice de fixação (f) em duas populações adultas e quatro coortes de sementes de *Araucaria angustifolia*, em paisagem de campo, no município de Lages-SC.

Estimativa	Ad FSR		Se15 FSR		Se16 FSR	
N	178		399		443	
A	11,0	[7,4 - 14,5]	12,1	[8,6 - 15,6]	11,333	[7,8 - 14,7]
Ae	5,7	[3,7 - 7,7]	5,3	[3,4 - 7,3]	5,604	[3,4 - 7,7]
I	1,7	[1,4 - 2,1]	1,7	[1,4 - 2,1]	1,714	[1,3 - 2,1]
R	9,7	[6,6 - 12,8]	9,5	[6,6 - 12,5]	9,552	[6,5 - 12,6]
$H_o$ †	0,711	[0,695 - 0,729]	0,682	[0,670 - 0,694]	0,673	[0,661 - 0,682]
$H_e$ †	0,729	[0,718 - 0,736]	0,703	[0,694 - 0,710]	0,713	[0,706 - 0,719]
f	0,027*		0,031*		0,058*	
	Se17 FSR		Ad FECAV		Se17 FECAV	
N	440		67		289	
A	12,0	[8,4 - 15,6]	9,9	[7,0 - 12,8]	11,3	[7,7 - 14,9]
Ae	5,5	[3,4 - 7,6]	4,7	[3,2 - 6,2]	5,4	[3,5 - 7,1]
I	1,6	[1,3 - 2,1]	1,6	[1,2 - 2,0]	1,7	[1,2 - 2,1]
R	9,5	[6,2 - 12,1]	9,7	[6,8 - 12,7]	9,1	[6,6 - 12,8]
$H_o$ †	0,670	[0,657 - 0,679]	0,638	[0,592 - 0,678]	0,669	[0,641 - 0,671]
$H_e$ †	0,710	[0,701 - 0,713]	0,681	[0,641 - 0,697]	0,701	[0,691 - 0,708]
f	0,057*		0,070*		0,066*	

Intervalos de Confiança (95%) inferior e superior entre colchetes. \*Valores significativamente diferentes de zero.

No total foram encontrados 170 alelos diferentes, para os 12 locos analisados, sendo que 168 deles estavam presentes nas coortes de sementes, as quais apresentaram um maior número de alelos exclusivos comparativamente a população de adultos de ambas as áreas analisadas (Tabela 6). Um total de 18 alelos exclusivos foram verificados na área FSR e dois na área FECAV. Todos os alelos exclusivos apresentaram frequência menor do que 0,05 e podem ser classificados também como alelos raros.

Tabela 6: Frequência de alelos exclusivos para locos microssatélites em relação em populações de adultos e coortes de sementes de *Araucaria angustifolia* inseridas em paisagem de campo, no município de Lages - SC.

Área	População/coorte	Loco	Alelo	Frequência
FSR	indeterminados	Ag23	248	0,009
	machos	Crca2	204	0,008
	Se15	Aang22	246	0,004
	Se15	Aang14	227	0,004
	Se15	Aang14	231	0,001
	Se15	Aang24	174	0,001
	Se15	Aang24	176	0,003
	Se15	Ag20	234	0,001
	Se16	Crca2	176	0,001
	Se16	Aang15	263	0,001
	Se16	Aang24	214	0,001
	Se17	Aang28	164	0,001
	Se17	Ag94	175	0,002
	Se17	Crca1	202	0,002
	Se17	Crca2	208	0,001
	Se17	Aang24	206	0,001
	Se17	Aang24	210	0,001
	Se17	Ag20	253	0,001
	FECAV	Se17	Aang22	212
Se17		Ag20	233	0,002

Foi verificada a presença de estruturação genética significativa entre a população de adultos e as coortes de sementes, da área FSR e também para FECAV, de acordo com as análises das estatísticas F de Wright. Índices de fixação para população total e dentro das populações foram significativos para ambas áreas. No entanto, foi verificada

divergência genética significativa apenas entre a população adulta e as coortes de sementes para área FSR (Tabela 7).

Tabela 7 - Estatísticas F de Wright calculadas para população de adultos e coortes de sementes de *Araucaria angustifolia*, em duas áreas de campo, no município de Lages - SC.

Área	N	F <sub>IS</sub>	F <sub>IT</sub>	F <sub>ST</sub>
<b>FSR</b>	1460	0,046* [0,019 - 0,081]	0,048* [0,02 - 0,083]	0,002* [0,001 - 0,002]
<b>FECAV</b>	356	0,066* [0,010 - 0,137]	0,034* [0,011 - 0,138]	0,001 [-0,001 - 0,003]
<b>Geral</b>	1816	0,050* [0,020 - 0,087]	0,064* [0,034 - 0,101]	0,014* [0,010 - 0,019]

Intervalos de confiança (95%) inferior e superior apresentado entre colchetes.

De maneira geral, divergências genéticas foram verificadas pelos valores de  $F_{ST}$  par a par nas avaliações feitas entre os anos na área FSR. Foram também verificadas divergências genéticas entre as áreas FSR e FECAV, tanto na comparação feitas entre as classes de adultos quanto na comparação entre as coortes de sementes. Para grande parte dos casos (i.e. sete dos nove casos testados) na área FSR e para todos os casos analisados na área FECAV não houveram divergências genéticas entre gerações.

Tabela 8 – Valores de divergência genética ( $F_{ST}$ ) par a par por classe de adultos ou coorte de sementes de *Araucaria angustifolia* avaliados em duas áreas em paisagem de campo (FSR e FECAV), no município de Lages - SC.

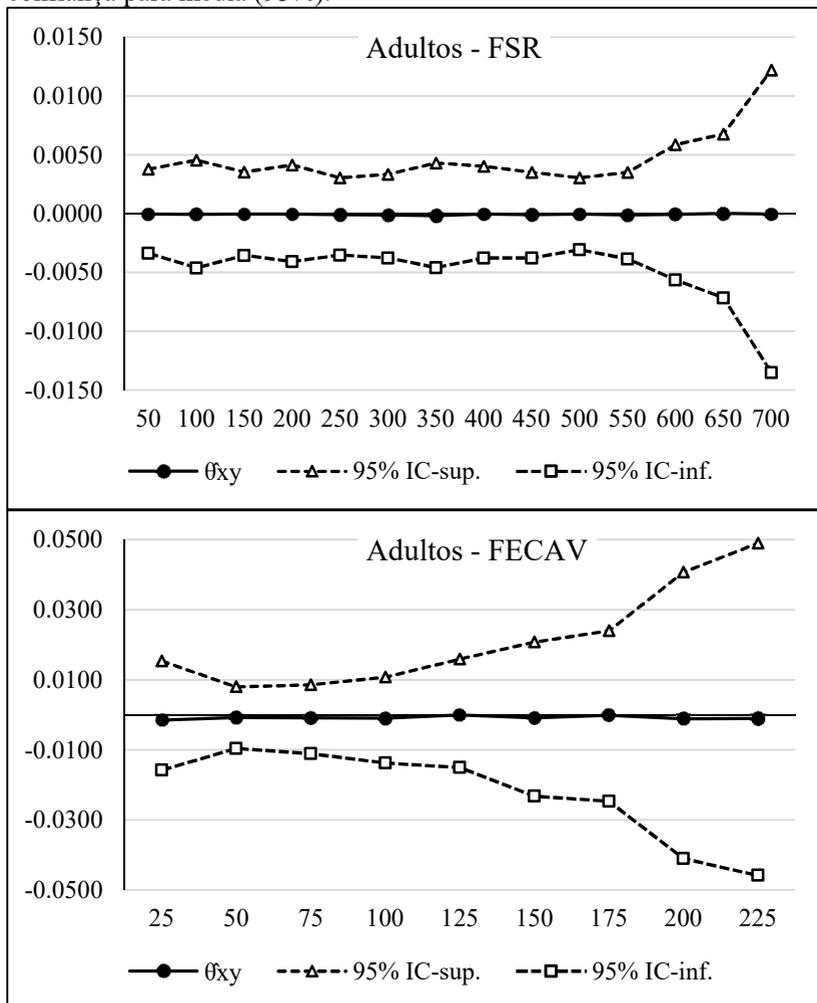
Classe/coorte amostrada	$F_{ST}$	IC Sup.	IC Inf.
<b>Entre gerações - FSR</b>			
F FSR vs Se 15 FSR	0,0037	-0,0012	0,0096
I FSR vs Se 15 FSR	<b>0,0081*</b>	0,0026	0,0152
M FSR vs Se 15 FSR	0,0037	-0,0013	0,0101
F FSR vs Se 16 FSR	0,0013	-0,0027	0,0058
I FSR vs Se 16 FSR	0,0049	-0,0002	0,0113
M FSR vs Se 16 FSR	0,0018	-0,0002	0,0071
F FSR vs Se 17 FSR	0,0013	-0,0026	0,0063
I FSR vs Se 17 FSR	<b>0,0052*</b>	0,0004	0,0115
M FSR vs Se 17 FSR	0,0009	-0,0026	0,0061
<b>Entre anos - FSR</b>			
Se 15 FSR vs Se 16 FSR	<b>0,0015*</b>	0,0002	0,0030
Se 15 FSR vs Se 17 FSR	<b>0,0015*</b>	0,0003	0,0029
Se 16 FSR vs Se 17 FSR	0,0002	-0,0005	0,0013
<b>Entre áreas (adultos)</b>			
F FSR vs I FECAV	<b>0,0369*</b>	0,0138	0,073
F FSR vs F FECAV	<b>0,0381*</b>	0,0162	0,0659
F FSR vs M FECAV	<b>0,0231*</b>	0,0019	0,0540
I FSR vs F FECAV	<b>0,0281*</b>	0,0111	0,0517
I FSR vs I FECAV	<b>0,0279*</b>	0,0077	0,0636
I FSR vs M FECAV	0,0199	-0,0001	0,0476
M FSR vs F FECAV	<b>0,0291*</b>	0,0112	0,0538
M FSR vs I FECAV	<b>0,0328*</b>	0,0107	0,0655
M FSR vs M FECAV	<b>0,0187*</b>	0,0005	0,0454
<b>Entre áreas (sementes)</b>			
Se 15 FSR vs Se 17 FECAV	<b>0,036*</b>	0,0314	0,0412
Se 16 FSR vs Se 17 FECAV	<b>0,0336*</b>	0,0291	0,0377
Se 17 FSR vs Se 17 FECAV	<b>0,0326*</b>	0,0285	0,0369
<b>Entre gerações - FECAV</b>			
F FECAV vs Se 17 FECAV	-0,004	-0,012	0,0084
I FECAV vs Se 17 FECAV	0,007	-0,0052	0,0295
M FECAV vs Se 17 FECAV	-0,0028	-0,0130	0,0140

Classes: F fêmeas; M machos; I indeterminados. IC Sup. e IC Inf.: Intervalos de confiança superior e inferior (95%).

### 2.3.3 Estrutura genética espacial (SGS)

Os resultados dos correlogramas nas populações de adultos de *Araucaria angustifolia*, em ambas as áreas, indicam que não há estrutura genética espacial significativa. Isso foi observado para todas as classes de distâncias avaliadas, de acordo com os intervalos de confiança para os valores médios do coeficiente de coancestria (Figura 5).

Figura 5 - Correlograma de coancestria médio ( $\hat{\theta}_{xy}$ ) por classe de distância para as populações adultas de *Araucaria angustifolia* nas áreas FECAV e FSR. A linha sólida representa os valores médios de  $\hat{\theta}_{xy}$  por classe de distância. Linhas tracejadas representam o intervalo de confiança para média (95%).



Fonte: Produção do próprio autor

A porcentagem de plantas que participaram dos contratos em cada uma das 14 classes de distância avaliadas para área FSR foi de

95,6%, 97,8%, 84,4%, 99,4%, 97,8%, 91,1%, 91,7%, 100%, 98,3%, 92,8%, 90%, 65%, 40,6%, e 21,7%, respectivamente. Na área FECAV essa porcentagem foi de 100%, 100%, 100%, 100%, 100%, 82,4%, 48,5%, 23,5% e 10,3%, respectivamente, para as nove classes de distâncias avaliadas. Possivelmente os menores porcentagens de plantas participando nas maiores classes ocasionaram maiores intervalos de confiança para ambos os locais. Ao analisar separadamente plantas machos e fêmeas, também não foi verificada uma SGS significativa (dados não apresentados).

### 2.3.4 Sistema reprodutivo

Os resultados da análise do sistema reprodutivo juntamente com estimativas de estrutura e parentesco para os anos de 2015, 2016 e 2017 na área FSR, e para o ano de 2017 na área FECAV estão descritos na Tabela 9.

Na comparação das estimativas do sistema reprodutivo houveram diferenças significativas entre os anos avaliados para os valores médios da correlação de paternidade ( $\hat{r}_p$ ) e, conseqüentemente, para o número efetivo de doadores de pólen ( $\hat{N}_{ep}$ ). Para os níveis de estrutura e parentesco foram verificadas diferenças significativas entre os anos para a proporção de meio irmãos, proporção de irmãos completos, coeficiente médio de coancestria dentro das famílias, tamanho efetivo da variância e número de árvores para coleta de sementes. Não foram verificadas diferenças significativas entre as áreas avaliadas, no ano de 2017.

Tabela 9 - Resultados das estimativas do sistema reprodutivo e de estrutura e parentesco avaliados em 2015 e 2016 em *Araucaria angustifolia*

Estimativa	2015 FSR	2016 FSR	2017 FSR	2017 FECAV
<b>Sistema reprodutivo</b>				
Taxa de cruzamento multilocus: $\hat{\ell}_m$	1,200 [1,200 - 1,200]	1,200 [1,200 - 1,200]	1,200 [1,200 - 1,200]	1,062 [0,985 - 1,200]
Taxa de cruzamento unilocus: $\hat{\ell}_s$	0,979 [0,969 - 0,996]	0,993 [0,975 - 1,007]	0,989 [0,974 - 1,007]	0,959 [0,931 - 0,987]
Cruzamento entre aparentados: $\hat{\ell}_m - \hat{\ell}_s$	0,021 [0,004 - 0,031]	0,007 [-0,007 - 0,025]	0,011 [-0,007 - 0,027]	0,036 [0,01 - 0,061]
Correlação de paternidade: $\hat{r}_p^*$	0,132 [0,097 - 0,168]	0,027 [0,009 - 0,049]	0,093 [0,031 - 0,165]	0,077 [0,031 - 0,122]
Número efetivo de doadores de pólen: $N_{ep}^*$	7,742 [5,952 - 10,309]	41,896 [20,408 - 111,111]	12,794 [6,098 - 32,258]	14,813 [8,264 - 33,333]
<b>Endogamia e estrutura</b>				
Coefficiente de endogamia materno: $\hat{F}_m$	0,051 [0,044 - 0,06]	0,047 [0,042 - 0,061]	0,029 [-0,052 - 0,087]	0,022 [-0,085 - 0,118]
Proporção de meio irmãos: $P_{hs}^*$	0,862 [0,832 - 0,903]	0,973 [0,951 - 0,991]	0,907 [0,836 - 0,969]	0,915 [0,864 - 0,963]
Proporção de irmãos completos: $P_{fs}^*$	0,138 [0,097 - 0,168]	0,027 [0,009 - 0,049]	0,093 [0,031 - 0,165]	0,076 [0,031 - 0,121]
Correlação entre plantas dentro de progenies: $r_{yx}$	0,379 [0,376 - 0,382]	0,377 [0,375 - 0,382]	0,370 [0,34 - 0,391]	0,295 [0,236 - 0,39]
Coefficiente de coancestria entre plantas dentro de progenies: $\hat{\theta}$	0,189 [0,188 - 0,191]	0,188 [0,187 - 0,191]	0,185 [0,17 - 0,196]	0,148 [0,118 - 0,195]
Coefficiente médio de coancestria dentro das famílias: $\hat{\Theta}_{xy}^*$	0,145 [0,14 - 0,149]	0,131 [0,129 - 0,134]	0,140 [0,132 - 0,149]	0,138 [0,132 - 0,143]
Tamanho efetivo da variância: $N_{e(v)}^*$	3,487 [3,378 - 3,597]	3,112 [3,058 - 3,156]	3,614 [3,389 - 3,827]	3,638 [3,494 - 3,803]
Número de plantas mãe para coleta de sementes: $m^*$	43 [41,7 - 44,4]	48 [47,5 - 49,0]	42 [39,2 - 44,3]	41 [39,5 - 42,9]
<b>Tamanho da amostra</b>				
Número de plantas mãe	16	18	18	12
Número de sementes por planta mãe	25	25	25	25

Estimativas seguidas de \* apresentaram diferenças significativas entre os anos.

## 2.4 DISCUSSÃO

### 2.4.1 Padrão espacial e estrutura interna da população

A distribuição espacial agregada das plantas de *A. angustifolia* já era esperada para as populações avaliadas, pois, embora algumas plantas

ocorram de forma “isolada” em meio a paisagem de campo, a maioria se encontra agrupada em capões de mata, formação esta que é típica para a região (MATTOS, 2011). Além disso, o histórico de manejo das áreas de campo, roçadas e pastagem com bovinos no caso da FSR, e agricultura no caso da FECAV, tem grande influência na formação da paisagem e, conseqüentemente, no padrão de agregação da espécie.

A densidade de indivíduos encontrada para área FSR (4,2 ind.ha<sup>-1</sup>) foi cerca de nove vezes menor do que comumente se encontra para populações de *Araucaria angustifolia* presentes em ambientes de floresta (MEDINA-MACEDO et al., 2015 – 42,1 ind.ha<sup>-1</sup>; SANT’ANNA et al., 2013 – 40,3 ind.ha<sup>-1</sup>; BITTENCOURT; SEBBENN, 2007 – 40,7 ind.ha<sup>-1</sup>). Valores mais próximos a estes estudos foram verificados na área FECAV (34 ind.ha<sup>-1</sup>). Atribui-se que as menores densidades encontradas são devidas ao fato do levantamento ter contemplado capões de mata com *A. angustifolia* e áreas de campo com a presença de árvores de maneira “isolada” na paisagem. Isso corrobora com os resultados de outros estudos feitos com a espécie, que também verificaram baixas densidades em populações da espécie presentes em paisagens de campo. Ao avaliar diferentes locais da área FSR, Zechini et al (2018), encontraram valores de densidade de 16,2 indivíduos de *A. angustifolia* por hectare, os menores valores de densidade encontrados dentre quatro locais avaliados na região do planalto de Santa Catarina.

#### 2.4.2 Diversidade e estrutura genética

De maneira geral os índices de diversidade genética encontrados para as populações (Ad FSR e Ad FECAV) e coortes (Se2015, Se2016 e Se2017) analisadas foram similares. Somente foram encontradas diferenças significativas para os valores de  $H_o$  e  $H_e$  entre duas gerações (Ad FSR vs Se 2015 e Ad FSR vs Se 2017), com maiores valores apresentados pela população de adultos, conforme demonstrado na Tabela 5. Esses resultados indicam que diferenças na diversidade genética de adultos e sementes, podem ocorrer ou não de acordo com o ano avaliado, pois não houve diferença para esses índices na comparação Ad FSR vs Se2016. Esse fenômeno tem implicações diretas no estabelecimento de estratégias de uso e conservação da população, uma vez que diferenças significativas podem indicar que a diversidade genética não está sendo mantida na população; todavia, diferenças não significativas indicam que a diversidade genética está sendo mantida.

Resultados distintos de diferentes anos de avaliação possivelmente são relacionados às variações anuais nos cruzamentos realizados entre plantas dentro da população. Desse modo, para se obterem estimativas robustas na comparação entre gerações é importante avaliar mais de um evento reprodutivo. Na análise por área, embora tenham sido encontrados valores significativamente maiores de  $H_o$  e  $H_e$  na FSR comparativamente a FECAV, tais índices não diferiram na comparação feita entre as coortes de sementes das duas áreas. Isso confirma que avaliar a variação temporal (diferentes anos) da diversidade genética pode ser tão importante quanto a avaliação de diferentes populações (LOWE et al., 2005).

Diferenças na diversidade genética entre populações adultas e regenerantes podem ter um efeito positivo quando há um ganho da diversidade genética ao longo das gerações, relacionado principalmente pela imigração de alelos de fora da população, ou seja, a diversidade genética é maior nas regenerantes do que na população adulta, que conseqüentemente irão compor as novas gerações da espécie. O efeito oposto seria uma diminuição da diversidade, que está relacionada com perda do potencial evolutivo e depressão endogâmica (WRIGHT, 1931), afetando negativamente as futuras gerações. Espécies longevas como *A. angustifolia* e que possuem um fluxo gênico capaz de atingir longas distâncias na paisagem (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007), tem, de certa forma, a manutenção da diversidade genética favorecida. Embora elevados, os índices de diversidade encontrados no presente estudo foram ligeiramente maiores na geração adulta. Elevados índices de diversidade genética tanto para coortes de sementes quanto para populações adultas presentes em paisagens de campo também foram encontrados nos estudos de Costa et al. (2015) e Cristofolini (2017), ao avaliarem diferentes populações de *A. angustifolia* localizadas na mesma região em que o presente estudo foi realizado.

Índices de fixação próximos a zero, porém, significativos e sem diferenças entre si, foram encontrados em todas as situações analisadas (Tabela 5). Índices de fixação baixos ou não significativos são esperados com a presença de cruzamento obrigatório, como em espécies dioicas, de amplo fluxo gênico. Valores de  $f$  significativos também são relatados em outros estudos envolvendo a *Araucaria angustifolia* (COSTA et al., 2015; MONTAGNA et al., 2018; LAUTERJUNG et al., 2019 no prelo). No entanto, para se ter uma ideia do que os índices de fixação representam para a espécie é importante a comparação entre diferentes gerações (LOWE et al., 2015). Em *Araucaria angustifolia* são

apresentados cenários onde os índices de fixação na população regenerante são menores que aqueles estimados na população reprodutiva (FERREIRA et al., 2012; CRISTOFOLINI, 2017), ou serem da mesma magnitude ou maiores que aqueles estimados nas plantas reprodutivas (BITTENCOURT; SEBBENN, 2008; COSTA et al., 2015). O primeiro cenário indica que as populações apresentam potencial de manter e transmitir a diversidade atual por meio das próximas gerações, já o segundo cenário indica risco alto de perda de diversidade genética para as futuras gerações estudadas.

Em termos de estrutura genética foi possível perceber que existem índices de fixação significativos ( $F_{IT}$  e  $F_{IS}$ ) para as gerações analisadas de ambas as áreas (Tabela 7). Isso foi também observado na análise por classe da população adulta da área FSR, porém, o mesmo não ocorreu para área FECAV (Tabela 3). Índices de fixação significativos indicam que há um excesso de homozigotos na população ou na coorte avaliada, e que estas apresentam desvios do equilíbrio de Hard-Weinberg. O índice de fixação, ou coeficiente de endogamia para sementes, é originado do cruzamento entre indivíduos aparentados, o qual produz um coeficiente de endogamia igual ao coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) entre genitores. Para espécies dioicas o nível de coancestria produzido pode ser de apenas dois tipos (meio irmãos  $\theta_{xy}=0,125$  e irmãos completos  $\theta_{xy}=0,25$ ). Neste caso, ao considerar então que a taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados apresentou valores que variaram de 0,7% a 3,6% (Tabela 9), o valor de  $f$  apresentado pelas sementes pode ser influenciado também pelas sementes de cruzamentos não endogâmicos, simplesmente pelo efeito de coancestria causado pela mãe em comum (MEDINA-MACEDO et al., 2016).

Foram encontradas divergências genéticas baixas, porém significativas entre as populações e coortes da área FSR e não significativas para área FECAV, conforme verificado pelos valores de  $F_{ST}$  (Tabela 7). Comparações par a par feitas para verificar diferenças na composição genética entre populações e coortes, demonstraram que as maiores diferenças genéticas se concentraram entre as áreas, tanto para adultos quanto para sementes, seguido de diferenças entre anos, verificado pela comparação entre coortes e por fim entre gerações. Todavia, as divergências genéticas encontradas entre as áreas avaliadas por este estudo foram menores que 4%, seguindo o mesmo padrão apresentado por diversas populações de *Araucaria angustifolia*, presentes no sul do Brasil, com valores de  $F_{ST}$  menores que 5%

(AULER et al., 2002; MONTAGNA et al., 2017; LAUTERJUNG et al., 2018). Além disso, cabe ressaltar que as diferenças entre locais podem ter tido um efeito do número de indivíduos amostrados (FECAV = 68; FSR = 187). No entanto, as divergências genéticas significativas entre as coortes de sementes das diferentes áreas, apesar de baixas foram verificadas possivelmente pelo elevado número amostral, o que indica que, embora pequenas, existem diferenças nas frequências alélicas nas plantas de *A. angustifolia* das diferentes áreas.

Apesar dos índices de diversidade genética não terem sido diferentes na comparação entre anos, os valores de FST, par a par, indicaram divergência genética entre as coortes dos diferentes anos (Tabela 8). Isso indica que há uma diferença na composição genética (frequência alélica) entre as coortes de sementes de diferentes anos. Adicionalmente esses resultados variam conforme o local avaliado. Contudo, as diferenças verificadas entre os anos, na área FSR, podem estar associadas a uma variação natural entre os diferentes eventos reprodutivos da espécie, o que pode caracterizar um efeito de deriva genética. Diferenças no fluxo gênico, e conseqüentemente no sucesso reprodutivo também podem estar associados e estas variações. Essa constatação demonstra que avaliar apenas uma estação reprodutiva pode trazer estimativas pouco precisas para estabelecer planos de conservação a longo prazo, principalmente quando se trata de espécies longevas (REIS, 1996; SMOUSE; SORK, 2004; SORK; SMOUSE, 2006; ALBALADEJO et al., 2009).

Diferenças entre gerações representou a menor parte das divergências genéticas encontradas, sendo verificado somente para área FSR (Tabela 8). Ainda, tais diferenças se concentraram na classe indeterminados. Isso sugere que esta classe pode ter uma contribuição menor na formação das coortes de sementes, possivelmente pela maior parte das plantas ainda não terem iniciado a fase reprodutiva. De acordo com o CAP médio das plantas da classe indeterminados (FSR = 70 cm; FECAV = 99 cm), é possível que grande parte destes estejam ainda em uma fase não reprodutiva, pois para *A. angustifolia*, o reduzido diâmetro das plantas desta classe indica que estes ainda não entraram na fase reprodutiva, e por isso concentram as maiores diferenças com coortes de sementes (ver PALUDO et al., 2016). Divergências genéticas significativas entre populações de adultos e coortes de sementes de *A. angustifolia*, também foram encontradas por Costa et al (2015) em populações presentes em áreas de campo.

Considerando que um mesmo conjunto de mães foi usado para coleta de sementes na área FSR, a presença de alelos exclusivos nas coortes de sementes de 2015, 2016 e 2017, demonstra que houve uma contribuição de alelos de origem paterna, diferente entre os anos. Isso também indica que essa contribuição é oriunda de fora da população analisada e isso pode contribuir para o aumento do tamanho efetivo das populações. Entretanto, a presença de alelos exclusivos na população de adultos demonstra que a coleta das sementes não amostrou todos os cruzamentos possíveis em todos os anos analisados. Alternativamente, nem todas as plantas adultas participaram dos eventos reprodutivos, nos diferentes anos. Novamente, esses resultados sugerem um efeito de deriva genética, associado a variações no fluxo gênico ao longo dos anos. Na área FSR, alelos exclusivos só foram encontrados na população de sementes, demonstrando que todos os alelos da população de adultos estavam contemplados na coorte de sementes de 2017. Este tipo de resultado não causa surpresa, uma vez que os adultos estão deixando a maior parte dos alelos nas coortes de sementes, que por sua vez, também recebem alelos de fora da população via migração.

#### **2.4.3 Estrutura genética espacial**

A estrutura genética espacial (SGS) pode ser entendida como a distribuição não aleatória dos genótipos na paisagem (VEKEMANS; HARDY, 2004). A presença de SGS em uma população, indica que plantas espacialmente mais próximas entre si tendem ser geneticamente mais próximas. Isso é caracterizado pela relação entre a distância espacial e genética (HARDY; VEKEMANS, 2002). Geralmente expressa em metros, uma aplicação prática da extensão da SGS seria na indicação de uma distância mínima a ser respeitada, entre plantas, visando a coleta de sementes. Se essa distância for respeitada, evitaria a coleta de sementes de indivíduos relacionados geneticamente entre si, e consecutivamente o reduzido tamanho efetivo (SEBBENN, 2006; DEGEN; SEBBENN, 2016).

A amplitude da escala da SGS encontrada em estudos realizados com *A. angustifolia* pode variar desde 0, isto é, ausência de SGS (STEFENON; GAILING; FINKELDEY, 2008; CRISTOFOLINI, 2013; COSTA, 2014) até 90 m (MEDINA-MACEDO et al., 2015). Essa variação pode ocorrer pela ação de diversos fatores, como densidade, distância de dispersão, sistema reprodutivo, histórico da população, efeito fundador, ação antrópica, entre outros (VEKEMANS; HARDY,

2004; BORN et al., 2008; MONTAGNA et al., 2019). De acordo com os correlogramas gerados, não foram encontrados valores de SGS significativos para ambas as áreas avaliadas. Isso indica que as distâncias par a par entre plantas não possuem relação com a estimativa de parentescos computadas ( $\theta_{xy}$  – Loiselle et al. 1995), em todas as classes de distâncias analisadas. Esse comportamento é diferente do comumente encontrado em outras populações de *A. angustifolia* (MANTOVANI; MORELLATO; REIS, 2006; BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; FERREIRA et al., 2012; SANT'ANNA et al., 2013). No entanto, todos estes estudos foram desenvolvidos com populações em ambientes de contínuos florestais, onde observa-se que a presença de estrutura genética interna é marcante, resultante principalmente da dispersão gravitacional das sementes perto da planta mãe (MEDINA-MACEDO et al., 2016).

Entretanto, estudos em paisagem de campo têm apresentado resultados de ausência de estrutura genética espacial (SGS) (CRISTOFOLINI, 2013, 2017; COSTA, 2014; o presente estudo). Isso sugere que em áreas mais abertas, como as paisagens de campo, os principais mecanismos que geram a estrutura interna da população (eg. fluxo de pólen e sementes e recrutamento de plântulas) estão sendo homogêneos (CHUNG et al., 2002), com comportamento da dispersão atingindo longas e curtas distâncias (RAMOS et al., 2018). Além disso, a ausência SGS, verificada em ambas as populações estudadas neste trabalho, pode ter ocorrido em função das baixas densidades de indivíduos, característica comum das paisagens de campo (Figura 3). Baixas densidades de árvores coespecíficas aumentam a distância entre cruzamentos realizados (ROBLEDO-ARNUNCIO et al., 2004; BACLES; ENNOS, 2008; WANG et al., 2010; VRANCKX et al., 2014), afetando diretamente a SGS. Apesar disso, a baixa densidade de indivíduos nem sempre está associada à ausência de SGS, pois, valores de SGS não significativos já foram encontrados por CHUNG et al. (2002) em populações de *Quercus acutissima* (Fagaceae) com elevadas densidades (157,2 árvores por ha, considerando diâmetros a altura do peito maiores do que 15 cm).

Em termos práticos, os resultados encontrados demonstram que não houve uma distância mínima a ser seguida para evitar a coleta de sementes em plantas próximos geneticamente entre si. Isso pode ser considerado favorável do ponto de vista do trabalho de coleta, de modo que menores distâncias entre plantas possam ser percorridas. Além disso, paisagens de campo, assim como as avaliadas no presente estudo,

podem ter outro ponto favorável na coleta de sementes, proporcionando a facilidade de locomoção e localização dos indivíduos, quando comparados com ambientes de floresta. Contudo, esses fatores aliados ao fato de que de maneira geral os índices de diversidade genética foram elevados e semelhantes entre adultos e coortes (Tabela 5), sugere-se que essas paisagens de campo são importantes fontes para coleta de sementes, para programas de melhoramento e para restauração de áreas degradadas.

#### 2.4.4 Sistema reprodutivo

A análise do sistema reprodutivo apresentou resultados semelhantes a outros estudos já realizados com *A. angustifolia* (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; FERREIRA et al., 2012; SANT'ANNA et al., 2013a; COSTA, 2014; MEDINA-MACEDO et al., 2016). Assim como o padrão típico para espécies dioicas, era esperado que a *A. angustifolia* não apresentasse uma taxa de cruzamento diferente da unidade (Tabela 9). Apesar disso, desvios em relação a unidade podem ocorrer inclusive para espécies dioicas como *A. angustifolia*, devido a ocorrência de cruzamentos entre indivíduos aparentados, conforme têm sido relatado em estudos para espécie (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; FERREIRA et al., 2012). Além disso, diferenças na proporção sexual podem favorecer a ocorrência de cruzamentos preferenciais e consequentemente aumentar os níveis de endogamia da população, padrão que não foi observado em ambas as populações avaliadas no presente estudo.

Estudos do sistema reprodutivo em plantas perenes geralmente são realizados em um único evento reprodutivo, apesar do fato de que estes podem não representar um quadro compreensivo do padrão do sistema reprodutivo (ALBALADEJO et al., 2009). Ainda não haviam sido relatadas diferenças significativas para estimativas do sistema reprodutivo de *A. angustifolia* para diferentes anos de avaliação. Esse fato pôde ser evidenciado, no presente trabalho, para seis das 14 estimativas avaliadas (Tabela 9). Além disso, a taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados da área FSR foi significativa para o ano de 2015 e não significativa para os anos de 2016 e 2017. Na área FECAV essa taxa foi significativa, na avaliação no ano de 2017. Isso sugere que os cruzamentos entre indivíduos aparentados ocorrem em diferentes intensidades de acordo com o local e o evento reprodutivo. Possivelmente, este resultado é afetado por a uma combinação de fatores

ambientais que variam entre anos e locais, bem como a configuração da paisagem. Assim, os resultados encontrados demonstram claramente que tão importante quanto avaliar locais diferentes é realizar a avaliação em anos diferentes, para assim se obter informações robustas acerca do comportamento do sistema reprodutivo da espécie, e da combinação dos cruzamentos que ocorrem na população ao longo dos anos, principalmente quando se trata de espécies longevas.

A estimativa da correlação de paternidade ( $\hat{r}_p$ ) e, conseqüentemente, do número efetivo de doadores de pólen ( $N_{ep}$ ), estimada no software MLTR, é considerada uma medida indireta. Neste caso, com base nos genótipos de progênies de diferentes plantas mãe é utilizado uma modelagem para deduzir a fração de pares de irmãos dividindo o mesmo pai. Assim, estimativas do número efetivo de doadores de pólen podem ser obtidas sem identificar precisamente o pai de cada semente (IRWIN et al., 2003). Embora menos precisa que técnicas baseadas em determinação de paternidade, esta forma de estimativa utilizada no presente estudo é uma abordagem muito mais conveniente de ser aplicada (amostragem não exaustiva) (HARDY et al., 2004), e também muito mais comum. A correlação de paternidade é uma estimativa que revela a contribuição dos doadores de pólen para formação das sementes. Essa estimativa também diferiu significativamente entre os anos avaliados, variando de 0,027 a 0,122.

No presente estudo, foi possível perceber que houve um maior número de pais envolvidos na formação das coortes de sementes em 2016, do que nos anos de 2015 e 2017. Para o ano de 2016, o número efetivo de doadores de pólen ( $N_{ep} = 41$ ) foi cerca de quatro vezes maior do que 2015 ( $N_{ep} = 10$ ) e cerca de três vezes maior do que 2017 ( $N_{ep} = 14$ ). Essas diferenças demonstram que a variação da contribuição dos pais para formação das sementes não é aleatória ao longo dos anos. Assim, um conjunto maior de pais contribuindo para formação das sementes pode aumentar as chances de manutenção dos alelos na população e, assim, aumentar o tamanho efetivo.

Foi possível notar que algumas vezes o valor de  $N_{ep}$  encontrado, é maior do que o valor real possível para uma planta mãe. Pois, enquanto que o número máximo de sementes coletadas por planta mãe foi de 25, o  $N_{ep}$  encontrado atingiu valores de 41. Isso pode ser explicado por um possível efeito de cálculo onde a composição genética encontrada nas sementes representa um tamanho efetivo de doadores de pólen maior do que o valor amostrado. Outros trabalhos também encontraram, para o número efetivo de doadores de pólen, valores acima do número máximo

de sementes analisadas (FERREIRA et al., 2012; VRANCKX et al., 2014). Embora, em alguns casos esse valor não represente o valor real possível, essa estimativa apresenta uma importante informação a nível de população, pela possibilidade de comparação do pool de pais envolvidos na formação das progênes. Isso significa dizer qual o número efetivo de pais que a composição genética das sementes analisadas representa.

Além das estimativas do sistema reprodutivo, diferenças significativas entre os anos foram encontradas também para as estimativas de endogamia e estrutura (Tabela 9). Dentre estas, evidenciam-se as diferenças na proporção de meio irmãos ( $P_{hs}$ ), proporção de irmãos completos ( $P_{fs}$ ), coeficiente médio de coancestria dentro das famílias ( $\Theta$ ), tamanho efetivo da variância ( $N_{e(v)}$ ) e o número de árvores para coleta de sementes, para um número de referência de 150 ( $m$ ). Essas diferenças demonstram que a composição genética das sementes varia conforme o evento reprodutivo, novamente caracterizando um efeito de deriva genética, assim como verificado para os índices de diversidade genética. Ainda as sementes avaliadas, em geral, são uma mistura de irmãos completos e meio irmãos, com uma composição de aproximadamente 90% de meio irmãos.

Como o número de plantas mãe para coleta de sementes, necessário para reter um tamanho efetivo de uma população referência ( $N_{e(r)}$ ) de 150 ( $pm$ ) variou de 42 a 49 entre os anos, sugere-se que o maior dos valores seja utilizado em planos de coleta, garantindo que se atinja sempre o  $N_{e(r)}$  necessário. Um  $N_{e(r)}$  de 100 é esperado evitar depressão por endogamia a curto prazo (cinco gerações), enquanto que um  $N_{e(r)}$  de 1000 é requerido para inicialmente manter a perpetuação do potencial evolutivo (FRANKHAM; BRADSHAW; BROOK, 2014). Em estudos envolvendo a *A. angustifolia* os valores de  $m$  (considerando um  $N_{e(r)}$  de 150), podem variar de 38 (FERREIRA et al., 2012) a 60 (SALGUEIRO et al., 2005), para marcadores alozímicos e microssatélites. Em estudos com marcadores microssatélites esses valores podem variar de 39 (CRISTOFOLINI, 2017) a 52 (BITTENCOURT; SEBBENN, 2008), valores similares aos encontrados no presente estudo. Com base nesses resultados, a coleta de 50 plantas, na maioria dos casos, seria suficiente para reter um tamanho efetivo equivalente a uma população com  $N_{e(r)}$  de 150. Além disso, para fins de coleta de sementes visando a manutenção da variabilidade genética, recomenda-se que a coleta envolva diferentes anos. Essa prática não só é capaz de aumentar a representatividade dos alelos da população, como

também pode evitar possíveis efeitos da exogamia, quando é introduzido material genético de outras populações, não adaptados a região (ELLSTRAND; ELAM, 1993).

## 2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados neste estudo demonstram como a composição genética de coortes de sementes e a interpretação dos padrões de movimentação de alelos ao longo dos anos podem sofrer modificações. Tais modificações são possivelmente ocasionadas por características do ambiente como relevo e posição das plantas na paisagem, bem como sua associação com variáveis ecológicas e climáticas, as quais possuem maiores oscilações anuais do que simplesmente a fragmentação e as distâncias físicas entre as plantas. Os principais índices de diversidade são menos sensíveis para detectar variações que ocorrem entre diferentes eventos reprodutivos do que parâmetros do sistema reprodutivo. Mudanças nos padrões reprodutivos podem influenciar diretamente a variação genética na progênie e, principalmente, podem refletir em custos de adaptabilidade que comprometem o recrutamento de plantas na próxima geração (NORA; APARICIO; ALBALADEJO, 2016). Dessa forma, é importante ressaltar que as diferenças encontradas entre os anos de avaliação devem ser consideradas ao realizar estudos que envolvam diversidade genética e sobretudo a análise do sistema reprodutivo. Uma vez que as informações geradas têm implicações diretas no estabelecimento de estratégias de manejo e conservação da espécie estudada e do ecossistema a que pertence. Principalmente quando estas informações são utilizadas para recomendar um número de árvores para coleta de sementes para programas de melhoramento e conservação.

À luz dos resultados gerados acerca da diversidade genética sugere-se que estratégias de conservação *in situ* para espécie devam considerar não somente grandes maciços de floresta com *A. angustifolia*, mas também paisagens de campo, em pequena e larga escala, ou seja, pequenos fragmentos e árvores isoladas distribuídas ao longo da paisagem. Todavia, a conservação da paisagem como um todo, considerando esses dois ambientes é extremamente importante. Pois, ao mesmo tempo que pequenos fragmentos ou árvores isoladas podem ligar grandes remanescentes espacialmente isolados, através do fluxo gênico, estes são favorecidos pelo aumento no tamanho efetivo da população, de maneira geral. Entretanto, o sucesso na reprodução de pequenos

fragmentos ou até mesmo árvores “isoladas” irá depender em grande parte da conservação da paisagem em larga escala. Considerando o exposto, pode-se dizer que as características genéticas e evolutivas destas populações obviamente estão adaptadas a condições locais de baixas densidades como ocorre nas paisagens de campo. Isso porque, a configuração da paisagem potencialmente permite um amplo fluxo gênico, capaz de neutralizar efeitos de mutação, deriva e seleção (ELLSTRAND, 2014). Assim, esses processos capazes de moldar a evolução das espécies têm sido o alvo de estudo da comunidade científica por muito tempo e, por isso, o presente estudo aborda de diversas maneiras os efeitos de alguns desses processos (e.g. efeitos de deriva verificados no presente capítulo; o fluxo gênico verificado no capítulo II; as mutações analisadas no capítulo IV).

Para fins de conservação *ex situ* e programas de melhoramento da espécie recomenda-se que a coleta de sementes seja feita ao longo dos anos, em árvores presentes em paisagens de campo. A razão baseia-se no fato de que estas áreas apresentam elevados níveis de diversidade genética nas coortes de sementes, baixo nível de parentesco entre plantas adultas, ausência de estrutura genética espacial e baixa divergência populacional entre gerações. Além disso, as referidas áreas apresentam características de fácil locomoção e localização das plantas de *Araucaria angustifolia* para coleta de amostras.

## 2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBALADEJO, R. G.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C.; HEUERTZ, M.; VENDRAMIN, G. G.; APARICIO, A. Spatiotemporal mating pattern variation in a wind-pollinated Mediterranean shrub. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 24, p. 5195–5206, 2009.

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; DE MORAES GONÇALVES, J. L.; SPAROVEK, G. Köppen’s climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.

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**, v. 25, n. 3, p. 329–338, 2002.

BACLES, C. F. E.; ENNOS, R. a. Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior* L. in a chronically fragmented landscape. **Heredity**, v. 101, n. 4, p. 368–380, 2008.

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

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Pollen movement within a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TwoGener analysis. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 4, p. 855–868, set. 2008.

BORN, C.; HARDY, O. J.; CHEVALLIER, M.-H.; OSSARI, S.; ATTÉKÉ, C.; WICKINGS, E. J.; HOSSAERT-MCKEY, M. Small-scale spatial genetic structure in the Central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana* : a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 8, p. 2041–2050, abr. 2008.

BRAGA, A. C.; COLLEVATTI, R. G. Temporal variation in pollen dispersal and breeding structure in a bee-pollinated Neotropical tree. **Heredity**, v. 106, n. 6, p. 911–919, 2011.

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**, v. 89, n. 8, p. 1229–1236, 2002.

COCKERHAM, C. C. **Variance of Gene Frequencies**. *Evolution*, v. 23, n. 1, p. 72, mar. 1969.

COSTA, N. C. F. da. **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. Universidade do Estado de Santa Catarina, 2014.

COSTA, N. C. F.; GUIDOLIN, A. F.; VARGAS, O. F.; MANTOVANI, A. Efeitos da paisagem de campo e florestamento com

Pinus na diversidade e estrutura genética de pequenas populações remanescentes de *Araucaria angustifolia*. **Scientia Forestalis**, v. 43, n. 107, p. 551–560, 2015.

CRISTOFOLINI, C. **Dinâmica da diversidade genética de *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) Kuntze em paisagem de campo no estado de santa catarina**. 2013. Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

CRISTOFOLINI, C. **Dinâmica da diversidade genética de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em campo e floresta no Sul do Brasil**. 2017. Universidade Federal de Santa Catarina - Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2017.

DA SILVA CARNEIRO, F.; MAGNO SEBBENN, A.; KANASHIRO, M.; DEGEN, B. Low interannual variation of mating system and gene flow of *Symphonia globulifera* in the Brazilian Amazon. **Biotropica**, v. 39, n. 5, p. 628–636, 2007.

DE-LUCAS, A. I.; ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; HIDALGO, E.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C. Mating system and pollen gene flow in Mediterranean maritime pine. **Heredity**, v. 100, n. 4, p. 390–399, 2008.

DEGEN, B.; SEBBENN, A. M. Genetics and tropical forests. In: PANCEL, L.; KÖHL, M. (Ed.). **Tropical Forestry Handbook**. 2nd. ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2016. p. 885–920.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13–15, 1990.

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 systems in a changing world. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 1, p. 35–43, jan. 2010.

ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant

Conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 217–242, 1993.

FERREIRA, D. K.; NAZARENO, A. G.; MANTOVANI, A.; BITTENCOURT, R.; SEBBENN, A. M.; DOS REIS, M. S. Genetic analysis of 50-year old Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) plantations: Implications for conservation planning. **Conservation Genetics**, v. 13, n. 2, p. 435–442, nov. 2012.

FRANKHAM, R.; BRADSHAW, C. J. A.; BROOK, B. W. Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. **Biological Conservation**, v. 170, p. 56–63, 2014.

GARCÍA, C.; ARROYO, J. M.; GODOY, J. A.; JORDANO, P. Mating patterns, pollen dispersal, and the ecological maternal neighbourhood in a *Prunus mahaleb* L. population. **Molecular ecology**, v. 14, n. 6, p. 1821–30, maio 2005.

GOUDET, J. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)**. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995), 2001. .

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T. a. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4(1), n. 1, p. 1–9, 2001.

HARDY, O. J.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C.; COLAS, B.; FRÉVILLE, H.; MIGNOT, A.; OLIVIERI, I. Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae). II. Correlated paternity within and among sibships. **Genetics**, v. 168, n. 3, p. 1601–1614, 2004.

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 618–620, 2002.

IRWIN, A. J.; HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; SMOUSE, P. E. A multiyear estimate of the effective pollen donor pool for *Albizia julibrissin*. **Heredity**, v. 90, n. 2, p. 187–194, 2003.

KLEIN, R. M. **Mapa fitogeográfico do estado de Santa Catarina**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1978.

LACERDA, A. E. B.; ROSOT, M. A. D.; FILHO, A. F.; GARRASTAZÚ, M. G.; NIMMO, E. R.; BETINA, K.; RADOMSKI, M.I. BEIMGRABEN, T.; MATTOS, P. P.; OLIVEIRA, Y. M. M. Sustainable forest management in rural Southern Brazil: exploring participatory forest management planning. In: MARTIN-GARCIA, J.; DIEZ, J. J. (Ed.). **Sustainable Forest Management - Case Studies**. [s.l.] InTech, 2012. p. 97–118.

LAUTERJUNG, M. B.; BERNARDI, A. P.; MONTAGNA, T.; CANDIDO-RIBEIRO, R.; DA COSTA, N. C. F.; MANTOVANI, A.; DOS REIS, M. S.; CLÓVIS, N.; MANTOVANI, A.; SEDREZ, M. Phylogeography of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*): integrative evidence for pre-Columbian anthropogenic dispersal. **Tree Genetics & Genomes**, v. 14, n. 3, p. 36, 2018.

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**, v. 82, n. 11, p. 1420–1425, 1995.

LOWE, A. J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C. F. E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, v. 95, n. 4, p. 255–273, 2005.

LOWE, A. J.; CAVERS, S.; BOSHIER, D.; BREED, M. F.; HOLLINGSWORTH, P. M. The resilience of forest fragmentation genetics—no longer a paradox—we were just looking in the wrong place. **Heredity**, v. 115, n. 2, p. 97–99, 2015.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and Analysis of Quantitative Traits**. [s.l.] Sinauer, 1998.

MANOEL, R. O.; FREITAS, M. L. M.; JÚNIRO, E. F.; ALVES, P. F.; MORAES, M. L. T.; SEBBENN, A. M. Individual, fruit, and annual variation in correlated mating in a *Genipa americana* population. **Silvae Genetica**, v. 64, n. 3, p. 108–116, 2015.

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

MATTOS, J. R. **O pinheiro brasileiro**. 1 ed ed. Florianópolis: Editora UFSC, 2011.

MEDINA-MACEDO, L.; DE LACERDA, A. E. B.; SEBBENN, A. M.; RIBEIRO, J. Z.; SOCCOL, C. R.; BITTENCOURT, J. V. M. Using genetic diversity and mating system parameters estimated from genetic markers to determine strategies for the conservation of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae). **Conservation Genetics**, v. 17, n. 2, p. 413–423, 2016.

MONTAGNA, T.; GASPER, A. L. de; OLIVEIRA, L. Z.; LINGNER, D. V.; AGUIAR, M. D. de; SCHORN, L. A.; BERNARDI, A. P.; MATTOS, A. G.; STEINER, F.; SILVA, J. Z. da; HOELTGEBAUM, M. P.; LAUTERJUNG, M. B.; COSTA, N. C. F. da; CANDIDO-RIBEIRO, R.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. dos; VIBRANS, A. C. Situação atual e recomendações para conservação de 13 espécies de alto valor para uso e conservação no estado de Santa Catarina. In: GASPER, A. L. DE; OLIVEIRA, L. Z.; LINGNER, D. V.; VIBRANS, A. C. (Ed.). **Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina**, Vol. VII, Espécies arbóreas raras de Santa Catarina. Blumenau: Edifurb, 2018. p. 159–241.

MONTAGNA, T.; LAUTERJUNG, M. B.; COSTA, N. C. F. da; BERNARDI, A. P.; CANDIDO-RIBEIRO, R.; REIS, M. S. dos. Guidelines for seed collection of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze: A genetic, demographic and geographic approach. **Forest Ecology and Management**, v. 438, p. 10–17, abr. 2019.

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

NORA, S.; APARICIO, A.; ALBALADEJO, R. G. High correlated paternity leads to negative effects on progeny performance in two mediterranean shrub species. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–15, 2016.

PALUDO, G. F.; DUARTE, R. I.; BERNARDI, A. P.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. The size of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze entering into reproductive stages as a basis for seed management projects. **Revista Árvore**, v. 40, n. 4, p. 695–705, 2016.

PAQUETTE, S. R. **PopGenKit: Useful functions for (batch) file conversion and data resampling in microsatellite datasets**. R package version 1.0, 2012. .

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 1 out. 2012.

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**, v. 100, n. 6, p. 1095–1101, 2013.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>. Vienna, Austria, 2015. .

RAMOS, S. L. F.; DEQUIGIOVANNI, G.; SEBBENN, A. M.; LOPES, M. T. G.; MACÊDO, J. L. V. de; VEASEY, E. A.; ALVES-PEREIRA, A.; SILVA, P. P. da; GARCIA, J. N.; KAGEYAMA, P. Y. Paternity analysis, pollen flow, and spatial genetic structure of a natural population of *Euterpe precatoria* in the Brazilian Amazon. **Ecology and Evolution**, v. 8, n. 22, p. 11143–11157, 2018.

REIS, M. S. Dinamica da movimentação de alelos: subsidios para conservação e manejo de populações naturais em plantas. **Brasilian Journal of genetcs**, 1996.

REITZ, R.; KLEIN, R. M. R. M.; REIS, A. Projeto Madeira de Santa Catarina. **Sellowia**, v. 28–30, n. 28–30, 1978.

RIPLEY, B. D. The Second-Order Analysis of Stationary Point Processes. **Journal of Applied Probability**, v. 13, n. 2, p. 255, jun. 1976.

RIPLEY, B. D. Tests of 'Randomness' for Spatial Point Patterns. **Journal of the Royal Statistical Society**. Series B (Methodological), v. 41, n. 3, p. 368–374, 1979.

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, v. 43, n. 4, p. 848–859, 1989.

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity**, v. 88, n. 4, p. 221–228, abr. 2002.

ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; SMOUSE, P. E.; GIL, L.; ALÍA, R. Pollen movement under alternative silvicultural practices in native populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in central Spain. **Forest Ecology and Management**, v. 197, n. 1–3, p. 245–255, 2004.

ROCHA, O. J.; AGUILAR, G. Variation in the breeding behavior of the dry forest tree *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) in Costa Rica. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 9, p. 1600–1606, 2001.

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

SANT'ANNA, C. S.; SEBBENN, A. M.; KLABUNDE, G. H. F.; BITTENCOURT, R.; NODARI, R. O.; MANTOVANI, A.; DOS REIS, M. S. Realized pollen and seed dispersal within a continuous population of the dioecious coniferous Brazilian pine [*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze]. **Conservation Genetics**, v. 14, n. 3, p. 601–613, 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**, v. 7, n. 2, p. 340–342, mar. 2007.

SCOTT, L. J.; SHEPHERD, M.; HENRY, R. J. Characterization of highly conserved microsatellite loci in *Araucaria cunninghamii* and related species. **Plant Systematics and Evolution**, v. 236, n. 3/4, p. 115–123, 2003.

SEBBENN, A. M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, v. 14, n. 2, p. 115–132, 2002.

SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. D. (Ed.). **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba: FUPEF, 2006. p. 93–138.

SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; DA SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, v. 106, n. 1, 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**, v. 197, n. 1–3, p. 21–38, ago. 2004.

SORK, V. L.; SMOUSE, P. E. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. **Landscape Ecology**, v. 21, n. 6, p. 821–836, ago. 2006.

SOUSA, V. A.; SEBBENN, A. M.; HATTEMER, H. H.; ZIEHE, M. Correlated mating in populations of a dioecious Brazilian conifer, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Forest Genetics**, v. 12, n. 2, p. 107–119, 2005.

STEFENON, V. M.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. The role of gene flow in shaping genetic structures of the subtropical conifer species *Araucaria angustifolia*. **Plant Biology**, v. 10, n. 3, p. 356–364, 2008.

THOMAS, P. *Araucaria angustifolia*. The IUCN Red List of Threatened Species.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 4, p. 921–935, abr. 2004.

VRANCKX, G.; MERGEAY, J.; COX, K.; MUYS, B.; JACQUEMYN, H.; HONNAY, O. Tree density and population size affect pollen flow and mating patterns in small fragmented forest stands of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). **Forest Ecology and Management**, v. 328, p. 254–261, 2014.

WANG, H.; SORK, V. L.; WU, J.; GE, J. Effect of patch size and isolation on mating patterns and seed production in an urban population of Chinese pine (*Pinus tabulaeformis* Carr.). **Forest Ecology and Management**, v. 260, n. 6, p. 965–974, ago. 2010.

WARD, M.; DICK, C. W.; GRIBEL, R.; LOWE, A. J. To self, or not to self... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. **Heredity**, v. 95, n. 4, p. 246–254, 10 out. 2005.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, n. 2, p. 97, 1931.

ZECHINI, A. A.; LAUTERJUNG, M. B.; CANDIDO-RIBEIRO, R.; MONTAGNA, T.; BERNARDI, A. P.; HOELTGEBAUM, M. P.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. dos. Genetic conservation of brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) through traditional land use. **Economic Botany**, v. 72, p. 1–14, 2018.



### 3 CAPÍTULO II – PATERNIDADE DE SEMENTES E FLUXO DE PÓLEN EM *Araucaria angustifolia*: UMA COMPARAÇÃO ENTRE ANOS E ENTRE LOCAIS

#### 3.1 INTRODUÇÃO

A remoção da floresta e a alteração da vegetação nativa, por meio da agricultura, pastoreio e reflorestamento com espécies exóticas, têm mudado claramente a paisagem original do Sul do Brasil (BEHLING et al., 2009). Esta paisagem, que é caracterizada por mosaicos de vegetação de campos e Floresta com Araucária (IRIARTE; BEHLING, 2007), está sob forte pressão de uso, onde vastas áreas de campo estão sendo substituídas por atividades agrícolas e silvícolas (BEHLING et al., 2009). Apesar destas áreas pertencerem ao bioma Mata Atlântica, considerado um dos cinco “hottest hotspot” prioritários para conservação (MYERS et al., 2000; MITTERMEIER et al., 2011), o impacto das modificações antrópicas nestas paisagens têm sido muitas vezes negligenciado.

A presença da *Araucaria angustifolia* O. Kuntze, uma espécie de conífera predominantemente dioica e polinizada pelo vento é comum na paisagem, principalmente ao longo de rios e encostas, ou na forma de pequenos fragmentos (capões) ou árvores isoladas, intercalados a vegetação campestre (KLEIN, 1978; MATTOS, 2011). Embora o pólen da *A. angustifolia* seja transportado pelo vento, autores consideram este ser de baixa capacidade de flutuar, por ser grande e não ser alado, o que poderia limitar a sua dispersão principalmente em áreas com altas densidades vegetais típicas de florestas com Araucária (SOUSA; HATTEMER, 2003). Por possuir um pólen Estudos prévios demonstram que modificações antrópicas em paisagens de campo tendem a causar alterações nas taxas de fluxo de pólen de populações fragmentadas de *Araucaria angustifolia*, bem como nos índices de diversidade e estrutura genética entre gerações (BITTENCOURT; SEBBENN, 2008; COSTA et al., 2015). Adicionalmente, análises da variabilidade genética de populações remanescentes de espécies longevas e com amplo fluxo gênico como *A. angustifolia*, podem não representar os efeitos contemporâneos da fragmentação na diversidade genética (BITTENCOURT; SEBBENN, 2009; BREED et al., 2015), principalmente pelas avaliações serem realizadas somente uma única vez.

Neste sentido, estratégias de conservação preventivas exigem um melhor entendimento das variações do fluxo gênico contemporâneo em um ambiente em mudança (KOKKO; LÓPEZ-SEPULCRE, 2007), bem como uma análise de como os aspectos genéticos populacionais operam no espaço e no tempo ecológico (BACLES; ENNOS, 2008). Medidas diretas do fluxo gênico histórico e atual permitem identificar a magnitude e a escala espacial em que as forças evolutivas podem atuar sobre as populações e, portanto, podem ajudar no manejo das espécies e na tomada de decisões políticas diante das alterações antropogênicas de habitat (HAHN; MICHALSKI; DURKA, 2017). No entanto, o fluxo gênico em plantas é muito peculiar, sendo altamente variável entre espécies, populações e estações (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996a), e o impacto dessa variação irá depender do nível de variação genética, organização espacial e conformação das populações (fonte e dreno) (ELLSTRAND; ELAM, 1993). Além disso, o fluxo gênico é componente importante da dinâmica genética contínua dentro da população; por isso a investigação de mais de dois anos de fluxo gênico é necessária para entender em detalhes os mecanismos que mantêm a variabilidade genética das populações (OTTEWELL et al., 2012).

Árvores isoladas e pequenos fragmentos apresentam um papel chave, não apenas por serem elementos geneticamente funcionais na população, mas também por servirem como trampolins para dispersão de pólen a longas distâncias em paisagens fragmentadas (LOWE et al., 2005; LANDER; BOSHIER; HARRIS, 2010). Esta visão vai além da hipótese de Janzen (JANZEN, 1986), de que árvores isoladas são somente “mortos vivos”, persistindo em virtude de sua longevidade, e que árvores remanescentes deixadas em pastagens não têm potencial reprodutivo e são de pouco valor para conservação (LOWE et al., 2005; ASHLEY, 2010).

Por possuir o potencial de transportar gametas masculinos a longas distâncias, a dispersão por pólen é capaz de contrapor os efeitos do “isolamento” de genes em populações espacialmente isoladas (ENNOS, 1994). Assim, o estudo da variação temporal na distância de dispersão de pólen é altamente importante para planos de conservação e para entendimento das características evolutivas da população (BRAGA; COLLEVATTI, 2011). Apesar disso, o fluxo gênico mediado pelo pólen em populações naturais de *Araucária angustifolia* em paisagens de campo ainda não foi examinado em termos de diferentes anos de avaliação.

Dessa maneira, o presente estudo teve por objetivos avaliar a dinâmica espaço temporal do fluxo de pólen, por meio da quantificação das variações da troca genética mediada pelo pólen, e verificar a variação causada pela diferença da distância entre árvores na distribuição de frequência da movimentação de pólen em uma população de *Araucaria angustifolia*. Para isso, foram testadas as seguintes hipóteses: I - Existe diferença na taxa de movimentação de pólen de *Araucaria angustifolia* para eventos reprodutivos de anos diferentes, em razão da movimentação do pólen ser realizada pelo vento e este ser um fenômeno variável temporalmente; II - Existe relação inversa entre a taxa de migração de pólen de *Araucaria angustifolia* e a distância entre as árvores, devido as características da polinização pelo vento favorecer a movimentação do pólen entre plantas localizadas mais próximos; III - O sucesso reprodutivo de plantas de *Araucaria angustifolia* é variável na população e também ao longo dos anos, por este ser um fenômeno que varia de acordo com o indivíduo.

## 3.2 MATERIAL E METODOS

### 3.2.1 Análises de paternidade

#### 3.2.1.1 Análises de paternidade direta

Nas análises de paternidade foram utilizadas as amostras coletadas e processadas conforme descrito no Capítulo I deste documento (itens 2.2.3 a 2.2.5). Nestas análises foram utilizados todos as plantas classificadas como machos, a planta monoica e também as plantas que não apresentaram estrutura reprodutiva no momento das avaliações (indeterminados), para assegurar que essas plantas pudessem ser incluídas como pais potenciais das sementes. A análise de paternidade para cada semente coletada foi realizada pela atribuição de máxima-probabilidade de paternidade (*maximum likelihood paternity assignment*) (MEAGHER, 1986; MEAGHER; THOMPSON, 1986). A atribuição foi aferida pela comparação dos genótipos multilocos, das plantas reprodutivas e sementes, com auxílio do programa CERVUS 3.0 (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007). Os genótipos foram obtidos conforme descrito na seção Material e Métodos do Capítulo I (itens 2.2.4 e 2.2.5). Foram empregadas como referência as frequências alélicas estimadas apenas na geração parental (MEAGHER; THOMPSON, 1986). Os alelos imigrantes, detectados nas

sementes e que não se encontravam na população adulta reprodutiva, tiveram sua frequência estimada e adicionada ao arquivo de referência das frequências alélicas.

O pai mais provável de cada semente foi determinado pelo valor de  $\Delta$  (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007). 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. O valor crítico de  $\Delta$ , foi atribuído por simulações usando 1000 repetições, conduzidas com 0,01 como sendo a proporção de erros de digitação e 0,98 como percentagem de locos digitados. O número de candidatos a pai para cada semente incluiu 65 plantas classificadas como macho e mais 53 plantas classificadas como indeterminado, totalizando 118 supostos pais. Foram utilizados para os intervalos de confiança 95% como restrito e 80% como relaxado, assim como sugerido por Marshall et al. (1998).

### 3.2.2 Número efetivo de doadores de pólen e sucesso reprodutivo por pai

Para as coortes de sementes avaliadas foi estimado o número efetivo de doadores de pólen a partir das paternidades detectados por análise de paternidade, como sendo  $N_{ep} = 1/\sum_{i=1}^{np} p_i^2$ , onde  $n_p$  é o número de sementes analisadas e  $p_i$  é a proporção de sementes geradas pelo pai  $i$  (BURCZYK; ADAMS; SHIMIZU, 1996b). O sucesso reprodutivo de cada indivíduo masculino foi calculado pela expressão:  $s_{rp} = np_i/nd$  onde  $np_i$  é número de sementes polinizadas pelo pai  $i$  e  $nd$  é número total de sementes com o doador de pólen determinado. Após isso, correlações entre sucesso reprodutivo de indivíduos tidos como pai com a variável distância média de movimentação de pólen foram executadas, para verificar se indivíduos considerados mais isolados têm menores efetividades no fluxo de pólen. Além disso, foram conduzidos testes de correlação entre o sucesso reprodutivo dos pais e o diâmetro, afim de verificar se indivíduos maiores possuem maior sucesso reprodutivo. Valores médios dos diâmetros dos indivíduos das áreas FSR e FECAV são apresentados no Anexo 1.

A diversidade de pais encontrados para as sementes com paternidade atribuída, foi verificada pelo Índice de Shannon, com equabilidade verificada pelo Índice de Pielou (HARPER, 1999). Para verificar a variação no sucesso reprodutivo foi realizada uma análise

descritiva do número de sementes com paternidade determinada (NSPD) para cada doador de pólen, bem como, para os 10 indivíduos machos que tiverem o maior sucesso reprodutivo dentre os putativos doadores de pólen analisados.

### 3.2.3 Fluxo de pólen e distâncias de polinização

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.

Como todos os machos e fêmeas de dentro da parcela tiveram o seu genótipo determinado e sua posição espacial conhecida, as sementes com o pai determinado foram utilizadas para determinar as distâncias efetivas mínima, máxima e média de dispersão de pólen, calculadas a partir distância geográfica (euclidiana) entre a planta mãe e o pai determinado. Na investigação sobre a existência de diferenças nas distâncias médias de polinização das coortes de sementes avaliadas, foram realizadas comparações dos intervalos de confiança, construídos para as médias dos valores de distância de cada coorte (a 95% de significância), calculados no programa PAST 3.0 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

Nos casos em que o putativo pai não foi determinado, não foi possível calcular a distância do pólen, pelo fato do doador de pólen estar fora da amostra. Sendo assim, a taxa de imigração de pólen ( $\hat{m}$ ) foi então calculada como a proporção de sementes que não tiveram um candidato a pai determinado dentro da parcela, ( $n_{imigrante}$ ) em relação ao total de sementes genotipadas ( $n_{total}$ ) dentro da população,  $\hat{m} = \hat{n}_{imigrante}/n_{total}$  (BURCZYK; DIFAZIO; ADAMS, 2004).

A partir das sementes com paternidade determinada foi feita uma análise descritiva para as variáveis de distância de polinização e taxa de imigração de pólen por planta mãe. Para verificar a estrutura das famílias também foram feitas análises descritivas para o número efetivo de doadores por planta mãe e por população.

A área de vizinhança efetiva de polinização ( $A_{ep}$ ) foi calculada tomando-se uma área circular em torno da árvore planta mãe,  $A_{ep} =$

$4\pi\sigma^2$  (LEVIN, 1988), onde  $\sigma^2$  é a variância da dispersão axial de pólen. É importante notar que o parâmetro  $A_{ep}$  corresponde a área circular em que 63,2% a 86,5% dos doadores de pólen, que fertilizaram a planta mãe, devam estar localizados (LEVIN, 1988). O raio de polinização circular foi estimado como  $r_{ep} = \sqrt{A_{ep}/3,1415}$  (AUSTERLITZ; SMOUSE, 2001).

### 3.2.4 Distribuição das distâncias de polinização

Para comparar os resultados da distribuição de frequências de distâncias dos cruzamentos potenciais, aqui denominada de polinização potencial, com a distribuição de frequências de distâncias dos cruzamentos realizados, encontradas pela análise de paternidade, denominadas de polinização efetiva, foi utilizado o teste de *Komogorov-Smirinov* (PRESS et al., 1992), com significância do teste estimada de com 9999 permutações. Foram realizados análises de correlação de Pearson para verificar possíveis associações entre as variáveis de fluxo de pólen. Neste caso, as variáveis testadas foram: 1) distância média de movimentação de pólen por planta mãe; 2) número efetivo de doadores de pólen e 3) distância média para cruzamentos potenciais. Essas análises foram computadas no programa PAST 3.0 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

## 3.3 RESULTADOS

### 3.3.1 Determinação de paternidade e fluxo de pólen

Das 1598 sementes submetidas ao teste de paternidade, foram encontrados os pais de 184 sementes para 2015 FSR, 192 para 2016 FSR, 206 para 2017 FSR e 116 para 2017 FECAV. Os números de sementes com pai determinado para cada planta mãe com as respectivas medidas descritivas de movimentação de pólen estão sumarizados nas Tabelas 10, 11, 12, 13 e 14. O fluxo gênico críptico ( $FG_c$ ) encontrado para as análises de paternidade realizadas foi de  $5,36 \times 10^{-7}$  para 2015 FSR,  $3,87 \times 10^{-7}$  para 2016 FSR, de  $4,9 \times 10^{-7}$  para 2017 FSR e  $1,03 \times 10^{-6}$  para 2017 FECAV. Todas as atribuições de paternidade computadas pelo programa CERVUS 3.0 ficaram dentro do nível de confiança restrito (95%).

Tabela 10 - Número de sementes com paternidade determinada (NPD), Taxa de imigração de pólen ( $\hat{m}$ ), Distância média de movimentação do pólen ( $D\bar{y}$ ), Desvio padrão (DP), Distância máxima de fluxo de pólen ( $D_{\text{máx}}$ ), Distância mínima de fluxo de pólen ( $D_{\text{mín}}$ ) e Intervalos de confiança Superior e Inferior (IC.Inf/IC.Sup.), de 16 plantas de uma população de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo (FSR), avaliadas em 2015, no município de Lages-SC.

Planta mãe	NPD	$\hat{m}$	$D\bar{y}$ (m)	DP	$D_{\text{máx}}$ (m)	$D_{\text{mín}}$ (m)	IC.Inf.	IC.Sup.
Aa1	3	0,88	218,2	92,68	274,23	111,20	113,30	323,06
Aa2	14	0,44	81,1	147,59	540,87	10,85	3,78	158,41
Aa3	10	0,60	54,1	124,48	408,32	12,33	-23,09	131,22
Aa4	19	0,24	61,1	160,91	544,40	7,36	-11,30	133,41
Aa5	22	0,12	30,6	100,84	482,05	9,08	-11,55	72,72
Aa6	16	0,36	36,4	52,55	226,17	4,76	10,64	62,14
Aa7	14	0,44	43,5	52,03	212,63	8,61	16,25	70,76
Aa8	5	0,80	229,2	140,37	394,89	118,96	106,12	352,20
Aa9	10	0,60	236,6	57,92	314,73	164,17	200,71	272,51
Aa10	7	0,72	208,1	222,51	450,36	26,59	43,26	372,93
Aa11	9	0,64	230,7	228,67	552,89	5,56	81,27	380,08
Aa12	2	0,92	262,8	316,54	486,63	38,98	-175,89	701,51
Aa13	19	0,24	63,3	106,57	497,14	7,10	15,41	111,25
Aa14	15	0,40	56,5	58,64	240,54	25,37	26,81	86,16
Aa15	10	0,60	267,4	196,19	544,68	10,05	145,82	389,02
Aa16	9	0,64	316,9	112,82	522,80	215,02	243,16	390,58
Geral	11,5	0,54	111,42	155,51	552,89	4,76	127,30	172,24

\*Valores negativos para IC.Inf. devem ser interpretados como zero.

Tabela 11 - Número de sementes com paternidade determinada (NPD), Taxa de imigração de pólen ( $\hat{m}$ ), Distância média de movimentação do pólen ( $D\bar{Y}$ ), Desvio padrão (DP), Distância máxima de fluxo de pólen ( $D_{\text{máx}}$ ), Distância mínima de fluxo de pólen ( $D_{\text{mín}}$ ) e Intervalos de confiança Superior e Inferior (IC.Inf/IC.Sup.), de 18 plantas de uma população de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo (FSR), avaliadas em 2016, no município de Lages-SC.

Matriz	NPD <sup>1</sup>	$m$	$D\bar{Y}$ (m)	DP	$D_{\text{máx}}$ (m)	$D_{\text{mín}}$ (m)	IC,Inf.	IC,Sup.
Aa1	10	0,60	168,48	95,51	274,90	21,02	109,28	227,68
Aa2	13	0,48	213,58	180,18	514,75	10,87	115,63	311,53
Aa3	10	0,60	214,68	217,30	593,73	12,30	80,00	349,37
Aa4	16	0,36	163,17	232,38	562,09	7,21	49,30	277,04
Aa5	13	0,48	112,60	159,86	503,37	9,06	25,70	199,50
Aa6	10	0,60	133,18	198,27	485,58	8,09	10,29	256,07
Aa7	13	0,48	81,37	141,41	424,88	4,50	4,49	158,24
Aa8	8	0,68	295,92	184,70	511,39	35,23	167,93	423,91
Aa9	3	0,88	286,36	190,09	405,04	67,10	71,25	501,47
Aa10	14	0,44	187,39	211,59	484,02	26,49	76,55	298,23
Aa11	8	0,68	324,82	215,97	502,00	5,51	175,16	474,48
Aa12	10	0,60	432,85	142,84	581,63	88,71	344,32	521,38
Aa13	10	0,60	428,43	53,17	446,50	277,29	395,47	461,38
Aa14	16	0,36	342,27	191,28	565,12	14,68	248,54	435,99
Aa15	10	0,60	344,46	203,36	556,38	49,61	218,42	470,50
Aa16	7	0,72	356,46	114,58	478,95	210,65	271,58	441,35
Aa17	8	0,68	360,96	204,14	563,59	85,18	219,50	502,42
Aa148	13	0,48	303,05	152,01	514,44	110,08	220,41	385,68
Geral	10,7	0,57	251,96	201,89	593,73	4,50	223,41	280,52

\*Valores negativos para IC.Inf. devem ser interpretados como zero.

Tabela 12 - Número de sementes com paternidade determinada (NPD), Taxa de imigração de pólen ( $\hat{m}$ ), Distância média de movimentação do pólen ( $D\bar{Y}$ ), Desvio padrão (DP), Distância máxima de fluxo de pólen ( $D_{m\acute{a}x}$ ), Distância mínima de fluxo de pólen ( $D_{m\acute{i}n}$ ) e Intervalos de confiança Superior e Inferior (IC.Inf/IC.Sup.), de 18 plantas de uma população de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo (FSR), avaliadas em 2017, no município de Lages-SC.

Planta mãe	NPD	$\hat{m}$	$D\bar{Y}$ (m)	DP	$D_{m\acute{a}x}$ (m)	$D_{m\acute{i}n}$ (m)	IC,Inf.	IC,Sup.
Aa1	8	0,68	77,52	87,62	259,65	21,02	16,80	138,24
Aa2	8	0,68	135,12	210,78	480,39	10,87	-10,95	281,18
Aa3	10	0,60	175,61	243,20	631,98	12,30	24,88	326,35
Aa4	17	0,32	19,45	44,87	192,94	7,21	-1,88	40,78
Aa5	10	0,60	40,13	62,19	206,35	9,06	1,59	78,68
Aa6	14	0,44	66,75	94,38	258,47	8,09	17,31	116,19
Aa7	17	0,32	118,33	108,87	362,30	35,95	66,58	170,09
Aa8	8	0,68	106,08	81,94	283,50	35,51	49,30	162,86
Aa9	4	0,84	181,48	92,12	314,51	108,83	91,19	271,76
Aa10	12	0,52	27,55	3,68	39,23	26,49	25,47	29,63
Aa11	17	0,32	5,51	0,00	5,51	5,51	5,51	5,51
Aa12	8	0,68	102,59	204,07	581,63	7,77	-38,83	244,00
Aa13	18	0,28	49,58	110,58	489,99	15,06	-1,51	100,67
Aa14	21	0,16	52,11	37,53	123,50	25,50	36,05	68,16
Aa15	11	0,56	143,14	116,11	408,36	10,04	74,52	211,75
Aa16	8	0,68	343,15	135,77	529,70	219,38	249,07	437,24
Aa17	4	0,84	265,90	260,46	637,45	29,16	10,64	521,15
Aa148	11	0,56	375,97	138,06	497,16	134,58	294,38	457,56
Geral	11,44	0,54	104,78	201,89	637,45	5,51	77,21	132,35

\*Valores negativos para IC.Inf. devem ser interpretados como zero.

Tabela 13 - Número de sementes com paternidade determinada (NPD), Taxa de imigração de pólen ( $\hat{m}$ ), Distância média de movimentação do pólen ( $D\bar{y}$ ), Desvio padrão (DP), Distância máxima de fluxo de pólen ( $D_{m\acute{a}x}$ ), Distância mínima de fluxo de pólen ( $D_{m\acute{i}n}$ ) e Intervalos de confiança Superior e Inferior (IC.Inf/IC.Sup.), de 12 plantas de uma população de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo (FECAV), avaliadas em 2017, no município de Lages-SC.

Planta mãe	NPD	$\hat{m}$	$D\bar{y}$ (m)	DP	$D_{m\acute{a}x}$ (m)	$D_{m\acute{i}n}$ (m)	IC,Inf.	IC,Sup.
BC05	16	0,36	39,80	16,91	67,90	7,07	4,23	31,52
BC09	7	0,72	41,48	31,29	76,32	10,05	11,83	18,30
BC10	12	0,52	48,54	47,98	183,35	16,16	13,85	21,39
BC15	9	0,64	142,25	39,45	159,21	37,12	13,15	116,47
BC20	11	0,56	41,33	37,32	136,46	8,00	11,25	19,28
BC29	17	0,32	16,30	25,00	103,24	8,00	6,06	4,41
BC32	1	0,96	121,20	-	121,20	121,20	-	-
BC40	11	0,56	52,21	53,93	154,26	8,00	16,26	20,34
BC42	12	0,52	69,23	57,88	134,63	7,00	16,71	36,48
BC46	6	0,76	122,17	67,24	184,71	9,49	27,45	68,37
BC47	8	0,68	73,02	30,06	134,42	50,54	10,63	52,19
BC54	6	0,76	53,65	42,23	107,21	11,66	17,24	19,86
Geral	9,7	0,58	57,64	52,16	184,71	7,00	48,15	67,13

Tabela 14 - Número de sementes com paternidade determinada (NPD), Taxa de imigração de pólen ( $\hat{m}$ ), Distância média de movimentação do pólen ( $D\bar{y}$ ), Desvio padrão (DP), Distância máxima de fluxo de pólen ( $D_{\max}$ ), Distância mínima de fluxo de pólen ( $D_{\min}$ ) e Intervalos de confiança Superior e Inferior (IC.Inf/IC.Sup.), de 18 plantas de uma população de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo (FSR), avaliada por três anos (2015, 2016 e 2017), no município de Lages-SC.

Planta mãe	NPD	$\hat{m}$	$D\bar{y}$ (m)	DP	$D_{\max}$ (m)	$D_{\min}$ (m)	IC,Inf.	IC,Sup.
Aa1	23	0,69	175,33	121,12	398,22	21,02	103,68	246,99
Aa2	32	0,57	137,06	186,82	484,16	26,49	89,57	184,54
Aa3	34	0,55	142,80	210,67	559,13	5,51	94,80	190,80
Aa4	20	0,73	278,25	244,04	617,37	7,77	156,30	400,20
Aa5	50	0,33	92,92	148,06	497,14	7,10	67,16	118,67
Aa6	57	0,24	79,54	106,62	481,26	5,30	58,89	100,18
Aa7	27	0,46	310,50	178,987	550,32	31,33	193,38	427,62
Aa8	33	0,56	219,59	169,805	544,68	10,04	144,66	294,51
Aa9	26	0,65	336,50	117,969	529,70	172,95	207,15	465,84
Aa10	12	0,76	330,77	207,253	637,45	29,16	143,62	517,93
Aa11	37	0,51	155,44	185,897	540,87	10,00	105,35	205,52
Aa12	36	0,52	172,16	206,193	631,98	12,30	115,92	228,39
Aa13	53	0,29	87,44	180,898	574,17	7,21	63,90	110,98
Aa14	48	0,36	83,94	149,278	553,45	9,06	60,19	107,69
Aa15	41	0,45	74,79	121,449	485,60	4,76	51,90	97,69
Aa16	48	0,36	96,87	118,67	396,03	8,61	69,47	124,28
Aa17	23	0,69	185,92	119,01	444,86	35,51	109,94	261,90
Aa148	20	0,73	214,80	60,87	314,73	108,83	120,66	308,94
Geral	34,44	0,53	155,22	176,42	637,45	5,51	63,26	237,60

De acordo com as análises de paternidade realizadas, a distância de polinização mínima na área FSR foi de 4,8 m (em 2016) e máxima de 637,45 m (em 2017). A maior distância média de movimentação de pólen foi verificada no ano de 2016 na FSR (251,96 m) e a menor no ano de 2017, na área FECAV (57,54 m). As distâncias médias de polinização somente não diferiram significativamente entre si nos anos de 2015 e 2017 na área FSR.

Para ambas as áreas, pouco mais do que a metade do fluxo de pólen (54% em 2015 FSR, 57% em 2016 FSR, 54% em 2017 FSR e 58% 2017 FECAV) foi caracterizado como imigração, isto é, oriundo de fora das parcelas avaliadas. A taxa de imigração foi bastante variável entre plantas mãe; em 2015 FSR essa taxa variou de 0,12 a 0,92, em 2016 FSR variou de 0,36 a 0,88, em 2017 FSR de 0,32 a 0,96 e em 2017 FECAV essa variação foi de 0,32 a 0,96.

Os valores de  $N_{ep}$  por planta mãe e por população estão descritos na Tabela 15. Ao analisar em conjunto os três anos de avaliação da área FSR foi verificado que existe correlação positiva ( $r = 0,60$ ;  $p = 0,007$ ) entre o número efetivo de doadores de pólen ( $N_{ep}$ ) e os valores de distância média de movimentação de pólen por planta mãe ( $D_{\bar{y}}$ ). Por outro lado, correlação negativa ( $r = -0,68$ ;  $p = 0,001$ ) foi verificada entre  $N_{ep}$  e os valores médios das distâncias dos cruzamentos potenciais ( $D_e$ ). Foi verificado também a correlação não significativa ( $r = 0,05$ ;  $p = 0,817$ ) entre os valores de  $D_e$  e de  $D_{\bar{y}}$  por planta mãe. Na área FECAV foram verificadas correlações não significativas entre os valores médios de  $D_{\bar{y}}$  e  $N_{ep}$  ( $r = -0,36$ ;  $p = 0,23$ ), de  $N_{ep}$  e  $D_e$  ( $r = 0,11$ ;  $p = 0,72$ ) e de  $D_e$  e  $D_{\bar{y}}$  ( $r = 0,18$ ;  $p = 0,55$ ).

Tabela 15 - Número efetivo de doadores de pólen ( $N_{ep}$ ) por planta mãe e por população determinadas por análise de paternidade de sementes em diferentes anos de avaliação em duas populações de *Araucaria angustifolia* no município de Lages - SC.

Planta Mãe	FSR 2015	FSR 2016	FSR 2017	FSR Geral	Planta Mãe	FECAV 2017
Aa1	3,0	8,3	4,0	13,6	Bc5	7,11
Aa2	2,7	9,9	4,0	6,7	Bc9	3,77
Aa3	2,2	6,3	5,6	7,7	Bc10	4,24
Aa4	1,4	4,9	2,3	2,8	Bc15	1,59
Aa5	1,1	4,3	2,4	2,3	Bc20	8,07
Aa6	2,6	2,5	4,3	4,8	Bc29	0,54
Aa7	5,2	3,4	2,6	4,6	Bc32	1,00
Aa8	3,6	8,0	5,3	16,0	Bc40	8,07
Aa9	7,1	3,0	4,0	16,7	Bc42	4,50
Aa10	3,3	2,8	1,2	2,2	Bc46	4,50
Aa11	5,4	6,4	1	2,5	Bc47	3,20
Aa12	2,0	10,0	1,7	7,7	Bc54	4,50
Aa13	7,7	1,9	4,0	11,9		
Aa14	0,3	8,5	3,7	9,4		
Aa15	10,0	6,3	7,1	18,5		
Aa16	6,2	7,0	8,0	17,8		
Aa17	-	8,0	4,0	10,3		
Aa148	-	11,3	6,4	14,9		
Geral para população	9,8	30,1	22,0	28,0		15,3
IC superior (95%)	3,6	15,8	11,8	12,8		9,7
IC inferior (95%)	105,8	78,9	58,4	90,0		41,1

### 3.3.2 Variação no sucesso reprodutivo

Dos 118 supostos pais submetidos a análise de paternidade, na área FSR, o número de indivíduos atribuídos como verdadeiro pai de pelo menos uma semente foi de 103 (87%), ao considerar os três anos avaliados em conjunto. Especificamente, no ano de 2015 esse número foi de 60 (51%), em 2016 foi de 76 (64%) e em 2017 de 61 (52%). Do total dos indivíduos atribuídos como pais na área FSR (103), 32 deles (27%) participaram de um único evento reprodutivo, 47 (40%) participaram de dois eventos reprodutivos e 24 (20%) participaram dos três eventos reprodutivos. O número de indivíduos que não foram atribuídos como pai em nenhum dos eventos reprodutivos foi de 15 (13%), dos quais, nove foram classificados como indeterminados e seis como machos. Na área FECAV, dos 40 possíveis pais, 29 (72%) foram atribuídos como pais de pelo menos uma semente. Dos 11 não atribuídos como pais cinco foram classificados como macho e seis como indeterminados. Dessa forma, em ambas as áreas, algumas das plantas classificadas como macho não foram atribuídos como pais e algumas das plantas classificadas como indeterminados foram atribuídos como pais de pelo menos uma semente, ou seja, poderiam ser considerados como machos.

Do total de atribuições de paternidade feitas durante os três anos de avaliação na área FSR o número de pais que fertilizaram apenas uma semente foi de 21 (20%) e de 26 (22%) que fertilizaram duas sementes. Esses resultados tomados em conjunto representam quase a metade das atribuições feitas. Nos anos de 2015, 2016 e 2017 o número de pais que fertilizaram apenas uma semente foi de 33 (55%), 37 (49%) e 34 (56%), respectivamente. Na área FECAV 29 pais (31%), fertilizaram uma única semente e cinco pais (17%) fertilizaram duas sementes apenas. Características do sucesso reprodutivo e de movimentação de pólen dos 10 indivíduos que foram atribuídos como pai do maior número de sementes, na área FSR em 2015, 2016 e 2017 e na área FECAV em 2017, estão descritos nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16 - Número de sementes com paternidade atribuída (NSPA), distâncias média ( $D_{\bar{y}}$ ), mínima ( $D_{\min}$ ) e máxima ( $D_{\max}$ ) e Sucesso reprodutivo ( $S_{rp}$ ) das 10 árvores com maior número de atribuições de paternidade de sementes de *Araucaria angustifolia*, nos anos de 2015, 2016 e 2017 para duas áreas avaliadas.

Ano	Indivíduo	NSPA	$D_{\bar{y}}$ (m)	$D_{\min}$ (m)	$D_{\max}$ (m)	$S_{rp}$ (%)
FSR 2015	Aa25M	54	23,32	7,36	481,59	29,35
	Aa72M	12	115,67	19,67	522,80	6,52
	Aa131I	8	32,90	32,90	32,90	4,35
	Aa19M	6	37,79	4,76	143,43	3,26
	Aa134M	5	157,48	15,03	486,63	2,72
	Aa31M	5	14,09	8,61	36,04	2,72
	Aa87M	5	121,64	26,59	489,47	2,72
	Aa119M	4	38,84	38,84	38,84	2,17
	Aa128M	4	31,42	31,42	31,42	2,17
	Aa180M	4	103,73	202,60	25,37	2,17
Geral	184	111,42	4,76	552,89		
FSR 2016	Aa25M	21	250,35	7,21	461,27	10,94
	Aa27M	14	119,66	8,49	472,65	7,29
	Aa20M	10	154,70	8,09	496,79	5,21
	Aa31M	10	183,14	35,95	563,59	5,21
	Aa87M	8	26,49	26,48	26,485	4,17
	Aa33M	6	131,27	67,10	441,03	3,13
	Aa19M	5	85,67	4,50	207,41	2,60
	Aa40M	5	193,40	57,85	536,98	2,60
	Aa114I	4	346,42	154,01	461,60	2,08
	Aa24M	4	364,49	25,43	505,72	2,08
Geral	192	223,06	5,30	617,37		
FSR 2017	Aa85M	24	7,48	39,23	5,51	11,65
	Aa25M	20	10,47	35,23	7,21	9,71
	Aa134M	14	46,81	211,55	15,06	6,80
	Aa31M	11	44,35	128,36	35,95	5,34
	Aa87M	11	26,49	26,49	26,49	5,34
	Aa133I	9	57,43	390,09	15,85	4,37
	Aa72M	7	215,91	522,75	19,73	3,40
	Aa45M	7	73,16	143,48	21,02	3,40
	Aa27M	7	9,58	12,30	8,49	3,40
	Aa151M	6	241,43	472,81	10,04	2,91
Geral	206	104,18	637,44	5,51		
FECV 2017	BC27M,B	15	9,22	26,25	8,00	12,93
	BC66I,B	13	63,26	183,35	7,00	11,21
	BC12M,B	12	25,47	42,20	16,16	10,34
	BC44I,B	9	132,96	154,84	9,49	7,76
	BC61M,B	7	60,40	127,01	36,40	6,03
	BC57I,B	6	55,02	108,17	11,66	5,17
	BC67I,B	6	105,06	184,71	30,27	5,17
	BC28I,B	5	45,43	90,43	8,00	4,31
	BC68I,B	4	113,24	154,26	70,29	3,45
	BC23I,B	4	42,09	54,56	8,06	3,45
Geral	116	64,62	184,7	7,00		

Tabela 17 - Número de sementes com paternidade atribuída (NSPA), distâncias média ( $D_{\bar{y}}$ ), mínima ( $D_{\min}$ ) e máxima ( $D_{\max}$ ) e Sucesso reprodutivo  $S_{rp}$  das 10 plantas com maior número de atribuições de paternidade para o conjunto de sementes de *Araucaria angustifolia*, analisadas ao longo dos anos de 2015, 2016 e 2017 na área FSR.

Ano	Indivíduo	NSPA	$D_{\bar{y}}$ (m)	$D_{\max}$ (m)	$D_{\min}$ (m)	$S_{rp}$ (%)
FSR 2015, 2016 e 2017	Aa25M	95	28,32	512,17	7,21	15,32
	Aa85M	31	51,87	488,48	5,51	5,00
	Aa31M	26	93,53	479,12	8,61	4,19
	Aa27M	25	19,12	180,00	8,47	4,03
	Aa87M	24	81,65	489,95	26,49	3,87
	Aa72M	21	139,94	522,80	19,67	3,39
	Aa134M	20	86,44	486,63	15,03	3,23
	Aa20M	20	68,65	486,14	8,09	3,23
	Aa133I	12	92,82	390,09	15,85	1,94
	Aa19M	11	151,49	479,83	4,76	1,77
	Geral	620	150,42	637,44	4,76	

No ano de 2015 o conjunto dos 10 pais (dentre aqueles identificados) com maior sucesso reprodutivo, juntos doaram pólen para 58% das sementes da área FSR. Esse mesmo conjunto, no ano de 2016, doou pólen para 45% das sementes e em 2017 doou para 56% das sementes. Na área FECAV o conjunto dos 10 pais com maior sucesso reprodutivo contribuiu com a formação de 69% das sementes.

Na área FSR foram verificadas correlações negativas significativas entre o número de sementes atribuídas e a distância média de movimentação de pólen, para cada indivíduo determinado como pai nos anos de 2015 ( $p < 0,05$ ), 2016 ( $p < 0,01$ ) e 2017 ( $p < 0,01$ ). No entanto, foram encontradas correlações não significativas quando consideradas apenas as 10 plantas doadoras de pólen de maior sucesso reprodutivo, em todos anos ( $p > 0,05$ ). Na área FECAV, essas correlações não foram significativas ( $p > 0,05$ ). Esses resultados demonstram que para as 10 plantas de maior sucesso reprodutivo da área FSR e para FECAV de maneira geral, o número de sementes atribuídas para cada pai, não tem correlação com a distância média de movimentação de pólen por pai. A correlação entre o diâmetro dos pais e o sucesso reprodutivo foi significativa e positiva nos anos de 2015 ( $r = 0,24$ ;  $p = 0,031$ ), 2016 ( $r = 0,25$ ;  $p = 0,026$ ), 2017 ( $r = 0,39$ ;  $p = 0,001$ ) e também nos três anos avaliados em conjunto ( $r = 0,31$ ;  $p = 0,0004$ ), na área FSR. No entanto, de maneira geral as correlações encontradas foram fracas. Correlações não significativas foram verificadas ao analisar as 10 plantas de maior

sucesso reprodutivo ( $r = -0,14$ ;  $p = 0,68$ ). Correlações não significativas entre o diâmetro e o sucesso reprodutivo de plantas macho também foram encontradas na área FECAV ( $r = 0,34$ ;  $0,065$ ).

A distribuição do número de sementes com paternidade atribuída e a diversidade de pais observados para cada evento reprodutivo estão descritos na Tabela 18.

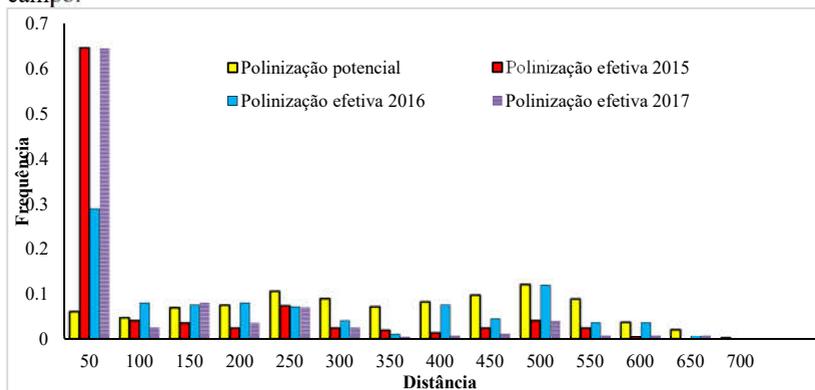
Tabela 18 - Distribuição da diversidade de pais por local, determinados por análises de paternidade de coortes de sementes de *Araucaria angustifolia* em paisagens de campo.

	N	P	D (IC)	H' (IC)	J (IC)
2015 FSR	184	60	0,102 (0,065 - 0,138)	3,272 (3,042 - 3,503)	0,799 (0,754 - 0,845)
2016 FSR	192	76	0,033 (0,023 - 0,043)	3,897 (3,738 - 4,057)	0,9 (0,874 - 0,926)
2017 FSR	206	61	0,045 (0,035 - 0,056)	3,539 (3,381 - 3,696)	0,861 (0,835 - 0,887)
Geral FSR	620	106	0,03576 (0,031 - 0,044)	4,002 (3,817 - 4,014)	0,8581 (0,837 - 0,874)
2017 FECAV	116	29	0,065 (0,049 - 0,081)	2,999 (2,836 - 3,163)	0,891 (0,856 - 0,926)

N: número de sementes com paternidade determinada; P: número de pais atribuídos; D: Dominância; H': Índice de Shannon; J: Equabilidade; IC: Intervalo de confiança.

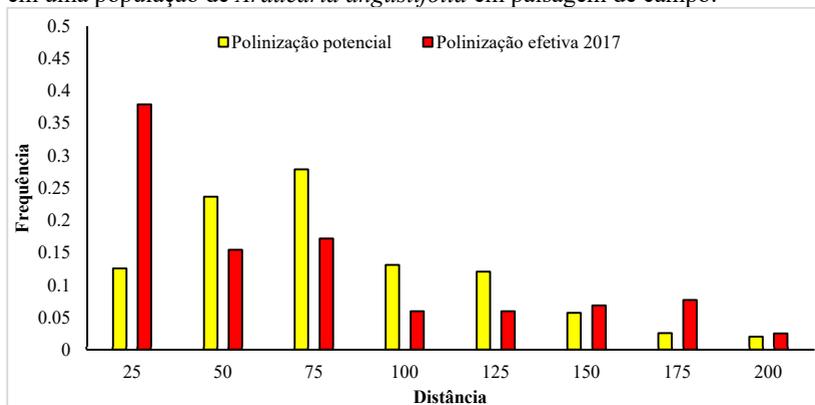
O resultado gráfico da distribuição de frequências de distâncias dos cruzamentos potenciais (plantas mãe *versus* supostos pais) com a distribuição de frequências de distâncias dos cruzamentos realizados (plantas mãe *versus* pai determinado), em ambas as áreas analisadas, está representado nas Figuras 6 e 7. Em todas as classes de distância potenciais foi verificado a presença de cruzamentos. Nos anos de 2015 e 2017 na área FSR cerca de 60 % da polinização efetiva ocorreu entre plantas com distâncias até 50 m. Em contrapartida, em 2016, apenas 30% da polinização ocorreu na classe de 50m.

Figura 6 – Frequência das distâncias potenciais de polinização (distâncias entre pares de plantas) e polinizações efetivas nos anos de 2015, 2016 e 2017 na área FSR, presente em uma população de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo.



Fonte: Produção do próprio autor

Figura 7 – Frequência das distâncias potenciais de polinização (distâncias entre pares de plantas) e polinizações efetivas no ano 2017 na área FECAV, presente em uma população de *Araucaria angustifolia* em paisagem de campo.



Fonte: Produção do próprio autor

O teste de Komogorov-Smirinov (K-S) para as distribuições de frequências por classe de distância feito para polinização potencial e polinização efetiva da área FSR demonstrou que essas distribuições foram diferentes no ano de 2015 ( $D = 0,64$ ;  $p = 0,005$ ) e 2017 ( $D = 0,57$ ;  $p = 0,017$ ), porém não diferiram no ano de 2016 ( $D = 0,35$ ;  $p = 0,285$ ). Na comparação entre anos, feitas para a distribuição da polinização

efetiva, o ano de 2016 diferiu dos demais ( $D_{2015 \times 2016} = 0,50$ ;  $p = 0,04$ ;  $D_{2016 \times 2017} = 0,5$ ;  $p = 0,048$ ), porém, o ano de 2015 não diferiu de 2017 ( $D_{2015 \times 2017} = 0,28$ ;  $p = 0,58$ ). Ainda na FSR, a área de vizinhança efetiva de polinização ( $A_{ep}$ ) foi de 30,4 ha em 2015, 51,2 ha em 2016 e 27,8 ha em 2017. O raio de polinização circular ( $r_{ep}$ ) em 2015 foi de 311,0 m, em 2016 foi de 403,8 m e em 2017 foi de 297,6 m.

Na área FECAV os valores encontrados de  $A_{ep}$  e  $r_{ep}$  foram de 3,4 há e 104,3 m, respectivamente. O teste K-S demonstrou que as distribuições de frequências por classe de distância feito para polinização potencial e polinização efetiva não diferem significativamente entre si na área FECAV ( $D = 0,50$ ;  $p = 0,25$ ). Na comparação entre áreas no ano de 2017, feita com intervalos de classe de 25 m, para as classes de 0 a 200 de acordo com as classes atribuídas no ano de 2017 para FECAV (Figura 7), o teste K-S revelou não haver diferenças significativas entre as distribuições de frequências da polinização efetiva entre FSR e FECAV ( $D = 0,5$ ;  $p = 0,27$ ).

### 3.4 DISCUSSÃO

#### 3.4.1 Movimentação de pólen e taxa de imigração

O nível de fluxo gênico críptico encontrado neste estudo, de maneira geral, foi suficientemente baixo, a ponto de ser considerado desprezível no presente estudo.

*Taxas de imigração de pólen* - A alta proporção de fluxo gênico mediado pelo pólen oriundo de fora das parcelas avaliadas neste estudo (0,54 – 0,58), se manteve similar ao logo dos anos e locais avaliados, e ainda com valores da proporção de imigração de pólen consistentes com os maiores valores encontrados em estudos prévios de fluxo gênico realizados em *Araucaria angustifolia* (Tabela 19). Medina-Macedo et al. (2015) estudando o fluxo de pólen de populações de *Araucaria angustifolia* dentro de uma floresta conservada e em árvores isoladas em uma área aberta próxima, encontraram o doador de pólen para 268 sementes (74%), das 364 sementes amostradas dentro da floresta. Em árvores espacialmente “isoladas” e em área aberta, das 210 sementes amostradas o pai foi encontrado para 169 (80%). Esses autores consideram que os valores representam uma quantidade substancial de imigração de pólen tanto para área de floresta (26%), quanto para a área aberta (20%). Contudo, as expressivas taxas de fluxo de pólen

encontradas no presente estudo contribuem para o aumento do tamanho efetivo da população e a introdução de novos alelos, via fluxo de pólen, de fora da população, conforme já relatado no Capítulo I, contribui para a preservação da diversidade genética na população (SEBBENN et al., 2011).

Tabela 19 - Características da área de estudo e taxa de imigração de pólen encontrados em estudos de análise de paternidade de sementes de *Araucaria angustifolia*.

Área de estudo	Taxa de Imigração de pólen	Autores
Fragmento florestal (5,4 ha)	10%	Bittencourt; Sebbenn, 2007
Floresta conservada (14 ha)	54%	Bittencourt; Sebbenn, 2008
Floresta conservada (5,1 ha)	6%	Sant' Anna et al, 2013
Área de campo e capões (9 ha)	23%	Cristofolini, 2014
Capões em área de campo e em reflorestamentos (3,5 e 3,7 ha)	46% e 36%	Costa, 2015
Floresta conservada e área aberta (7 ha)	20% a 26%	Medina-Macedo et al, 2015
Áreas de campo com capões e árvores isoladas (70,6 ha)	11%	Cristofolini, 2017
Área de campo com capões e árvores isoladas (43 ha – três anos avaliados).	54% a 57%	Presente estudo
Área de campo com capões (2 ha)	58%	Presente estudo

Em uma ampla revisão sobre análises de paternidade e parentesco em plantas, Ashley (2010) constatou que nas espécies polinizadas pelo vento a taxa de imigração de pólen é geralmente alta, com base em pelo menos 20 estudos que apresentaram valores acima de 20% e média geral de 44% de pólen imigrante. Pesquisas sobre fluxo de pólen em outras populações naturais de espécies de árvores também revelaram altas taxas de imigração, como por exemplo, em *Symphonia globulifera* com a taxa de imigração de pólen de 49% (CARNEIRO et al., 2009) e de 61,3% em *Theobroma cacao* (SILVA et al., 2011). Para o fluxo gênico se tornar uma eficiente força contrapondo os efeitos genéticos negativos da fragmentação de habitats, esta deve não somente sustentar elevadas taxas ao longo dos anos, mas também ser qualitativamente diversa (BACLES; ENNOS, 2008).

Além das altas taxas de imigração de pólen, espécies polinizadas pelo vento também podem apresentar uma alta variação na imigração de pólen. Na revisão feita por Ashley (2010) os estudos indicaram que a taxa de imigração de pólen tem uma amplitude que vai de 4,3 a 91%. A elevada amplitude de variação da taxa de imigração de pólen entre plantas mães também foi encontrada pelo presente estudo, em todas as

situações avaliadas (Tabelas 10, 11, 12, 13 e 14). Além disso, foi observado que o padrão de plantas mãe com as maiores e menores taxas de imigração não se repete ao longo dos anos avaliados, o que pode caracterizar um fenômeno aleatório a nível individual. Resultados similares foram encontrados em *Salix cinerea*, uma planta dioica e polinizada preferencialmente por insetos, demonstram que os níveis individuais de pólen migrante em plantas mãe (oriundo de pais a 500 m de distância), variaram de 8% a 92%, indicando que cada planta mãe coletada estava de alguma forma reprodutivamente conectada, mesmo que em diferentes níveis, com plantas macho de fora de seu local de origem (HOPLEY; ZWART; YOUNG, 2015). Lander et al. (2010) também verificaram ampla variação nas taxas de imigração de pólen (12 – 96%), em populações de *Gomortega keule*, espécie ameaçada de ocorrência natural no Chile, indicando que pesquisas sobre estes fatores são valiosas para entender a conectividade genética na escala da paisagem.

*Distâncias de movimentação de pólen* – Ao longo dos três anos avaliados na área FSR a distância média de dispersão de pólen foi de 176,43 m, com máximo de 637,45 m, enquanto que na área FECAV esses valores foram de 57,64 m e 184,7 m, respectivamente. Na comparação entre áreas, as distâncias médias de movimentação de pólen maiores na área FSR, comparativamente a área FECAV, possivelmente se devem ao fato das diferenças no padrão de distribuição espacial dos indivíduos (ver Figuras 6 e 7), aliado as diferenças nas áreas amostradas e, conseqüentemente, na densidade de indivíduos.

Os valores de distância de dispersão de pólen encontrados no presente estudo representam apenas uma pequena parte da escala em que a movimentação de pólen pode alcançar para *A. angustifolia*, pois distâncias de fluxo de pólen acima de 2 km já foram encontrados para a espécie (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007). No entanto, a movimentação de pólen em uma escala de paisagem, para espécies que atingem longas distâncias de dispersão de pólen, como a *A. angustifolia*, é difícil de ser mensurada. Todavia, o objetivo do presente estudo não previa detectar longas distâncias de dispersão, mas detectar em escala fina a variação que ocorre no fluxo de pólen da espécie. Diferenças nas distâncias de dispersão de pólen em plantas de *Araucaria angustifolia*, presentes em áreas de campo, podem afetar diretamente os níveis de fluxo gênico entre as populações e, conseqüentemente, o tamanho efetivo da população. Quanto maiores as distâncias de dispersão de pólen maiores são as possibilidades de trocas genéticas e a ampliação do

fluxo gênico, contrapondo efeitos negativos de cruzamentos correlacionados, baixo tamanho efetivo e diferenciação entre populações próximas. Assim, se uma proporção substancial de pólen é dispersa a curtas distâncias, cruzamentos entre aparentados irão ocorrer inevitavelmente (BITTENCOURT; SEBBENN, 2009).

Extensas distâncias de dispersão de pólen, em populações remanescentes e dispersas e árvores espacialmente isoladas na paisagem, parecem desempenhar um papel vital na manutenção da diversidade genética, da conectividade e da baixa divergência genética entre populações, reduzindo o risco de depressão por endogamia e extinção local (LANDER; BOSHIER; HARRIS, 2010). Em termos de movimentação de pólen o ano de 2016 foi o que apresentou maior sucesso nas trocas genéticas. Possivelmente as maiores distâncias de polinização verificadas para este ano possibilitaram uma contribuição maior e mais diversa de pais (Tabela 18). O que teve um reflexo que pode ser observado também na diversidade das sementes que também foi maior para o ano de 2016 (ver Capítulo I). Contudo, as diferenças encontradas entre os anos demonstram que a variação temporal na dispersão de pólen é um importante fator que pode contribuir com manutenção da diversidade genética e no progresso do processo evolutivo das populações.

O resultado do teste de comparação das distribuições de frequência das distâncias de movimentação de pólen, revelou que nos anos de 2015 e 2017 as distâncias da polinização efetiva não são dependentes das distâncias de polinização potencial (machos vs plantas mãe). Entretanto, isso não ocorreu no ano de 2016, onde a distribuição da polinização efetiva aderiu a distribuição da polinização potencial. Neste mesmo ano, maiores distâncias médias de polinização foram encontradas, juntamente com maiores valores de área de polinização circular e raio de polinização, indicando que os cruzamentos entre indivíduos (deme-panmítica), foi maior no ano de 2016. Esses resultados demonstram, primeiramente, que o padrão de movimentação de pólen é dinâmico, podendo ora não depender do padrão de distribuição dos indivíduos ou se tornar dependente dele devido a variação do fluxo de pólen ao longo dos anos e se tornar. Essa característica da movimentação de pólen é extremamente importante, pois possibilita ao longo dos anos maiores possibilidades de trocas genéticas por meio do pólen, devido ao fato de terem sido encontradas maiores diferenças na distribuição da movimentação do pólen entre anos do que entre locais em um mesmo ano.

### 3.4.2 Número efetivo de doadores de pólen

Os valores do número efetivo de doadores de pólen ( $N_{ep}$ ), encontrados por determinação direta da paternidade das sementes a nível de população (Tabela 15), foram condizentes com os valores  $N_{ep}$  encontrados a partir das análises de sistema reprodutivo (análises indiretas), apresentada no Capítulo I (Tabela 9). No entanto, os valores de  $N_{ep}$  determinados por análise de paternidade, não foram significativamente diferentes entre os anos. Apesar disso, o valor de  $N_{ep}$  do ano de 2016 da área FSR foi três vezes mais alto que o  $N_{ep}$  estimado na mesma área no ano de 2015. Possivelmente, diferenças não foram detectadas a nível de população pela elevada amplitude do intervalo de confiança da estimativa, causada pela alta variação existente nos valores de  $N_{ep}$ . Além disso, o método direto considera no cálculo somente as sementes com paternidade atribuída, conseqüentemente, as estimativas geradas não atingem valores maiores do que o número efetivo de sementes analisadas, diferentemente do observado no método indireto (ver discussão capítulo 1). Contudo, os resultados demonstram que a nível populacional os métodos são condizentes na determinação da estimativa, cada um com suas vantagens e desvantagens (ASHLEY, 2010).

Os resultados encontrados por Medina-Macedo et al. (2016), em árvores de *Araucaria angustifolia* localizadas em áreas abertas, mas que não estavam isoladas de fragmentos florestais, situação semelhante a do presente estudo, foram similares em termos de valores de  $N_{ep}$ , variando de 3,5 a 32,3, por família. Cabe ressaltar que o presente estudo não encontrou valores de  $N_{ep}$  maiores que 11,3 a nível de família, entretanto, o número diferente de marcadores usados, as diferentes populações estudadas, bem como as estratégias de amostragem, que foram distintas, devem ser levadas em conta. Similarmente, Bittencourt e Sebbenn (2007), encontraram a média de 12,6 doadores de pólen por planta mãe de *A. angustifolia*, ao analisar um pequeno fragmento florestal não isolado geneticamente de outras populações. Estudos com outras espécies polinizadas pelo vento como *Olea europaea*, de um total de 214 possíveis doadores de pólen identificados a nível de paisagem, foi encontrado uma média de  $N_{ep}$  de 6,48 por planta mãe (KASSA; KONRAD; GEBUREK, 2018), para *Phoenix canariensis* de 182 possíveis doadores foi encontrado um  $N_{ep}$  com média de 5,8 por planta mãe (SARO et al., 2014).

Todavia, o valor  $N_{ep}$  está intimamente ligado ao número de sementes com pais determinados em cada planta mãe, pois, uma vez que um número pequeno de pais tenha sido determinado, comum quando há elevadas taxas de imigração de pólen, os pais que não foram determinados não irão entrar na contagem e isso irá limitar a estimativa do  $N_{ep}$ . No presente estudo, ocorreram dois casos em que menos de três das 25 sementes amostradas, por planta mãe, por ano, tiveram o pai atribuído (Tabelas 10 e 13), o que implica na subestimativa da determinação do número efetivo de doadores de pólen. Isso pode ser observado também ao considerar a análise a nível família, ao longo dos três anos avaliados, onde a média do número efetivo de doadores de pólen foi de 9,46, cerca de três vezes menor que a média do número de sementes com paternidade atribuída, que foi de 34 (Tabela 14). Porém, na análise dos três anos em conjunto, para área FSR, o valor de  $N_{ep}$  a nível populacional foi de 30,1.

O isolamento espacial de árvores de *A. angustifolia*, de grandes populações contínuas, pode resultar em um número menor de doadores de pólen do que em condições florestais ou não isoladas (MEDINA-MACEDO et al., 2016). Assim, os valores de  $N_{ep}$ , juntamente com as altas taxas de imigração de pólen encontrados por planta mãe demonstram que as populações estudadas se encontram em uma condição não isolada. Isso aliado ao baixo número de cruzamentos correlacionados (como encontrado no Capítulo I), causa uma diminuição na frequência de alelos idênticos por descendência dentro das famílias, conseqüentemente, diminuindo o parentesco e aumentando o tamanho efetivo da população. Neste caso, assim como a taxa de imigração de pólen, o  $N_{ep}$  pode ser considerado um dos principais fatores que determinam o nível de coancestria e o tamanho efetivo das populações. Correlações feitas com o  $N_{ep}$  por planta mãe, para área FSR, indicaram que esse valor é maior quanto maior a distância média de dispersão de pólen e, conseqüentemente, quanto menores forem as distâncias médias para cruzamentos potenciais. No entanto, esse comportamento não foi observado na área FECAV.

### 3.4.3 Contribuição paterna e sucesso reprodutivo

*Varição entre e dentro dos locais* - Ao considerar somente o evento reprodutivo de 2017, a área FECAV teve maior proporção de indivíduos atribuídos como pai (72%) comparativamente a FSR (52%). Cerca de metade das sementes que tiveram a paternidade determinada,

na área FSR, foram fertilizadas por apenas 10 indivíduos, cerca de 10% do total de pais potenciais (103), ao longo dos anos avaliados. Na área FECAV, das sementes com paternidade determinada, 81 delas (70%) foram fertilizadas por apenas 10 (25%) dos 40 pais potenciais. Apesar disso, a contribuição destes pais, mesmo com a fertilização de apenas uma ou duas sementes, foi extremamente importante para garantir a manutenção da diversidade genética das coortes de sementes (resultados observados no Capítulo II).

O fato de alguns pais não contribuírem ou muitos deles contribuíram pouco como doadores de pólen podem gerar uma lacuna na composição genética das populações regenerantes, que se for acentuada pode acarretar em possíveis perdas de diversidade genéticas entre as gerações atuais e futuras. Em plantas de polinização aberta e principalmente em plantas dioicas como a *Araucaria angustifolia* a manutenção da diversidade se dá principalmente pela ocorrência de cruzamentos ao acaso, onde todos tem a chance de cruzar entre si. Caso essa condição não seja assegurada, efeitos de endogamia e deriva surgem na população e quanto mais acentuados forem, mais elevado será o potencial de perda de diversidade genética. Neste caso, o alto fluxo gênico poderia ser capaz de contrapor esses efeitos, por isso a contribuição de vários pais, mesmo que muitos deles contribuam proporcionalmente pouco, é relevante para manutenção da diversidade genética da espécie nestes ambientes.

*Varição entre anos* – Resultados de outros estudos com espécies polinizadas pelo vento mostraram que a contribuição de plantas macho para progênie foi de 35 a 60% (LOURMAS et al., 2007; MILLAR et al., 2008) e de 21 a 73% (BACLES et al., 2005a; BITTENCOURT; SEBBENN, 2008). No presente estudo, apenas 20% dos indivíduos participaram dos três eventos reprodutivos analisados na área FSR. Isso demonstra que há uma substituição de pais que contribuem para formação das sementes ao longo dos anos. Resultados semelhantes foram relatados por Iwaizumi et al. (2010), onde o número de sementes fertilizadas por parental foi significativamente diferente entre os anos.

Ainda, uma considerável diferença na proporção de sementes polinizadas pelos 10 indivíduos com maior sucesso reprodutivo foi observada entre os anos avaliados, indicando a ausência de um padrão na fertilização das sementes para *Araucaria angustifolia* em eventos reprodutivos diferentes. Consequentemente, foi observada uma variação na diversidade de doadores de pólen ao longo dos anos, com o ano de

2016 apresentando os maiores valores de diversidade de pais (Tabela 18). Conforme já discutido anteriormente, no referido ano também foram observados maiores valores de  $N_{ep}$  e de diversidade genética de sementes (ver capítulo I).

Diferenças na proporção de pais que fertilizaram sementes ao longo dos anos demonstra a importância da realização de avaliações em mais de um ano. Assim, a estratégia tem influência direta na determinação do tamanho efetivo populacional. Adicionalmente, a alta proporção de pais que contribuíram com a fertilização de apenas uma ou duas sementes demonstra que a contribuição individual por pai é pequena e que uma amostragem considerável é necessária para captar esse padrão. Esse padrão também já foi encontrado em estudos de análise de paternidade de sementes de outras espécies como *Acacia saligna* (MILLAR et al., 2008) e *Quercus lobata* (PLUESS et al., 2009). Resultados similares foram encontrados em populações de *Fraxinus excelsior*, onde 31 dos 48 pais potenciais na população fertilizaram uma ou mais sementes, mas somente três pais fertilizaram mais do que 10 sementes, de um total de 483 sementes analisadas, indicando que o sucesso reprodutivo de plantas masculinas também foi desigual (BACLES; ENNOS, 2008). Estudando o sistema reprodutivo de *Salix cinérea*, Hopley et al. (2015) também encontraram uma variação significativa no sucesso reprodutivo de plantas masculinas, com uma grande proporção de machos contribuindo com fertilização da coorte de sementes avaliada, mas uma pequena proporção contribuindo com grande parte da dessa progênie.

*Associação com outras variáveis* - De maneira geral, os resultados encontrados para a área FSR demonstram que o sucesso reprodutivo dos pais é inversamente proporcional à distância média de polinização de cada pai. Isso quer dizer que pais localizadas mais próximas de plantas mãe, em média polinizarão um número maior de sementes. Outro fator que pode ser determinante do sucesso reprodutivo é o tamanho do indivíduo. Pois, na área FSR, em todos os anos avaliados houve uma associação entre o diâmetro e o sucesso reprodutivo as árvores. Como não foram tomadas as alturas com precisão das árvores durante o levantamento, não foi possível determinar se as árvores de maior diâmetro têm maior sucesso reprodutivo devido a estas possuírem também maiores alturas permitindo assim que o pólen alcance maiores distâncias ou se possuem maiores quantidades de estruturas reprodutivas e, consecutivamente, liberam maiores

quantidades de pólen. Outros estudos em espécies polinizadas pelo vento tem demonstrado que árvores maiores tem maior sucesso na polinização (ODDOU-MURATORIO et al., 2003; SARO et al., 2014; KASSA; KONRAD; GEBUREK, 2018). Um padrão típico de polinização de acordo com a distância ou com o diâmetro das árvores não foi observado na área FECAV.

Por outro lado, a associação entre sucesso reprodutivo dos pais de maior sucesso reprodutivo em ambas as áreas não esteve associado com a distância média de polinização nem com o diâmetro das árvores. Esses resultados sugerem que para alguns indivíduos, a distância não é principal fator que contribui para sucesso reprodutivo. Possivelmente, para esses indivíduos o sucesso reprodutivo está ligado a características da biologia reprodutiva, como intensidade, época e duração do período de oferta de pólen por plantas macho e receptividade ao pólen por fêmeas (componente do valor adaptativo). Neste caso, a posição do planta na paisagem pode contribuir com seu sucesso reprodutivo.

### 3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As descobertas deste estudo sugerem que parte expressiva do fluxo de pólen de *Araucaria angustifolia* alcança longas distâncias de dispersão (acima de 500 metros), e aproximadamente 55% do pólen é oriundo de fora das populações estudadas, viajando através da paisagem de campo e capões de floresta. Assim, mesmo em uma situação de ausência de machos dentro da população até 55% da produção de sementes poderia ser mantida pela imigração de pólen. Esses resultados são importantes para entender a magnitude da dispersão de pólen na manutenção da variação genética, principalmente em populações pequenas em paisagens abertas, bem como, compreender como a conservação da paisagem pode contribuir para a manutenção da espécie.

Degradações ambientais causadas no interior de reservas florestais acarretarão em mudanças em seu entorno, sendo que o inverso também é verdadeiro, principalmente porque ignorar a paisagem do entorno de reservas florestais pode predispor estas ao declínio ecológico, causando uma erosão dos processos fundamentais do ecossistema (LAURANCE et al., 2012). Se as referidas mudanças ocorrerem também afetarão de forma negativa as características genéticas das populações.

Cada vez mais têm sido evidenciado que estratégias de conservação para *A. angustifolia* devam focar não somente em

fragmentos florestais, mas também na preservação de árvores isoladas em toda paisagem (MEDINA-MACEDO et al., 2015). Árvores isoladas ou pequenas populações localizadas próximas a populações maiores (florestas contínuas ou grandes fragmentos), tendem a produzir sementes com elevados níveis de diversidade e com condições de coleta muito mais fácil e segura do que dentro das florestas (MEDINA-MACEDO et al., 2016).

Tais considerações também cabem para as populações estudadas, notadamente para a realização de novos estudos, com a vantagem adicional de que as coletas não necessariamente precisam respeitar uma distância mínima entre as plantas mãe, devido à ausência de estrutura genética espacial. Além disso, outras constatações também se aplicam às populações estudadas, em que nenhum fragmento deve ser considerado tão pequeno para proteção (LANDER; BOSHIER; HARRIS, 2010), dada a efetiva contribuição que pequenos fragmentos e árvores isoladas têm para a reprodução da espécie, em populações em paisagens fragmentadas (WHITE; BOSHIER; POWELL, 2002; BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; LANDER; BOSHIER; HARRIS, 2010; MEDINA-MACEDO et al., 2015).

Outra contribuição científica deste estudo foi a comprovação da existência de diferenças no fluxo de pólen de *Araucaria angustifolia* para eventos reprodutivos de anos diferentes, o que demonstra que o ano é um fator de variação importante no fluxo de pólen da espécie, onde a polinização a nível de paisagem pode mudar ao longo dos anos. Esses resultados têm implicações na distribuição das distâncias de polinização e no sucesso reprodutivo de doadores de pólen. Complementarmente, em um ano pode ser observado uma relação inversa entre a movimentação de pólen de *Araucaria angustifolia* e a distância média entre as árvores, e no ano consecutivo essa constatação pode não se repetir. A variação anual no fluxo de pólen pode contribuir para uma composição mais diversa do pool de pólen a longo prazo. Pois, a variabilidade genética dentro da população é mais provável de ser mantida quando a dispersão é espacialmente ou temporalmente heterogênea ou diversa (IRWIN et al., 2003; NAKANISHI et al., 2005; IWAIZUMI et al., 2010, 2013). Contudo, considerações acerca das variações no fluxo gênico de plantas tem importantes consequências para questões aplicadas, nas quais a presença ou ausência e nível de fluxo gênico pode influenciar o resultado de uma decisão política, ações regulatórias e de manejo (ELLSTRAND, 2014). Portanto, as principais descobertas deste estudo demonstram que as informações acerca do fluxo gênico via pólen

de espécies longevas, como a *Araucaria angustifolia* não devem se basear em avaliações feitas em um único evento reprodutivo, principalmente se estas informações forem utilizadas para subsidiar programas de manejo, uso ou conservação.

### 3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHLEY, M. V. Plant Parentage, Pollination, and Dispersal: How DNA Microsatellites Have Altered the Landscape. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 3, p. 148–161, 2010.

AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P. E. Two-Generation Analysis of Pollen Flow Across a Landscape. II. Relation Between  $\Phi_t$ , Pollen Dispersal and Interfemale Distance. **Genetics**, v. 157, n. 2, p. 851 LP-857, 1 fev. 2001.

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; international journal of organic evolution**, v. 59, n. 5, p. 979–90, maio 2005.

BACLES, C. F. E.; ENNOS, R. a. Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior* L. in a chronically fragmented landscape. **Heredity**, v. 101, n. 4, p. 368–380, 2008.

BEHLING, H.; JESKE-PIERUSCHKA, V.; SCHÜLER, L.; PILLAR, V. Dinâmica dos campos no sul do Brasil durante o Quaternário Tardio. In: PILLAR, P. V.; MÜLLER, S. C.; CASTILHOS, Z. M. S.; JACQUES, A. V. A. (Ed.). **Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade**. 1. ed. Brasília: MMA, 2009. p. 13–24.

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

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Pollen movement within a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TwoGener analysis. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 4, p. 855–868, set. 2008.

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Genetic effects of forest fragmentation in high-density *Araucaria angustifolia* populations in Southern Brazil. **Tree Genetics & Genomes**, v. 5, n. 4, p. 573–582, 8 out. 2009.

BRAGA, A. C.; COLLEVATTI, R. G. Temporal variation in pollen dispersal and breeding structure in a bee-pollinated Neotropical tree. **Heredity**, v. 106, n. 6, p. 911–919, 2011.

BREED, M. F.; OTTEWELL, K. M.; GARDNER, M. G.; MARKLUND, M. H. K.; DORMONTT, E. E.; LOWE, A. J. Mating patterns and pollinator mobility are critical traits in forest fragmentation genetics. **Heredity**, v. 115, n. 2, p. 108–114, 4 ago. 2015.

BURCZYK, J.; ADAMS, W. T.; SHIMIZU, J. Y. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuate* Lemmon.) stand. **Heredity**, v. 77, n. 3, p. 251–260, set. 1996.

BURCZYK, J.; DIFAZIO, S. P.; ADAMS, W. T. Gene flow in forest trees: How far do genes really travel? **Forest Genetics**, v. 11, n. 3–4, p. 179–192, 2004.

CARNEIRO, F. da S.; DEGEN, B.; KANASHIRO, M.; DE LACERDA, A. E. B.; SEBBENN, A. M. High levels of pollen dispersal detected through paternity analysis from a continuous *Symphonia globulifera* population in the Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management**, v. 258, n. 7, p. 1260–1266, set. 2009.

COSTA, N. C. F.; GUIDOLIN, A. F.; VARGAS, O. F.; MANTOVANI, A. Efeitos da paisagem de campo e florestamento com *Pinus* na diversidade e estrutura genética de pequenas populações remanescentes de *Araucaria angustifolia*. **Scientia Forestalis**, v. 43, n. 107, p. 551–560, 2015.

DOW, B. D.; ASHLEY, M. V. Factors influencing male mating success in bur oak, *Quercus macrocarpa*. **New Forests**, v. 15, n. 2, p. 161–180, 1998.

ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant

Conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 217–242, 1993.

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

HAHN, C. Z.; MICHALSKI, S. G.; DURKA, W. Gene flow in, and mating system of *Rhododendron simsii* in a nature reserve in subtropical China. **Nordic Journal of Botany**, v. 35, n. 1, p. 1–7, fev. 2017.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T. a. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4(1), n. 1, p. 1–9, 2001.

HARPER, D. A. T. **Numerical palaeobiology: computer-based modelling and analysis of fossils and their distributions**. [s.l.] Wiley, 1999.

HOPLEY, T.; ZWART, A. B.; YOUNG, A. G. Among-population pollen movement and skewed male fitness in a dioecious weed. **Biological Invasions**, v. 17, n. 7, p. 2147–2161, 2015.

IRIARTE, J.; BEHLING, H. The expansion of Araucaria forest in the southern Brazilian highlands during the last 4000 years and its implications for the development of the Taquara/Itararé Tradition. **Environmental Archaeology**, v. 12, n. 2, p. 115–127, 2007.

IRWIN, A. J.; HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; SMOUSE, P. E. A multiyear estimate of the effective pollen donor pool for *Albizia julibriissin*. **Heredity**, v. 90, n. 2, p. 187–194, 2003.

IWAIZUMI, M. G.; TAKAHASHI, M.; ISODA, K.; AUSTERLITZ, F. Consecutive five-year analysis of paternal and maternal gene flow and contributions of gametic heterogeneities to overall genetic composition of dispersed seeds of *Pinus densiflora* (Pinaceae). **American Journal of Botany**, v. 100, n. 9, p. 1896–1904, 2013.

IWAIZUMI, M. G.; TAKAHASHI, M.; WATANABE, A.; UBUKATA, M. Simultaneous evaluation of paternal and maternal immigrant gene flow and the implications for the overall genetic composition of *Pinus densiflora* dispersed seeds. **Journal of Heredity**, v. 101, n. 2, p. 144–153, 2010.

JANZEN, D. H. The Future of Tropical Ecology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 17, n. 1, p. 305–324, 1986.

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**, v. 16, n. 5, p. 1099–1106, 2007.

KASSA, A.; KONRAD, H.; GEBUREK, T. Mating pattern and pollen dispersal in the wild olive tree (*Olea europaea* subsp. *cuspidata*). **Tree Genetics and Genomes**, v. 14, n. 1, 2018.

KLEIN, R. M. **Mapa fitogeográfico do estado de Santa Catarina**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1978.

KOKKO, H.; LÓPEZ-SEPULCRE, A. The ecogenetic link between demography and evolution: can we bridge the gap between theory and data? **Ecology Letters**, v. 10, n. 9, p. 773–782, set. 2007.

LANDER, T. A.; BOSHIER, D. H.; HARRIS, S. A. Fragmented but not isolated: Contribution of single trees, small patches and long-distance pollen flow to genetic connectivity for *Gomortega keule*, an endangered Chilean tree. **Biological Conservation**, v. 143, n. 11, p. 2583–2590, 2010.

LAURANCE, W. F.; CAROLINA USECHE, D.; RENDEIRO, J.; KALKA, M.; BRADSHAW, C. J. A.; SLOAN, S. P.; LAURANCE, S. G.; CAMPBELL, M.; ABERNETHY, K.; ALVAREZ, P.; ARROYO-RODRIGUEZ, V.; ASHTON, P.; BENÍTEZ-MALVIDO, J.; BLOM, A.; BOBO, K. S.; CANNON, C. H.; CAO, M.; CARROLL, R.; CHAPMAN, C.; COATES, R.; CORDS, M.; DANIELSEN, F.; DE DIJN, B.; DINERSTEIN, E.; DONNELLY, M. A.; EDWARDS, D.; EDWARDS, F.; FARWIG, N.; FASHING, P.; FORGET, P.-M.; FOSTER, M.; GALE, G.; HARRIS, D.; HARRISON, R.; HART, J.; KARPANTY, S.; JOHN KRESS, W.; KRISHNASWAMY, J.;

LOGSDON, W.; LOVETT, J.; MAGNUSSON, W.; MAISELS, F.; MARSHALL, A. R.; MCCLEARN, D.; MUDAPPA, D.; NIELSEN, M. R.; PEARSON, R.; PITMAN, N.; VAN DER PLOEG, J.; PLUMPTRE, A.; POULSEN, J.; QUESADA, M.; RAINEY, H.; ROBINSON, D.; ROETGERS, C.; ROVERO, F.; SCATENA, F.; SCHULZE, C.; SHEIL, D.; STRUHSAKER, T.; TERBORGH, J.; THOMAS, D.; TIMM, R.; NICOLAS URBINA-CARDONA, J.; VASUDEVAN, K.; JOSEPH WRIGHT, S.; CARLOS ARIAS-G., J.; ARROYO, L.; ASHTON, M.; AUZEL, P.; BABAASA, D.; BABWETEERA, F.; BAKER, P.; BANKI, O.; BASS, M.; BILA-ISIA, I.; BLAKE, S.; BROCKELMAN, W.; BROKAW, N.; BRÜHL, C. A.; BUNYAVEJCHEWIN, S.; CHAO, J.-T.; CHAVE, J.; CHELLAM, R.; CLARK, C. J.; CLAVIJO, J.; CONGDON, R.; CORLETT, R.; DATTARAJA, H. S.; DAVE, C.; DAVIES, G.; DE MELLO BEISIEGEL, B.; DE NAZARÉ PAES DA SILVA, R.; DI FIORE, A.; DIOSMOS, A.; DIRZO, R.; DORAN-SHEEHY, D.; EATON, M.; EMMONS, L.; ESTRADA, A.; EWANGO, C.; FEDIGAN, L.; FEER, F.; FRUTH, B.; GIACALONE WILLIS, J.; GOODALE, U.; GOODMAN, S.; GUIX, J. C.; GUTHIGA, P.; HABER, W.; HAMER, K.; HERBINGER, I.; HILL, J.; HUANG, Z.; FANG SUN, I.; ICKES, K.; ITOH, A.; IVANAUSKAS, N.; JACKES, B.; JANOVEC, J.; JANZEN, D.; JIANGMING, M.; JIN, C.; JONES, T.; JUSTINIANO, H.; KALKO, E.; KASANGAKI, A.; KILLEEN, T.; KING, H.; KLOP, E.; KNOTT, C.; KONÉ, I.; KUDAVIDANAGE, E.; LAHOZ DA SILVA RIBEIRO, J.; LATTKE, J.; LAVAL, R.; LAWTON, R.; LEAL, M.; LEIGHTON, M.; LENTINO, M.; LEONEL, C.; LINDSELL, J.; LING-LING, L.; EDUARD LINSENMAIR, K.; LOSOS, E.; LUGO, A.; LWANGA, J.; MACK, A. L.; MARTINS, M.; SCOTT MCGRAW, W.; MCNAB, R.; MONTAG, L.; MYERS THOMPSON, J.; NABE-NIELSEN, J.; NAKAGAWA, M.; NEPAL, S.; NORCONK, M.; NOVOTNY, V.; O'DONNELL, S.; OPIANG, M.; OUBOTER, P.; PARKER, K.; PARTHASARATHY, N.; PISCIOTTA, K.; PRAWIRADILAGA, D.; PRINGLE, C.; RAJATHURAI, S.; REICHARD, U.; REINARTZ, G.; RENTON, K.; REYNOLDS, G.; REYNOLDS, V.; RILEY, E.; RÖDEL, M.-O.; ROTHMAN, J.; ROUND, P.; SAKAI, S.; SANAIOTTI, T.; SAVINI, T.; SCHAAB, G.; SEIDENSTICKER, J.; SIAKA, A.; SILMAN, M. R.; SMITH, T. B.; DE ALMEIDA, S. S.; SODHI, N.; STANFORD, C.; STEWART, K.; STOKES, E.; STONER, K. E.; SUKUMAR, R.; SURBECK, M.; TOBLER, M.; TSCHARNTKE, T.; TURKALO, A.; UMAPATHY, G.; VAN WEERD, M.; VEGA RIVERA, J.; VENKATARAMAN, M.;

VENN, L.; VERA, C.; VOLKMER DE CASTILHO, C.; WALTER, M.; WANG, B.; WATTS, D.; WEBER, W.; WEST, P.; WHITACRE, D.; WHITNEY, K.; WILKIE, D.; WILLIAMS, S.; WRIGHT, D. D.; WRIGHT, P.; XIANKAI, L.; YONZON, P.; ZAMZANI, F. Averting biodiversity collapse in tropical forest protected areas. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 290–294, 25 set. 2012.

LEVIN, D. A. The Paternity Pools of Plants. **The American Naturalist**, v. 132, n. 3, p. 309–317, 1988.

LOURMAS, M.; KJELLBERG, F.; DESSARD, H.; JOLY, H. I.; CHEVALLIER, M.-H. Reduced density due to logging and its consequences on mating system and pollen flow in the African mahogany *Entandrophragma cylindricum*. **Heredity**, v. 99, n. 2, p. 151–160, 2 ago. 2007.

LOWE, A. J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C. F. E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, v. 95, n. 4, p. 255–273, 2005.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUIK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 5, p. 639–655, maio 1998.

MATTOS, J. R. **O pinheiro brasileiro**. 1 ed ed. Florianópolis: Editora UFSC, 2011.

MEAGHER, T. R. Analysis of Paternity within a Natural Population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of Most-Likely Male Parents. **The American Naturalist**, v. 128, n. 2, p. 199–215, 1986.

MEAGHER, T. R.; THOMPSON, E. The relationship between single parent and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. **Theoretical Population Biology**, v. 29, n. 1, p. 87–106, 1986.

MEDINA-MACEDO, L.; DE LACERDA, A. E. B.; SEBBENN, A. M.; RIBEIRO, J. Z.; SOCCOL, C. R.; BITTENCOURT, J. V. M.

Using genetic diversity and mating system parameters estimated from genetic markers to determine strategies for the conservation of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae). **Conservation Genetics**, v. 17, n. 2, p. 413–423, 2016.

MEDINA-MACEDO, L.; SEBBENN, A. M.; LACERDA, A. E. B.; RIBEIRO, J. Z.; SOCCOL, C. R.; BITTENCOURT, J. V. M. High levels of genetic diversity through pollen flow of the coniferous *Araucaria angustifolia*: a landscape level study in Southern Brazil. **Tree Genetics & Genomes**, v. 11, n. 1, p. 814, 2015.

MILLAR, M. A.; BYRNE, M.; NUBERG, I.; SEDGLEY, M. High outcrossing and random pollen dispersal in a planted stand of *Acacia saligna* subsp. *saligna* revealed by paternity analysis using microsatellites. **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, n. 3, p. 367–377, 11 jul. 2008.

MITTERMEIER, R. A.; TURNER, W. R.; LARSEN, F. W.; BROOKS, T. M.; GASCON, C. Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In: ZACHOS, F. E.; HABEL, J. C. (Ed.). **Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 3–22.

MYERS, N.; MITTERMIER, A. R.; MITTERMIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. February, p. 853–858, 2000.

NAKANISHI, A.; TOMARU, N.; YOSHIMARU, H.; MANABE, T.; YAMAMOTO, S. Interannual genetic heterogeneity of pollen pools accepted by *Quercus salicina* individuals. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 14, p. 4469–4478, 2005.

ODDOU-MURATORIO, S.; HOUOT, M. L.; DEMESURE-MUSCH, B.; AUSTERLITZ, F. Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 12, p. 3427–3439, 2003.

OTTEWELL, K.; GREY, E.; CASTILLO, F.; KARUBIAN, J. The pollen dispersal kernel and mating system of an insect-pollinated

tropical palm , *Oenocarpus bataua*. **Heredity**, v. 109, n. 6, p. 332–339, 2012.

PLUESS, A. R.; SORK, V. L.; DOLAN, B.; DAVIS, F. W.; GRIVET, D.; MERG, K.; PAPP, J.; SMOUSE, P. E. Short distance pollen movement in a wind-pollinated tree, *Quercus lobata* (Fagaceae). **Forest Ecology and Management**, v. 258, n. 5, p. 735–744, ago. 2009.

PRESS, W. H.; TEUKOLSKY, S. A.; VETTERLING, W. T.; FLANNERY, B. P.; COMPANY, E. Numerical Recipes in C. **The Art of Scientific Computing**. 2. ed. [s.l.] CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 1992.

SARO, I.; ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M. A.; SOSA, P. A. Patterns of pollen dispersal in a small population of the Canarian endemic palm (*Phoenix canariensis*). **Heredity**, v. 113, n. 3, p. 215–223, 2014.

SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; DA SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, v. 106, n. 1, p. 134–145, 2011.

SILVA, C. R. S.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; ERVEDOSA, F. R.; MOTA, J. W. S.; FIGUEIRA, A.; SEBBENN, A. M. Understanding the genetic diversity, spatial genetic structure and mating system at the hierarchical levels of fruits and individuals of a continuous *Theobroma cacao* population from the Brazilian Amazon. **Heredity**, v. 106, n. 6, p. 973–985, 2011.

SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H. Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. Australian **Journal of Botany**, 2003.

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**, v. 99, n. 4, p. 2038–2042, 19 fev. 2002.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 10, p. 413–418, 1996.

## 4 CAPÍTULO III – MOVIMENTAÇÃO DE PÓLEN EM *Araucaria angustifolia* E ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS AMBIENTAIS

### 4.1 INTRODUÇÃO

O fluxo de pólen é um fenômeno que têm sido amplamente investigado pela área genética de populações. O conhecimento das características da movimentação de pólen em populações naturais têm contribuído com diversas implicações para o manejo e conservação de espécies, incluindo a determinação dos níveis de ameaça, grau de isolamento de populações fragmentadas e contaminação com pólen indesejável. Aliar estudos de movimentação de pólen a variáveis ambientais pode ser útil no monitoramento do fluxo gênico de populações e assim verificar se o nível de fluxo é suficiente para continuação do processo evolutivo nas gerações atuais e futuras. Em uma ampla revisão sobre estudos que tratam da movimentação de pólen na paisagem via análises de parentesco, Ashley (2010) enfatiza que mais estudos no futuro deveriam combinar a atribuição de paternidade molecular com processos ecológicos de campo.

Uma das mais importantes informações que precisam ser geradas para a espécie florestais sujeitas a impactos pela fragmentação seria a realização de estudos que ligassem informações ecológicas e genéticas (LOWE et al., 2015). Fatores ecológicos como distribuição espacial da população, densidade e fenologia da floração, podem afetar o comportamento da polinização e, por sua vez, a distância de polinização de pólen (HANDEL, 1983; GHAZOUL, 2005). Adicionalmente, tem sido demonstrado que características ecológicas a nível de indivíduo, como altura da árvore, podem possuir associação o fluxo imigrante de pólen (HOPLEY; ZWART; YOUNG, 2015). Com isso, a taxa de fluxo de pólen dentro de uma população de espécie florestais é dependente do modo de polinização, isolamento de árvores próximas, características da paisagem, tamanho da população estudada e nível de fragmentação (AUSTERLITZ et al., 2004; BURCZYK; DIFAZIO; ADAMS, 2004; SORK; SMOUSE, 2006).

Em alguns casos as características da paisagem local como nível de fragmentação, uso do solo e topografia podem afetar a probabilidade de conectividade genética mais do que a própria distância entre árvores ou qualquer predisposição da árvore ou seus agentes polinizadores (LANDER; BOSHIER; HARRIS, 2010). Historicamente, parece haver

poucas evidências no que diz respeito a direção do pólen em espécies polinizadas pelo vento, bem como, a influência que a direção dos ventos predominantes exercem nos padrões de trocas genéticas dessas espécies (DOW; ASHLEY, 1998; PLUESS et al., 2009). Contudo, a influência de fatores do ambiente podem ser decisivos na movimentação de pólen e, conseqüentemente, no sucesso reprodutivo da espécie, principalmente em populações fragmentadas como é o caso da *Araucaria angustifolia*.

Por se tratar de uma espécie longeva e ameaçada de extinção, detalhar os padrões de fluxo gênico em *A. angustifolia* é importante e necessário para o monitoramento da história genética e evolutiva da espécie, aliado ao seu comportamento de acordo com o ambiente. Informações desta natureza permitem subsidiar estratégias adequadas de manejo e ou conservação que garantam a regeneração efetiva da espécie a longo prazo. Neste aspecto, alguns autores sugerem que a conservação da *Araucaria angustifolia* pode se desenvolver pelo incentivo a conservação pelo uso do recurso (REIS; LADIO; PERONI, 2014; REIS et al., 2018; ZECHINI et al., 2018). No entanto, este tipo de abordagem comumente utiliza as informações genéticas, ecológicas e botânicas (REIS et al., 2018), para testar se a conservação por si só ou aliada ao uso é capaz de garantir a manutenção da espécie. Dessa forma, o conhecimento do comportamento genético-ecológico da espécie é primordial para subsidiar a tomada de decisões. Com isso, o objetivo deste capítulo foi avaliar como variáveis ambientais podem influenciar o fluxo de pólen em uma população de *Araucaria angustifolia* presente em paisagem de campo.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Obtenção dos dados

Os dados genéticos foram obtidos a partir de coletas de 1300 sementes de *Araucaria angustifolia* provenientes de 18 plantas mãe, em três diferentes anos (400 sementes em 2015, 450 em 2016 e 450 em 2017). As coletas foram realizadas em uma população presente em paisagem de campo, localizada no município de Lages, SC, denominada neste estudo de Fazenda Santa Rita (FSR). A partir das coletas de sementes e também de acúculas das 186 árvores adultas da espécie, presentes dentro de uma parcela circular de 34,5 ha, foram realizadas reações de genotipagem com 12 marcadores microssatélites conforme metodologia descrita no Capítulo I deste documento. Após a obtenção

dos genótipos multilocus das amostras foram realizadas análises para determinação de paternidade das sementes, de acordo com a metodologia descrita no Capítulo II, item 2.2.3 deste documento. As informações genéticas avaliadas neste capítulo referem-se aos resultados da análise de paternidade de sementes da área FSR, obtidos no Capítulo II.

As variáveis ambientais foram obtidas a partir do levantamento demográfico realizado no interior da parcela circular da área FSR, conforme descrição no Capítulo I. O número de pinhões por pinha foi obtido a partir das coletas de sementes realizadas no anos de 2015, 2016 e 2017 (Anexo 2). Para obtenção das direções dos ventos predominantes e dos ventos de maior intensidade na região foram acessados os dados da estação meteorológica de Lages, disponibilizados digitalmente pelo Instituto Nacional de Meteorologia do Brasil (INMET, 2019). A estação está localizada nas sede da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI-Lages) a qual distancia-se cerca de 30 km da área de estudo.

A avaliação da época de maturação das sementes foi feita com base nas observações fenológicas no ano de 2016, nas 18 plantas mãe em que foram realizadas a coleta de sementes para análises da paternidade. Essas observações foram realizadas com intervalos de aproximadamente 20 dias entre observações, no período de abril a julho, época em que ocorre a maturação e queda dos pinhões. Após as avaliações foi feita uma classificação das plantas mãe de acordo com a época em que ocorria a maturação dos pinhões. As classes foram cedo (plantas com maturação dos pinhões a partir da segunda quinzena de abril e debulha total até o dia 23 de junho); e tarde (plantas que permaneciam com oferta de pinhões maduros ou ainda verdes após o dia 23 de junho). Além das avaliações fenológicas, foram usados, para classificação da época de oferta das sementes, o estágio de maturação dos pinhões, verificado durante as coletas realizadas nos anos de 2015, 2016 e 2017.

#### **4.2.2 Análise da época de oferta e paternidade de sementes**

A partir da classificação da época de oferta das sementes e dos resultados das análises de paternidade (conforme capítulo II), foi testado se plantas mães que ofertam sementes no cedo recebem pólen de grupos distintos de plantas mãe que ofertam sementes no tarde. A análise dos grupos de doadores de pólen foi determinada pelo índice de similaridade

de Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957), como base em uma matriz de abundância contendo, para cada planta mãe, o número de pais que contribuiu com a fertilização das sementes. Na interpretação dos resultados do índice de similaridade, 1 significa similaridade total, e 0 dissimilaridade total entre pais. Os padrões de agrupamentos foram então verificados por Escalonamento Multidimensional Não Métrico – NMDS (MINCHIN, 1987), a fim de ordenar os grupos de doadores de pólen e avaliar possíveis diferenças na composição destes de acordo com os indivíduos que os compõem. A segurança na interpretação da ordenação foi verificada pelo valor de STandardized RESidual Sum of Squares – STRESS, considerado seguro quando apresenta valores até 0,2 (KRUSKAL, 1964). Para visualização dos resultados do ordenamento dos grupos de pais foi gerado um gráfico do Escalonamento Multidimensional Não Métrico-NMDS. Essas análises foram computadas no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

#### 4.2.3 Associação entre variáveis genéticas e ambientais

A associação entre as variáveis genéticas e ambientais foi verificada utilizando-se uma análise de componentes principais (PCA). As variáveis com seus respectivos valores utilizadas na PCA estão listadas na Tabela 20. Primeiramente foi realizada uma padronização inicial assumindo uma única escala de dados, posteriormente, para possibilitar a interpretação e a visualização dos resultados foi gerado um gráfico de ordenação em função dos *scores* dos componentes principais (CP) obtidos para as variáveis e para as 18 plantas mãe analisadas (KENT, 2011).

O número de eixos (CP) usados na interpretação dos resultados da ordenação pôde ser determinado após a geração do gráfico *scree plot*. Na interpretação do gráfico *scree plot* são considerados CP significativos aqueles com número de variáveis sintetizadas (inércia) superior ao que ocorre considerando um modelo de distribuição aleatório (*Broken Stike*). A seleção das variáveis mais importantes na formação dos eixos foi verificada pelos valores de *loadings* (correlação de Pearson entre os scores de cada eixo e as variáveis). São considerados como significantes na análise valores de *loadings* superiores a 0,3 (MCGARIGAL; CUSHMAN; STAFFORD, 2013). Todas essas análises foram conduzidas utilizando-se a biblioteca

Vegan::prcomp, versão 2,3-0 (OKSANEN et al., 2010) do software R versão 3,2,2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

Tabela 20 – Valores das variáveis genéticas e ecológicas, utilizadas na análise de Componentes Principais (PCA), avaliados em 18 plantas mãe de *Araucaria angustifolia* presentes em paisagens de campo, no município de Lages, SC.

Variáveis	Sigla	Estimativa ± DP
<b>Genéticas - reprodutivas</b>		
Número efetivo médio de doadores de pólen	Nep	9,5±5,7
Distância média de polinização (m)	pol	176,4±88,7
Área de polinização efetiva média (ha)	Aep	30,0,8±0,7
Taxa média de migração de pólen	m	0,5±0,2
Número total de pais determinados	NPD	32,3±12,3
<b>Ambientais</b>		
Número médio de pinhões por pinha*	pin	84,8±21,6
Distância média par a par entre plantas mãe e pais potenciais (m)	par	320,2±57,9
Distância média até os 12 pais potenciais mais próximos (m)	viz	119,6±57,1
Número de pais potenciais nas distâncias 0 a 100 (m)	PP0.100	16,4±13,3
Número de pais potenciais nas distâncias 100 a 200 (m)	PP100.200	19,4±14,9
Número de pais potenciais nas distâncias 200 a 300 (m)	PP200.300	25,3±17,7
Número de pais potenciais nas distâncias 300 a 400 (m)	PP300.400	20,0±9,4
Número de pais potenciais nas distâncias 400 a 500 (m)	PP400.500	33,8±20,8
Número de pais potenciais nas distâncias acima de 500 (m)	PP500	20,1±12,5

DP: desvio padrão.

#### 4.2.4 Análise direcional da movimentação do pólen

A partir das variáveis de movimentação de pólen (obtidas no Capítulo II) de cada semente foi feita uma análise direcional obtida entre a planta mãe e a árvore doadora de pólen. Por convenção as direções obtidas (ângulo) tinham início no norte geográfico e aumentam em sentido horário (até completar 360 graus). Para visualização do padrão de dispersão das direções do pólen por planta mãe foram plotadas diagramas circulares, seccionados em oito partes iguais, onde o raio de cada secção corresponde a abundância proporcional das direções observadas dentro de cada secção. A direção média do fluxo de pólen em cada planta mãe foi calculado pela expressão:  $\bar{\theta} = \tan^{-1} \frac{\sum \text{sen } \theta_i}{\sum \text{cos } \theta_i}$  (BATSCHELET, 1981). O intervalo de confiança a 95% da direção média foi obtido a partir de 5000 replicações *bootstrap* e igualmente

plotado no gráfico circular. Posteriormente, foi utilizado o teste de Rayleigh para verificar a uniformidade da distribuição das direções observadas do fluxo de pólen, para isso o valor de R do teste é comparado contra uma distribuição aleatória (DAVIS; SAMPSON, 1986).

A partir do resultado do teste para verificar a uniformidade das direções de movimentação de pólen, as plantas mãe foram separadas em dois grupos: plantas mãe que possuem uma distribuição uniforme nas direções de movimentação de pólen e plantas mãe que possuem uma anisotropia na movimentação do pólen. Foi utilizado então o teste t de Student para verificar se existem diferenças significativas entre os grupos formados, para as médias de distância de movimentação de pólen e número pinhões por pinha avaliados para os anos de 2015, 2016 e 2017.

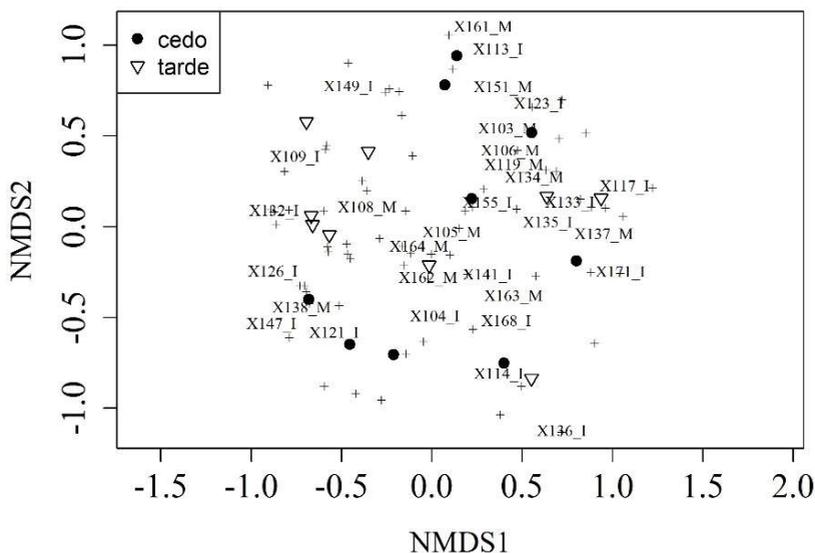
Correlações circulares foram feitas para verificar a associação entre a direção média do fluxo realizado de pólen por planta mãe e o ângulo médio de orientação das pinhas por planta mãe, o qual foi obtido no campo, no momento da coleta das pinhas feito nos anos de nos anos de 2016 e 2017. O teste utiliza o procedimento de correlação circular e teste de significância paramétrica de Jammalamadaka; Sengupta (2001). Para testar se o ângulo médio de orientação das pinhas foi o mesmo nos anos de 2016 e 2017 utilizou-se o teste paramétrico de Watson-Williams (MARDIA, 2014). Todas essas análises foram computadas no programa PAST 3.0 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Época de oferta e paternidade de sementes

Com um valor de STRESS de 0,1935, considerado seguro para interpretação da ordenação NMDS, os resultados da NMDS demonstram que não há formação de grupos distintos de doadores de pólen de acordo com a classificação da época de oferta das sementes por planta mãe (Figura 8). Os resultados sugerem então que não existe uma substituição no conjunto de doadores de pólen ao considerar as diferentes épocas de oferta de sementes da planta mãe de *Araucaria angustifolia*.

Figura 8 - Escalonamento Multidimensional Não Métrico - NMDS, gerado para os grupos de pais que polinizaram sementes de 18 plantas mães de *Araucaria angustifolia*, durante os anos de 2015, 2016 e 2017, em uma paisagem de campo no município de Lages.

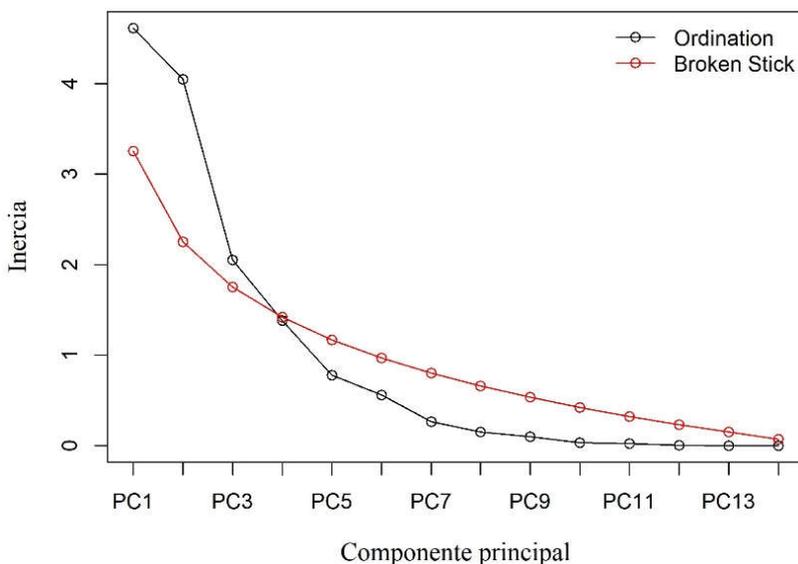


Fonte: Produção do próprio autor

### 4.3.2 Associação entre variáveis genéticas e ecológicas

A partir da interpretação do gráfico *scree plot* pode ser considerada segura a interpretação das variáveis utilizadas na PCA até o componente principal três (CP3), onde estão sintetizadas aproximadamente cinco variáveis no CP1 e cinco no CP2, com uma Inercia total de 13 variáveis. A partir do CP4 um padrão aleatório pode ser igualmente aceito, conforme demonstrado na linha vermelha da Figura 9.

Figura 9 – Gráfico *scree plot* onde a linha preta do gráfico (*Ordination*) corresponde ao número de variáveis sintetizadas pelos componentes principais e a linha vermelha corresponde ao padrão aleatório (*Broken Stike*).



Fonte: produção do próprio autor.

O PC1 foi responsável por explicar 32,9% da variação total dos dados onde juntamente com o CP2 e CP3 foram sintetizadas 76,51% da variação total dos dados. Dentre as variáveis analisadas, somente a taxa de migração de pólen (m) não apresentou valores de *loading* significativos (Tabela 21).

Inicialmente, na interpretação gráfica da PCA é possível observar a formação de agrupamentos condizente com a disposição das plantas mãe (Figura 10). Esses agrupamentos podem ser definidos da seguinte forma: agrupamento 1 (plantas mãe Aa9, Aa8 e Aa1); agrupamento 2 (plantas mãe Aa15; Aa16; Aa17 e Aa148); agrupamento 3 (plantas mãe Aa10; Aa11 e Aa12); agrupamento 4 (plantas mãe Aa2, Aa3, Aa04, Aa5, Aa6 e Aa7); e agrupamento 5 (plantas mãe Aa13 e Aa14). Visivelmente, esses mesmos agrupamentos podem também serem definidos espacialmente, de acordo com a disposição das plantas mãe na área de estudo (Figura 11).

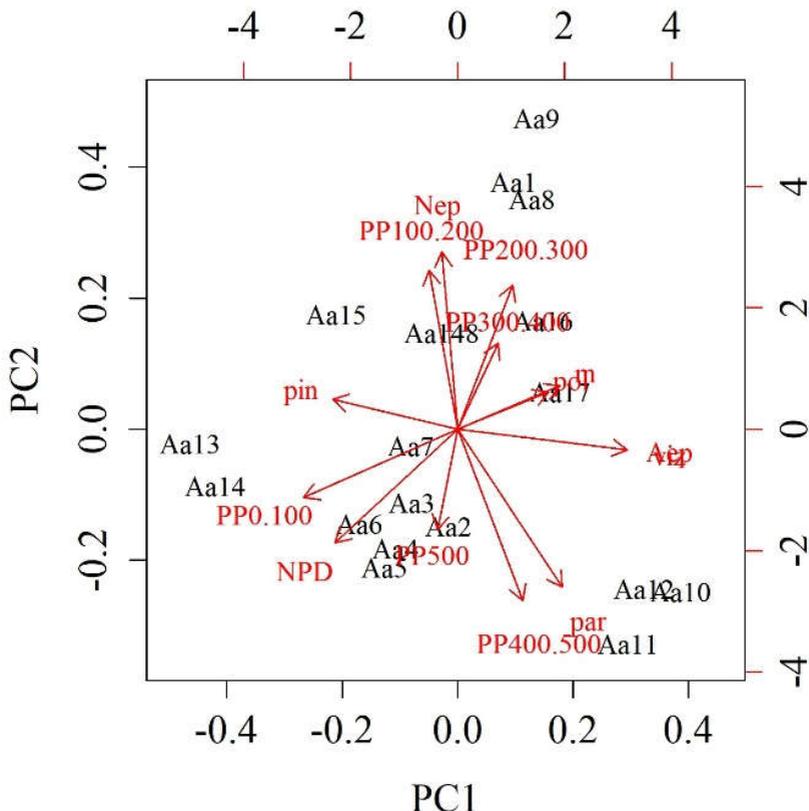
Tabela 21– Valores de *loading* (correlação de Pearson entre os scores de cada eixo e as variáveis) das variáveis utilizadas na análise de Componentes Principais (PCA).

Variável	CP1	CP2	CP3
Nep	-0,0401	0,4275*	0,2391
pol	0,2331	0,0908	-0,3576*
Aep	0,4351*	-0,0491	0,0933
m	0,2630	0,1047	0,0315
NPD	-0,3137*	-0,2749	-0,2439
pin	-0,3201*	0,0721	0,1549
par	0,2688	-0,3806*	0,1087
viz	0,4351*	-0,0491	0,0933
0.100	-0,3952*	-0,1650	-0,1823
PP100.200	-0,0734	0,3840*	0,2483
PP200.300	0,1413	0,3471*	-0,0456
PP300.400	0,1040	0,2078	-0,5623*
PP400.500	0,1679	-0,4136*	-0,0854
PP500	-0,0513	0,2426	0,5299*
Proporção acumulada da variação total (%)	32,94	61,85	76,51

\*valores significativos sintetizadas no componente principal.

No PC1 estão sintetizadas as variáveis área de polinização efetiva em m<sup>2</sup> (Aep) (*loading* = 0,4351), número de pais determinados (NPD) (*loading* = -0,3137), número de pinhões por pinha (pin) (*loading* = -0,3201), distância média em metros entre a planta mãe e os 12 pais potenciais mais próximos em metros (viz) (*loading* = 0,4351) e número de pais potenciais nas distâncias 0 a 100 metros (PP0.100) (*loading* = -0,3952) (Tabela 21). Vale destacar que na ordenação as variáveis com sinais iguais são correlacionadas entre si positivamente e as variáveis com sinais diferentes são correlacionadas negativamente entre si. Desta forma, no CP1, a localização dos vetores das variáveis NPD, pin, PP0.100 se localiza no lado esquerdo do eixo de ordenação do CP1 (sinais negativos). Já as variáveis Aep e viz (com sinais positivos) se localizam no lado direito da ordenação (Figura 10). No caso das plantas mãe Aa13 e Aa14, que formam o agrupamento 5, localizadas no lado esquerdo do gráfico da PCA, fica evidente uma associação deste agrupamento com maiores valores de pin, NPD e PP0.100 e, conseqüentemente, com menores valores de viz e Aep. Entretanto, localizado no outro lado do eixo do PC1, ficou o agrupamento 3, formado pelas plantas mãe Aa10, Aa11 e Aa12, possuindo uma associação positiva com viz e Aep.

Figura 10 – Distribuição das plantas mãe de *Araucaria angustifolia* e dos vetores das variáveis na análise de componentes principais - PCA. Quanto menor o ângulo formado entre vetores maior a correlação entre as variáveis.



Fonte: produção do próprio autor

O PC2 abrangeu 28,91% da variação total dos dados, tendo como variáveis significativas e com sinais negativos a distância média par a par para cruzamentos potenciais em metros (par) ( $loading = -0,3806$ ) e número de pais potencias nas distâncias 400 a 500 metros (PP400.500) ( $loading = -0,4136$ ). As variáveis significativas e com sinais positivos foram o número efetivo de polinizadores (Nep) ( $loading = 0,4275$ ), número de pais potencias nas distâncias 100 a 200 metros (PP100.200) ( $loading = 0,3840$ ) e número de pais potencias nas distâncias 200 a 300 metros (PP200.300) ( $loading = 0,3471$ ). Ao relacionar a interpretação da ordenação com a localização das plantas

mãe no gráfico têm-se o agrupamento 1, formado pelas plantas Aa09, Aa01 e Aa08 associados com os maiores valores de Nep, PP100.200 e PP200.300 e com os menores valores de par e PP400.500. Similarmente, o agrupamento 2, formado plantas mãe Aa15; Aa16; Aa17 e Aa148, teve uma posição na ordenação semelhante a do agrupamento 1, porém, com uma associação um pouco mais fraca com as variáveis Nep e PP100.200. Localizado na parte inferior da PC2, no gráfico da PCA, o agrupamento 4, formado pelas plantas mãe Aa2, Aa3, Aa04, Aa5, Aa6 e Aa7 teve uma associação positiva com a variável PP500, sintetizada no PC3.

Figura 11 – Imagem da distribuição espacial das 18 plantas mãe de *Araucaria angustifolia* utilizadas para análises das variáveis genéticas e ambientais. Círculo vermelho representa a área da parcela (43,7 ha), círculos tracejados representam os agrupamentos formados pelas plantas mãe (pontos brancos).

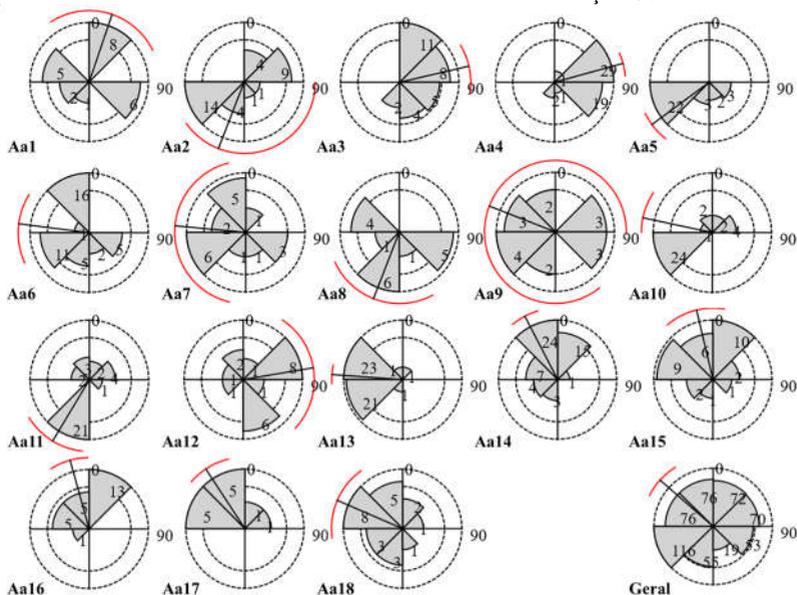


Fonte: Google earth.

### 4.3.3 Análise direcional da movimentação do pólen

O ângulo médio da movimentação de pólen foi de 311,52 graus, com intervalos confiança a 95% inferior e superior de 396,3 e 327,8 graus, respectivamente. Ao analisar as 18 plantas mãe em geral, houve uma direção preferencial significativa na movimentação do pólen ( $R = 0,22$ ;  $p = 3,8.10^{-9}$ ). Esse resultado demonstra que a direção predominante da polinização foi correspondente ao quadrante noroeste. Embora, houve uma grande variação na direção da polinização entre as plantas mãe avaliadas (Figura 12).

Figura 12 – Análise direcional da movimentação de pólen em *Araucaria angustifolia* em 18 plantas mãe localizadas em uma paisagem de campo no município de Lages, SC. Os vetores indicam o ângulo médio da direção de pólen e linhas em vermelho indicam o intervalo de confiança a 95%.



Fonte: produção do próprio autor.

A análise da distribuição das direções da movimentação de pólen feita pelo teste de Rayleigh, por planta mãe demonstrou que houve uma direção preferencial significativa ( $p < 0,05$ ) para 14 das 18 plantas mãe avaliadas (Aa1, Aa3, Aa4, Aa5, Aa6, Aa8, Aa10, Aa11, Aa13, Aa14,

Aa15, Aa16, Aa17e 148). As outras quatro plantas mãe (Aa2, Aa7, Aa9 e Aa12) apresentaram uma distribuição uniforme da movimentação de pólen ( $p > 0,05$ ). As plantas com direção preferencial da movimentação de pólen apresentaram uma distância média de polinização de 157,7 m, e número médio de sementes por pinha igual a 80. Já as plantas com distribuição uniforme da movimentação de pólen apresentaram valores de distância média de polinização e número médio de pinhões por pinha de 154,6 m e 86, respectivamente. Não houve diferença significativa pelo teste t entre as médias dos valores de distância de movimentação de pólen ( $p = 0,87$ ) e a média do número de sementes por pinha ( $p = 0,22$ ), para plantas com e sem direção preferencial da movimentação de pólen.

A média do ângulo de orientação das pinhas no ano de 2016 foi de 171,1 graus e no ano de 2017 foi de 199,7. A comparação das médias do ângulo de orientação das pinhas pelo teste de Watson-Williams demonstrou que não houve diferença significativa entre os anos ( $U = 0,17$ ;  $p = 0,67$ ). Houve uma correlação circular significativa entre orientação das pinhas na planta mãe e a direção da movimentação de pólen observada no ano de 2016, conforme verificado pelo teste Jammalamadaka-Sengupta ( $R = 0,49$ ;  $p = 0,017$ ). Entretanto, essa correlação não foi significativa para o ano de 2017 ( $R = 0,25$ ;  $p = 0,27$ ).

## 4.4 DISCUSSÃO

### 4.4.1 Época de oferta e paternidade de sementes

Não foi detectado um padrão de substituição na paternidade das sementes de acordo com a época de oferta de sementes pela planta mãe. Este fato pode estar relacionado as características evolutivas intrínsecas da espécie *Araucaria angustifolia*, como um período de liberação de pólen que pode alcançar até três meses de duração, processo que pode ser decorrente de uma adaptação para aumentar o sucesso de polinização, pois o vento promove uma dispersão difusa do pólen com altas taxas de perda (IOB; VIEIRA, 2008). Outro fator que poderia estar relacionado a esse resultado seria a intensidade na produção de estruturas reprodutivas, que pode ser muito variável de um ano para o outro (MANTOVANI; MORELLATO; REIS, 2004). Dessa forma, as diferenças significativas na movimentação de pólen entre os anos avaliados, conforme observado no Capítulo II, podem ter mascarado a formação de grupos na análise geral que considerou os resultados dos três anos em conjunto. Além disso, a distância entre plantas mãe e pais

potenciais podem representar um efeito significativo nos padrões de dispersão de pólen de *Araucaria angustifolia*.

A época de oferta de sementes por plantas mãe de *Araucaria angustifolia* não foi determinante na formação de grupos de pais preferenciais para fertilização das sementes. No entanto, conforme já demonstrado para *Araucaria angustifolia*, existe uma separação quanto a época maturação das sementes associada a diferentes variedades (REITZ; KLEIN, 1966; ADAN et al., 2016). A variação temporal na fenologia do florescimento do indivíduo pode afetar significativamente a disponibilidade de plantas disponíveis para cruzamento (BACLES; ENNOS, 2008). Gérard et al. (2006), não apenas descobriram que plantas com floração concomitante estavam distribuídos irregularmente no espaço em uma zona híbrida de *Fraxinus angustifolia* e *F. excelsior*, como também detectaram uma assimetria no sucesso reprodutivo masculino, com árvores que florescem mais cedo participando mais como doadores de pólen, do que árvores com florescimento mais tardio.

A polinização em *Araucaria angustifolia* ocorreu independentemente da época de maturação das sementes. Dessa forma, apesar de existirem indícios para presença de variedades em plantas femininas (REITZ; KLEIN, 1966; MATTOS, 2011; ADAN et al., 2016), isso possivelmente não ocorre em plantas do sexo masculino em *A. angustifolia*. Do ponto de vista evolutivo, isso pode indicar que ainda não há uma separação clara para variedades, pois a maturação das sementes parece ser um fator ligado somente a planta mãe. Similarmente, características ecológicas como a dioecia e a longevidade podem contribuir para a não fixação ou manutenção das etnovariedades em *A. angustifolia* (ADAN et al., 2016). Contudo, sugere-se que novos estudos sejam realizados para verificar se a presença de variedades também ocorre para plantas masculinas. Pois, essas descobertas trazem importantes contribuições tanto para o potencial econômico da espécie, quanto para conservação de seus recursos.

#### **4.4.2 Associação da movimentação de pólen por matriz com outras variáveis**

A taxa de migração ( $m$ ) foi a única do conjunto das 14 variáveis analisadas que não atingiu um valor de *loading* acima do valor mínimo de 0,3, considerado para a variável ser significativa. Na interpretação da PCA, os vetores das variáveis taxa de migração e distância média de

polinização apresentaram uma alta correlação. Assim, o uso das informações dessas duas variáveis individualmente ou conjuntamente afeta muito pouco o resultado da análise.

Com relação a PCA (Figura 10), inicialmente a definição de agrupamentos de acordo com a disposição das plantas mãe no gráfico, não foi o foco principal da análise. No entanto, esse fato chamou atenção principalmente porque esses mesmos agrupamentos podem ser definidos de acordo com a distribuição espacial das plantas mãe na área de estudo. Isso indica que a distribuição espacial das plantas é um componente forte na determinação da movimentação de pólen. Isso pode ter ocorrido pelo fato da maior parte das variáveis analisadas se basearem em informações de distâncias entre indivíduos ou número de indivíduos por classe da distância.

Ao analisar o PC1 é possível verificar que as plantas Aa13 e Aa14, que formam o possível agrupamento 5, tiveram uma associação com maiores valores de pin, NPD e PP0.100, e conseqüentemente com menores valores de viz e Aep. A localização destas plantas no capão em que ocorre a maior concentração de plantas, comparativamente aos demais capões presentes na área de estudo, pode ser uma possível explicação para os resultados encontrados. Pois, a associação com os menores valores de distância da planta mãe até os 12 pais mais próximos (viz) e área de polinização efetiva (Aep), indica que houve em geral um menor deslocamento do pólen a partir do pai até a planta mãe. Isso é também observado na associação com a variável número de pais potenciais na classe de distância de zero a 100 m. Conseqüentemente, essa movimentação mais curta de fluxo de pólen possibilitou que um maior número de pais fossem determinados (NPD) na análise de paternidade. Resultados similares são demonstrados em um estudo sobre o fluxo de pólen conduzido em populações fragmentadas de *Gomortega keule* no Chile, onde correlações significativas foram encontradas entre o número árvores adultas e o número de doadores de pólen por planta mãe (LANDER; BOSHIER; HARRIS, 2010). Ainda, a maior proximidade dessas plantas mãe com pais potenciais podem ter contribuído com a produtividade dessas plantas, evidenciado pela associação com maiores valores de número de pinhões por pinha.

Ainda na análise do PC1, as plantas Aa10, Aa11 e Aa12, que formam o agrupamento 3, permaneceram no lado oposto do eixo da CP1, comparativamente ao agrupamento anterior. A única variável significativa para o CP1, que poderia explicar esse resultado é a área de polinização efetiva (Aep). Ao analisar a área de estudo as plantas do

agrupamento 3 são as que se encontram mais isoladas. Além disso, diferentemente das demais, essas plantas mãe estão localizadas em uma área de campo e não dentro de um capão. Conseqüentemente, o maior isolamento dessas plantas fez com que estas ficassem associadas aos maiores valores de área de polinização efetiva.

Saro et al. (2014), ao estudarem a associação de variáveis demográficas com fluxo de pólen em populações de *Phoenix canariensis*, encontraram que a correlação de paternidade por planta mãe não tem correlação significativa com as variáveis distância média da planta mãe com todos os machos, nem com a distância até o macho mais próximo. Resultados similares podem ser observados no presente estudo, levando-se em consideração que a correlação de paternidade representa o mesmo tipo de informação que o número efetivo de doadores de pólen (para mais detalhes vide Capítulo 1). No entanto, associações com valores de *Nep* foram encontrados com outras variáveis analisadas. Os vetores das variáveis sintetizadas no CP2 indicam, pela correlação positiva entre as variáveis, que o número efetivo de doadores de pólen (*Nep*) é maior quanto maior o número de pais disponíveis para cruzamento nas classes de distâncias de 100 a 200 e 200 a 300 metros. Por outro lado, o *Nep* é inversamente correlacionado com o número de pais potenciais nas classes de distância de 400 a 500 e com a distância média par a par para ocorrência de cruzamentos, que foi de 320 m. Esses resultados indicam que o *Nep* alcança seus maiores valores quando as distâncias entre a planta mãe e os pais potenciais variam de 100 a 300 m, e diminui à medida que essas distâncias aumentam.

Associado a esses resultados estão as plantas mãe Aa09, Aa01 e Aa08 (agrupamento 1), as quais se encontram na região central da área de estudo, portanto mais equidistantes das demais plantas da espécie. A posição central possivelmente contribuiu para que um maior número efetivo de doadores de pólen fosse encontrado nessas plantas. Os possíveis agrupamentos 2 e 4, cada um em uma posição distinta no gráfico (Figura 10), ficaram associados com diversas variáveis, porém, com pouco destaque em relação aos agrupamentos mencionados anteriormente.

Características da movimentação de pólen para uma espécie dioica foram também investigadas em populações de *Salix cinerea* por Hopley; Zwart; Young, (2015). Esses autores avaliaram variáveis relacionadas ao indivíduo como altura, tamanho do dossel, intensidade de floração e também variáveis relacionadas ao local como distância até a planta mais próxima e a distância até a borda. Os resultados

encontrados por estes autores demonstraram que nenhuma outra variável referente a árvore ou ao local correlacionou-se com os níveis de imigração de pólen, exceto a altura da planta mãe. Hopley; Zwart; Young, (2015), sugerem que a movimentação de pólen é abundante e distribuída por todo o local de estudo, com todas as árvores capazes de receber pólen de fora do local, independentemente de sua localização, situação semelhante a encontrada no presente estudo.

Com ralação a influência de características demográficas no fluxo de pólen, Vranckx et al. (2014) ao estudarem o fluxo de pólen em populações de *Quercus robur*, demonstraram que a densidade de árvores é inversamente correlacionada com a distância de dispersão e também com o fluxo de pólen oriundo de fora da parcela avaliada. Outros estudos também demonstram que a baixa densidade de árvores da mesma espécie aumenta a distância média do fluxo realizado de pólen (ROBLEDO-ARNUNCIO et al., 2004; BACLES; ENNOS, 2008; WANG et al., 2010; SARO et al., 2014)

#### **4.4.3 Análise direcional da movimentação do pólen**

Pelo menos 50% fluxo de pólen de *Araucaria angustifolia* é oriundo de fora da população estudada, conforme relatado no Capítulo II deste documento. Com a isso a análise da direção da movimentação de pólen investigada neste estudo representa apenas uma porção do que pode ocorrer para espécie. Contudo, essas informações são escassas para *Araucaria angustifolia* e este estudo é o primeiro a explorar essas informações a um nível individual para plantas da espécie.

Os resultados encontrados indicaram que a presença de anisotropia, que pode ser entendida como a direção preferencial da movimentação de pólen, não ocorreu em todas plantas analisadas, porém ocorreu em pelo menos 77% delas. Assim, a investigação desses tipos de fatores é importante para determinação dos padrões de movimentação de pólen. Ao negligenciar um efeito de anisotropia no fluxo de pólen pode ser produzida uma subestimativa da média de dispersão de pólen (AUSTERLITZ et al., 2007).

A análise das plantas mãe em geral demonstrou que a direção preferencial da movimentação de pólen ocorreu no sentido noroeste. Entretanto, a direção preferencial dos ventos na região, na época em que as sementes foram polinizadas (i.e. anos de 2013, 2014 e 2015), nos três anos avaliados ocorreu no sentido nordeste. A direção dos ventos de maior intensidade para o mesmo período ocorreram nos sentidos oeste,

noroeste e nordeste, nos anos de 2013, 2014 e 2015, respectivamente (INMET, 2019). Somente no evento reprodutivo de 2016, cuja polinização ocorreu em 2014, a direção preferencial da movimentação de pólen e a direção dos ventos de maior intensidade ocorreram no mesmo sentido. Assim, é provável que essa constatação possa estar ligada com os resultados encontrados no Capítulo I e II, pois o ano de 2016 apresentou as maiores distâncias de polinização, sucesso reprodutivo e diversidade genética das sementes.

O número de pinhões por pinha e a distância de polinização não diferiram para as plantas mãe que apresentaram diferentes padrões nas direções de movimentação de pólen. Isso indica que a presença da anisotropia na movimentação de pólen não interferiu significativamente no número pinhões por pinha nem na distância de polinização. Conforme mencionado anteriormente, o número de pinhões por pinha pode ser afetado por um maior número de pais disponíveis para cruzamentos localizados próximos da planta mãe.

Embora a média do ângulo de orientação das pinhas não diferiu significativamente entre os anos de 2016 e 2017, a análise circular demonstrou que direção da movimentação de pólen por planta mãe foi dependente da orientação das pinhas no ano de 2016, porém, foi independente no ano de 2017. Isso demonstra que a orientação das pinhas na planta mãe é um fator que pode estar relacionado a direção da movimentação de pólen. No entanto, outros fatores podem ser determinantes na direção da polinização ao longo dos anos. Resultados semelhantes, acerca das variações na movimentação de pólen entre os anos, são apresentados no Capítulo II.

Alguns estudos tem demonstrado um efeito leve de anisotropia na movimentação de pólen em espécies polinizadas pelo vento (e.g., BURCZYK; ADAMS; SHIMIZU, 1996; ROBLEDO-ARNUNCIO; GIL, 2005). Associado a esses eventos, efeitos da direção do vento no fluxo de pólen foram encontrados em *Pinus sylvestris* (ROBLEDO ARNUNCIO 2005). No entanto, tem sido demonstrado uma influência fraca dos ventos regionais predominantes na direção da dispersão de pólen (AUSTERLITZ et al., 2007; PLUESS et al., 2009). Por outro lado, assim como os resultados encontrados para *A. angustifolia*, em populações naturais de *Olea europaea* a direção predominante do vento na região não coincide com a direção verificada da movimentação do pólen (KASSA; KONRAD; GEBUREK, 2018)

Dos fatores que podem ser levantados para explicar o fluxo de pólen anisotrópico, estão não somente as direções predominantes do

vento nas escalas regionais, mas também a possível variação ao longo dos anos para os ventos locais, bem como as turbulências do ar criadas no dossel da vegetação (SARO et al., 2014). Ventos em paisagens abertas, situação semelhante a do presente estudo, são tipicamente mais fortes do que ventos em uma matriz florestal com dossel fechado (BACLES et al., 2005b). Além disso, a direção preferencial na dispersão de pólen pode ser causado pela distribuição desigual de árvores no local, dispersão restrita no espaço e ao sucesso reprodutivo masculino desigual, assim, o número e a distribuição de potenciais doadores de pólen em populações pequenas podem influenciar fortemente os padrões de dispersão efetiva do pólen (ROBLEDO ARNUNCIO 2005).

#### 4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível que as plantas mãe avaliadas neste estudo não representem claramente os diferentes períodos de oferta de sementes existentes para a espécie *Araucaria angustifolia*. Recomenda-se adicionar na análise de futuros trabalhos com este tema, plantas que possuam “variedades” bem contrastantes em relação a época de maturação das sementes. Por exemplo, algumas “etnovarietades” de *A. angustifolia* com essas características são conhecidas popularmente como “25 de março”, cuja maturação da maior parte das sementes (71%) ocorre no mês de março e “macaco” que tem maturação a partir do mês de agosto (ADAN et al., 2016). Sobretudo, os resultados encontrados demonstram que plantas masculinas podem contribuir com a fertilização das sementes independentemente da época em que a planta mãe as ofertam. Essas informações permitem subsidiar planos de coleta de sementes, conservação, bem como na elaboração de leis adequadas para proteção da e manejo da espécie, que efetivamente garantam a manutenção de seus recursos.

É importante ressaltar que algumas das pressuposições sobre a influência de variáveis ecológicas no fluxo de pólen de *Araucaria angustifolia*, levantadas neste capítulo, são baseadas em uma análise exploratória inicial. No entanto, trazem contribuições que podem nortear novos estudos, permitindo o avanço no conhecimento acerca da movimentação de pólen e sua associação com o ambiente.

A falta de dados sobre a direção do vento local e nossa amostragem não exaustiva na coleta de sementes em todos os quadrantes da planta mãe, pode ter impedido a observação de um padrão detalhado da influência dos ventos na movimentação do pólen. Além

disso, a movimentação do pólen a longas distâncias, principalmente em paisagens abertas como a do presente estudo, podem dificultar a determinação da origem do pólen. Pois, mesmo em uma parcela com área de 34 ha, mais da metade do pólen foi oriundo de fora da parcela, porção bastante expressiva, que pode ter uma grande influência na real movimentação de pólen. Como a direção da movimentação do pólen foi dependente da orientação das pinhas, em pelo menos um dos anos avaliados, recomenda-se que a coleta de sementes, para abranger a maior variação genética possível seja feita em todos os quadrantes da árvore.

#### 4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOBO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology*, v. 17, n. 24, p. 5177–5188, dez. 2008.

ADAN, N.; ATCHISON, J.; REIS, M. S. dos; PERONI, N. Local knowledge, use and management of ethnovarieties of *Araucaria angustifolia* (Bert.) Ktze. in the Plateau of Santa Catarina, Brazil. **Economic Botany**, v. 70, n. 4, p. 353–364, 2016.

ASHLEY, M. V. Plant Parentage, Pollination, and Dispersal: How DNA Microsatellites Have Altered the Landscape. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 3, p. 148–161, 2010.

AUSTERLITZ, F.; DICK, C. W.; DUTECH, C.; KLEIN, E. K.; ODDOU-MURATORIO, S.; SMOUSE, P. E.; SORK, V. L. Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 4, p. 937–954, 2004.

AUSTERLITZ, F.; DUTECH, C.; SMOUSE, P. E.; DAVIS, F.; SORK, V. L. Estimating anisotropic pollen dispersal: a case study in *Quercus lobata*. p. 193–204, 2007.

BACLES, C. F. E.; BURCZYK, J.; LOWE, A. J.; ENNOS, R. A. HISTORICAL AND CONTEMPORARY MATING PATTERNS IN REMNANT POPULATIONS OF THE FOREST TREEFRAXINUS EXCELSIOR L. **Evolution**, v. 59, n. 5, p. 979–990, maio 2005.

BACLES, C. F. E.; ENNOS, R. a. Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior* L. in a chronically fragmented landscape. **Heredity**, v. 101, n. 4, p. 368–380, 2008.

BATSCHULET, E. **Circular statistics in biology**. [s.l.] Academic press London, 1981. v. 111

BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. **Ecological monographs**, v. 27, n. 4, p. 325–349, 1957.

BURCZYK, J.; ADAMS, W. T.; SHIMIZU, J. Y. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon.) stand. **Heredity**, v. 77, n. 3, p. 251–260, 1996.

BURCZYK, J.; DIFAZIO, S. P.; ADAMS, W. T. Gene flow in forest trees: How far do genes really travel? **Forest Genetics**, v. 11, n. 3–4, p. 179–192, 2004.

DAVIS, J. C.; SAMPSON, R. J. **Statistics and data analysis in geology**. [s.l.] Wiley New York et al., 1986. v. 646

DOW, B. D.; ASHLEY, M. V. Factors influencing male mating success in bur oak, *Quercus macrocarpa*. **New Forests**, v. 15, n. 2, p. 161–180, 1998.

GÉRARD, P. R.; KLEIN, E. K.; AUSTERLITZ, F.; FERNÁNDEZ-MANJARRÉS, J. F.; FRASCARIA-LACOSTE, N. Assortative mating and differential male mating success in an ash hybrid zone population. **BMC evolutionary biology**, v. 6, p. 96, 2006.

GHAZOUL, J. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. **Biological Reviews**, v. 80, n. 03, p. 413, 13 ago. 2005.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T. a. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4(1), n. 1, p. 1–9, 2001.

HANDEL, S. N. Pollination ecology, plant population structure, and gene flow. In: REAL, L. (Ed.). **Pollination Biology**. Orlando: Academic Press, 1983. p. 163–212.

HOPLEY, T.; ZWART, A. B.; YOUNG, A. G. Among-population pollen movement and skewed male fitness in a dioecious weed. **Biological Invasions**, v. 17, n. 7, p. 2147–2161, 2015.

INMET. **Instituto Nacional de Meteorologia**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>>. Acesso em: 16 fev. 2019.

IOB, G.; VIEIRA, E. M. Seed predation of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) in the Brazilian Araucaria Forest: Influence of deposition site and comparative role of small and “large” mammals. **Plant Ecology**, v. 198, n. 2, p. 185–196, 2008.

JAMMALAMADAKA, S. R.; SENGUPTA, A. **Topics in circular statistics**. [s.l.] world scientific, 2001. v. 5

KASSA, A.; KONRAD, H.; GEBUREK, T. Mating pattern and pollen dispersal in the wild olive tree (*Olea europaea* subsp. *cuspidata*). **Tree Genetics and Genomes**, v. 14, n. 1, 2018.

KENT, M. **Vegetation description and data analysis: a practical approach**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2011.

KRUSKAL, J. B. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. **Psychometrika**, v. 29, n. 2, p. 115–129, 1964.

LANDER, T. A.; BOSHIER, D. H.; HARRIS, S. A. Fragmented but not isolated: Contribution of single trees, small patches and long-distance pollen flow to genetic connectivity for *Gomortega keule*, an endangered Chilean tree. **Biological Conservation**, v. 143, n. 11, p. 2583–2590, 2010.

LOWE, A. J.; CAVERS, S.; BOSHIER, D.; BREED, M. F.; HOLLINGSWORTH, P. M. The resilience of forest fragmentation genetics—no longer a paradox—we were just looking in the wrong place. **Heredity**, v. 115, n. 2, p. 97–99, 2015.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P. C.; REIS, M. S. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 4, p. 787–796, 2004.

MARDIA, K. V. **Statistics of directional data**. [s.l.] Academic press, 2014.

MCGARIGAL, K.; CUSHMAN, S. A.; STAFFORD, S. **Multivariate statistics for wildlife and ecology research.** [s.l.] Springer Science & Business Media, 2013.

MINCHIN, P. R. An evaluation of the relative robustness of techniques for ecological ordination. In: **Theory and models in vegetation science.** [s.l.] Springer, 1987. p. 89–107.

OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; OHARA, R. B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H.; WAGNER, H. Vegan: community ecology package. R package version 1.17-4. <http://cran.r-project.org>. Acesso em, v. 23, p. 2010, 2010.

PLUESS, A. R.; SORK, V. L.; DOLAN, B.; DAVIS, F. W.; GRIVET, D.; MERG, K.; PAPP, J.; SMOUSE, P. E. Short distance pollen movement in a wind-pollinated tree, *Quercus lobata* (Fagaceae). **Forest Ecology and Management**, v. 258, n. 5, p. 735–744, ago. 2009.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>. Vienna, Austria, 2015.

REIS, M. S. dos; LADIO, A.; PERONI, N. Landscapes with Araucaria in South America: evidence for a cultural dimension. **Ecology and Society**, v. 19, n. 2, p. art43, 2014.

REIS, M. S.; MONTAGNA, T.; MATTOS, A. G.; FILIPPON, S.; MARQUES, A. da C.; ZECHINI, A. A.; PERONI, N.; MANTOVANI, A. Domesticated landscapes in Araucaria forests, Southern Brazil: A multispecies local conservation-by-use system. **Frontiers in Ecology and Evolution**, 2018.

REITZ, R.; KLEIN, R. M. Araucariáceas. In: REITZ, R. (Ed.). **Flora Ilustrada Catarinense.** Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1966. p. 62.

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**, v. 94, n. 1, p. 13–22, 2005.

ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; SMOUSE, P. E.; GIL, L.; ALÍA, R. Pollen movement under alternative silvicultural practices in native

populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in central Spain. **Forest Ecology and Management**, v. 197, n. 1–3, p. 245–255, 2004.

SARO, I.; ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M. A.; SOSA, P. A. Patterns of pollen dispersal in a small population of the Canarian endemic palm (*Phoenix canariensis*). **Heredity**, v. 113, n. 3, p. 215–223, 2014.

SORK, V. L.; SMOUSE, P. E. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. **Landscape Ecology**, v. 21, n. 6, p. 821–836, ago. 2006.

VRANCKX, G.; MERGEAY, J.; COX, K.; MUYS, B.; JACQUEMYN, H.; HONNAY, O. Tree density and population size affect pollen flow and mating patterns in small fragmented forest stands of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). **Forest Ecology and Management**, v. 328, p. 254–261, 2014.

WANG, H.; SORK, V. L.; WU, J.; GE, J. Effect of patch size and isolation on mating patterns and seed production in an urban population of Chinese pine (*Pinus tabulaeformis* Carr.). **Forest Ecology and Management**, v. 260, n. 6, p. 965–974, ago. 2010.

ZECHINI, A. A.; LAUTERJUNG, M. B.; CANDIDO-RIBEIRO, R.; MONTAGNA, T.; BERNARDI, A. P.; HOELTGEBAUM, M. P.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. dos. Genetic conservation of brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) through traditional land use. **Economic Botany**, v. 72, p. 1–14, 2018.

## 5 CAPÍTULO IV - ESTIMATING GENOTYPING DEVIATIONS FROM FIRST-DEGREE RELATIVES IN *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* *Araucaria angustifolia*

### 5.1 INTRODUCTION

The impacts of habitat degradation on the genetic diversity of forest species can be seen in the short and long-term (HAMRICK, 2004; LOWE et al., 2015). Short-term effects are more evident in seedlings and seeds produced after the disturbance (HAMRICK, 2004), while long-term effects are less detectable and are associated with increased levels of inbreeding and genetic drift, linked to genetic isolation due to reduced gene flow caused by fragmentation (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996b). One way to access these evolutionary processes is to use of microsatellite markers, which through genetic diversity studies and paternity analysis offers effective estimates of historical and contemporary gene flow (BURCZYK; DIFAZIO; ADAMS, 2004; BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; ASHLEY, 2010). Microsatellite markers also known as Short Tandem Repeats (STR) provide a great possibility of distinction of individuals, being a rich genetic tool for studies of the mating system and gene flow (ASHLEY; DOW, 1994; ASHLEY, 2010). The rates of contemporary pollen and seed migration among populations condition many important processes, including metapopulation dynamics, speed of range shifts, reproductive assurance during colonization or fragmentation, adaptive or maladaptive gene exchange across heterogeneous habitats, and the potential risk of invasion, hybridization or genetic introgression posed by artificially translocated species or populations (ROBLEDO-ARNUNCIO; GAGGIOTTI, 2017).

Highly polymorphic and abundant in the genome, these codominant STR markers contains DNA fragments small enough for amplification by polymerase chain reaction (PCR) and possibly separable by high-resolution electrophoresis techniques. Notwithstanding, these markers became widely used in scientific and applied researches (FAN; CHU, 2007), being considered the most popular markers for contemporary migration inference (SELKOE; TOONEN, 2006). Therefore, they tend to be continuously used in future genetic studies, especially for practicality and ease of use (VIEIRA et al., 2016). However, a weakness of these markers is the unavoidable presence of genotyping errors, which can cause the depart from

Mendelian inheritance laws on which many population genetics analysis are based.

The term genotype error are broadly used to define some genotyping deviations, including mutations, null alleles, allelic dropouts and false alleles (WANG, 2018). However, if the deviation is a true mutation, for instance, it is not a mistyping. Thus, we must accept inferred genotype as correct, and this should no longer be considered as a genotype error. For this reasons the use of the term genotype deviations is more appropriate. These deviations affect the accuracy of estimates of allelic frequencies of the analyzed populations and, consequently, can lead to false exclusions in parentage analyses (SLAVOV et al., 2005), which are classified as Type II errors (ASHLEY, 2010). False exclusions occur when a true parent is excluded due to mistyping at one or more loci that arise either in the laboratory processing, scoring, data entry or then due to null alleles or mutation (ASHLEY, 2010).

In microsatellites, null alleles (real alleles that consistently fail to amplify during PCR) are an additional common problem (POMPANON et al., 2005; KALINOWSKI; TAPER, 2006). This is due to a variation in the nucleotide sequences of the marker flanking regions, preventing its annealing to template DNA, during PCR, resulting in a null allele (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Sequencing studies indicate that these changes in DNA can occur at a not negligible rate (GRIMALDI; CROUAU-ROY, 1997), and may interfere in kinship and gene flow analysis (DAKIN; AVISE, 2004; KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007; ROBLEDO-ARNUNCIO; GAGGIOTTI, 2017). However, ninety percent of articles reporting microsatellite loci with null alleles include these loci in their analyses, without correction of the potential bias (DAKIN; AVISE, 2004). If, for example,  $An$  is a null allele, an individual with the  $AiAn$  genotype will be indistinguishable from an  $AiAi$  homozygote, or if the individual is homozygous to a null allele, genotyping will fail (KALINOWSKI; TAPER, 2006).

Regarding the mutations in microsatellites the scope of this genotyping deviations rates range from  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  per locus per generation (average of  $5 \cdot 10^{-4}$ ) (WEBER; WONG, 1993; SCHLÖTTERER, 2000; FAN; CHU, 2007), which guarantees the occurrence of high levels of allelic diversity required in genetic studies (SCHLÖTTERER, 2000). The mutational model associated with the evolution of microsatellites is the *stepwise mutation model* (OHTA;

KIMURA, 2007), where most of the mutations occur due to gains or losses of a single repeat unit (MARRIAGE et al., 2009).

Furthermore, the polymerase slippage effect during PCR amplification can produce additional products known as stutters, which differ from the original allele in replicate units (SHINDE et al., 2003), generating erroneous interpretations of the genotypes. Several advances in knowledge regarding genotyping deviations (genotyping errors) were generated in the 2000s and, since then as the number of studies involving microsatellites has increased, little has changed regarding information about genotyping deviations, especially in plant species, where studies dealing with this account for only 2% (POMPANON et al., 2005).

Because *Araucaria angustifolia*, a primarily dioecious conifer, is of economic and ecological importance, in addition to be a threatened species with marked presence into Ombrophilous Mixed Forest, its natural habitat, it had its first markers developed over a decade ago (for more details see Table 1). Since then several studies have been developed with these markers. However, there is still no data on estimates of genotyping deviations rates in *A. angustifolia*. Therefore, since genotyping deviations are inherent to the use of microsatellite markers and may influence genetic studies, the objective of this work was to estimate the rate of genotyping deviations, including null alleles, mutations and genotyping errors in *Araucaria angustifolia* microsatellite loci from the comparison of genotypes of seed-tree and their respective progenies.

## 5.2 MATERIAL AND METHODS

### 5.2.1 Data Collection

To perform this study, part of the data came from the samples collected and processed according to the description in Chapter I of this document (items 2.2.3 a 2.2.5). In short these sub-samples represent two adult populations and four seed cohorts. The other part of the data comes from analyzes of the genotypes generated by (COSTA et al., 2015), from samples collected and genotyped in the year 2014. This second set of samples refer to two small populations of *Araucaria angustifolia* present in grassland areas, in the municipality of Lages-SC. Together these small and near populations had approximately 90 adult trees and will be hereafter denominated by CCM. From each of these

two populations 200 seeds were collected from 10 different mother plants and this sampling compose two seed cohorts denominated hereafter as 2014X and 2014Z, respectively. Therefore, take into account the two set of samples, in total there were nine sub-sample origins that were analyzed, being three adult populations (CCM, FSR and FECAV) and six seed cohorts: 2014X (200 seeds from 10 seed trees) 2014Z (200 seeds from 10 seed trees); 2015 (400 seeds from 16 seed trees); 2016 (450 seeds from 18 seed trees); 2017A (450 seeds from 18 seed trees); 2017B (300 seeds from 12 seed trees).

### **5.2.2 Null alleles frequency estimates**

The frequency of null alleles per locus in adult populations and seed cohorts were estimated using the maximum likelihood method proposed by Kalinowski and Taper (2006), which calculates the frequency of null alleles based on the  $\beta$  parameter. This parameter represents the probability that a genotyping fails, in one locus, by a reason other than the locus being homozygous for a null allele. In this case, it is assumed that the genotypes of the population follow the proportion of Hardy-Weinberg, and that the probability of failure in the genotyping, is independent of the genotype. These analyzes were computed using the program ML-NUL (KALINOWSKI, 2009).

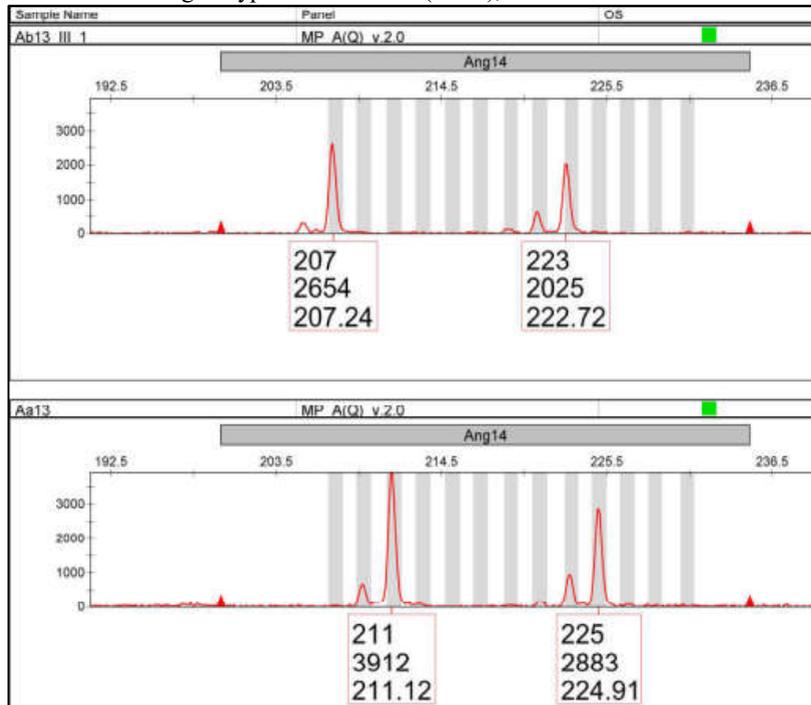
### **5.2.3 Analyses of error rate, inconsistencies and null alleles**

In the analysis of genotyping deviations, in each data set, we estimated the rates of different types of deviations from Mendelian inheritance laws by means of offspring– mother genotype comparison. We estimated the different sources of genotyping deviations rate per locus and multilocus using the CERVUS program (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007), which indicates where differences occur between mothers and progenies genotypes.

From the total genotyping deviation found we estimated the rate of inconsistencies (considered as possible mutation between mother - progeny). To declare a genotyping deviation as inconsistency we considered the cases in which seeds and mothers were heterozygous and did not have a common allele (Figure 13). The term inconsistency was used in this study to treat differences between seed-mother genotypes, which would be equivalent to a mutation. However, to be characterized as such, genotyping would need to be replicated with a multi-tube

approach, as proposed by Pompanon et al. (2005). Nevertheless, in order to obtain greater robustness of the generated results, all the mothers were genotyped in triplicate and the progenies that presented inconsistencies were genotyped in duplicate.

Figure 13 - Electrophoregram representing an inconsistency in the Aang14 marker, between the seed genotype (Ab13\_III\_1), which presents alleles 207 and 223 with the genotype of the mother (Aa13), which has alleles 211 and 225.



Source: Author's own production

From the genotyping deviations we also estimated the number of null alleles, using the CERVUS program to compare offspring– mother genotype. However, the program only considers null alleles, those cases in which the mother and the descendant are homozygous for different alleles. Finally, what was not declared as inconsistency or null allele we classified as genotyping errors. For these we presume some assumptions: (i) inconsistencies and null alleles are not genotyping errors; (ii) non-detected inconsistencies and null alleles remain as genotyping error; (iii) some mistyping genotypes may have been

interpreted as inconsistencies or null alleles or else the otherwise. Nevertheless, we presumed that part of these genotyping errors may still contain some null alleles or mutation alleles, which, however, when it was not possible to discriminate in this study (e.g. mutations in homozygote individuals). This can occur under the assumption if the mother is heterozygous (eg.: A1A2) and its seed is homozygous (eg.: A3An), where An represents the null or mutant allele, and the obligatory allele of the mother (A1 or A2) does not appear in the seed. Although this is usually caused by mutation in allele repeats or in the marker flanking regions, this does not fit into the criterion used for null alleles or inconsistency. The other part of genotype errors can also occur if the mother is genotyped as homozygous (eg.: A1A?), and its seed as heterozygous (eg.: A2A3), where the seed inherited the obligatory allele of the mother (A3), but a genotyping problem in the mother (A?) may have masked one of its alleles (eg.: A3). A summary of the criteria and assumptions used to discriminate the genotyping deviations are presented in the table 22.

Table 22- Aspect evaluated and the strategy of analysis for determination of genotyping deviations in mother progeny comparisons in *Araucaria angustifolia*.

Inferred mother genotype	Inferred progeny genotype	Real mother genotype	Real progeny genotype	Case	Genotyping deviation	Possible cause
A1/A2	A3/A4	A1/A2	A3/A4	heterozygous for different alleles	inconsistency	mutation
A1/A1	A2/A2	A1/An	A2/An	homozygous for different alleles	null allele	amplification failure or mutation in primer flanking region
A1/A2	A3/An	A1/A1	A1/A3; A2/A3; or A3/An	one heterozygous and one homozygous with mutation, null or mistyping allele)	genotyping error	failed to amplify one of the alleles, mutation or human error in scoring allele, .
A1/A?	A2/A3	A1/A3	A2/A3	any genotype divergence	genotyping error	errors in score and mistyping

An denotes null allele; A1, A2, A3 and A4 denotes different alleles; A? denotes mistyping allele.

It is important to note that genotyping problems, not including mutations in allele repeats or in the marker flanking regions (i.e. null alleles), may occur due to a failure in PCR or degraded DNA (KALINOWSKI; TAPER, 2006), effects such as short allele dominance (WATTIER et al., 1998), cross-contamination of samples, allelic dropout, stutter and human error (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007). In each loci we estimate the rate of genotyping deviations per population by the observed number of each type of deviation, divided by the total number of alleles analyzed, as suggested by (HOFFMAN; AMOS, 2005).

We analyze the Polymorphic Information Content (PIC), allele number (A), Combined Non-Exclusion Probability (NE-P) and Exclusion Probability (PE) to characterize the genetic information per locus. These analyses were conducted in the CERVUS program (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007). Of each variable of genetic information and genotype deviations rate per locus Spearman's rank correlation were calculated to verify the magnitude of the association between these variables with the use of the PAST program (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

## 5.3 RESULTS

### 5.3.1 Null alleles

We found positive rates of null alleles in all loci and populations or cohorts analyzed in this study, but not all presented null alleles in the same locus. This result suggests that the presence of null alleles in *Araucaria angustifolia* microsatellites markers varies according to the population analyzed (Table 23).

The global rate of null alleles in *Araucaria angustifolia* populations/cohorts estimated by program ML-NUL was 0.045 over loci. The loci Ag23 and Ag45 presented a positive null alleles rate in all populations analyzed, presenting high rates among the analyzed loci. On the other hand, the Crca1 and Aang24 loci were the only ones to present null alleles in a single population. The other loci presented null alleles in one or more of the nine populations/cohorts studied, but not in all of them.

Table 23 – Frequency of null alleles in *Araucaria angustifolia* microsatellite loci, estimated by program ML-NULL in three adult populations (FSR, FECAV and CCM) and six seed cohorts (2014X, 2014z, 2015, 2016, 2017A and 2017B).

Loci	2014x	2014z	2015	2016	2017A	2017B	FSR	FECAV	CCM	Total
Ag20b	0.017	0	0	0.022	0	0.001	0	0	0	0.017
Ag23b	0.051	0.074	0.023	0.033	0.058	0.067	0.252	0.029	0.096	0.105
Ag45b	0.023	0.001	0.094	0.128	0.174	0.096	0.075	0.054	0.02	0.171
Ag56b	0	0.037	0	0.011	0.002	0	0	0	0	0.054
Ag94b	0.007	0.02	0.017	0.052	0.109	0.02	0.086	0	0.013	0.055
Aang14b	0.001	0.007	0.022	0.016	0	0	0	0.004	0.004	0.012
Aang15b	0	0.006	0	0.001	0.002	0.005	0	0	0	0.002
Aang22b	0.006	0	0.021	0.017	0.019	0.035	0.003	0	0.005	0.030
Aang24b	0	0	0	0	0	0.005	0	0	0	0.001
Aang28b	0.004	0	0.044	0.046	0.031	0.074	0.026	0.004	0.006	0.050
Crca1b	0	0	0	0	0.036	0	0	0	0	0.005
Crca2b	0.009	0.036	0.034	0.021	0.067	0.008	0.028	0	0.08	0.038

### 5.3.2 Genotyping deviations

The total number of genotyping deviations found in the mother-progeny comparison over loci and over populations was 694, as described in Table 24. In terms of number of seeds that showed at least one inconsistency, genotyping error and null allele in multilocus analysis was 128 (6,5%), 118 (6.0%), and 321 (16.3%), respectively (Table 24). Together these genotype deviations were present in 567 seeds, which represents 28,8% of the total seeds analyzed.

Table 24 – Number of Mother progeny comparisons (N), number of inconsistencies (In), number of null alleles and total number of genotyping errors (Er) evaluated in 12 microsatellite loci in six seed cohorts (2014X, 2014z, 2015, 2016, 2017A and 2017B) of *Araucaria angustifolia*.

Loci	2014X				2014Z				2015				2016				2017A				2017B				Total			
	N	In	Nu	Er	N	In	Nu	Er	N	In	Nu	Er	N	In	Nu	Er	N	In	Nu	Er	N	In	Nu	Er	N	In	Nu	Er
Ag20	200				200	3		3	399	12	3	23	433	26	2	28	447	23	2	21	297	1		3	1976	65	7	78
Ag23	199	15	3		198	1	6	2	396		10	8	431	2	15	5	429		12	3	280		42	3	1933	3	100	24
Ag45	200				200				400		10		434		27	2	435		16	1	298		8		1967		61	3
Ag56	200				200			1	396				428	4		1	449	1		3	298	1			1971	6		5
Ag94	199				200	2			396	2	18		435	6	14	10	436	2	22	16	294	4	1	3	1960	16	55	29
Ang14	NA				NA				396		13		440	2	9	6	445	1	10	3	297				1578	3	32	9
Ang15	NA				NA				390	3		1	413	5		9	447	2		1	299	1			1549	11		11
Ang22	NA				NA				396		14		430	2	12	4	449		14	5	299	1	1		1574	3	41	9
Ang24	200				200	5		1	397				426	6		4	448	2	4	3	296			2	1967	13	4	10
Ang28	NA				NA				397	6	6	1	430	8	8	2	446	8	9	6	297				1970	22	23	9
Crca1	200				199			1	398				426				439		1		225				1887		1	1
Crca2	200				200			10	396				430		2		409		7	4	280	3	6	8	1515	3	15	22
<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>15</b>	<b>3</b>		<b>198</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>18</b>	<b>396</b>	<b>23</b>	<b>74</b>	<b>33</b>	<b>396</b>	<b>61</b>	<b>89</b>	<b>71</b>	<b>449</b>	<b>39</b>	<b>97</b>	<b>66</b>	<b>299</b>	<b>11</b>	<b>58</b>	<b>19</b>	<b>21847</b>	<b>145</b>	<b>339</b>	<b>210</b>

NA represents non-analyzed loci in the population.

The loci Ag45 and Crca1 showed no inconsistency between mother-progeny genotype (Table 25). In contrast, these two loci presented the lowest number of alleles and polymorphic information content (Table 26). Regarding the null alleles, the loci Ag56 and Aang15 that did not present null alleles, following by the locus Crca1 that showed null allele for only one seed (0.03%).

Table 25- Non-Exclusion Probability (NE-P), polymorphic information content (PIC), allele number (A), and rate of errors, null alleles and inconsistencies (potential mutations) found in 1972 *Araucaria angustifolia* mothers-progenies genotypes.

Locus	Inconsistencies	Null alleles	Errors	NE-P	PIC	A
Ag20	0.0164	0.0018	0.0197	0.1070	0.8450	23
Ag23	0.0008	0.0259	0.0062	0.2210	0.7550	15
Ag45	0.0000	0.0155	0.0008	0.5580	0.4770	6
Ag56	0.0015	0	0.0013	0.1320	0.8270	15
Ag94	0.0041	0.0140	0.0074	0.0670	0.8900	16
Aang14	0.0010	0.0101	0.0029	0.1330	0.8290	13
Aang15	0.0036	0	0.0036	0.0220	0.9410	34
Aang22	0.0010	0.0130	0.0029	0.1620	0.8010	17
Aang24	0.0033	0.0010	0.0025	0.1120	0.8490	19
Aang28	0.0056	0.0058	0.0023	0.3450	0.6670	9
Crca1	0.0000	0.0003	0.0003	0.8830	0.1220	5
Crca2	0.0010	0.0050	0.0073	0.2590	0.6880	15
Total	0.0033	0.0078	0.0048	4.906 <sup>-10</sup>	0.7242	187

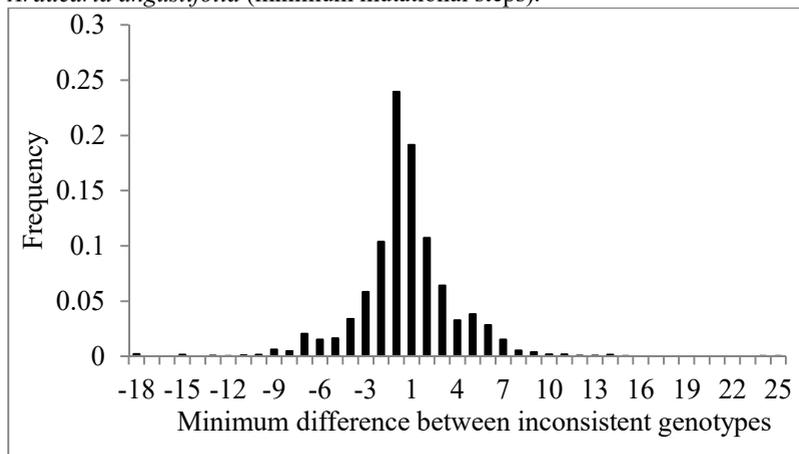
We found significant positive associations between null alleles and genotyping error rates, as well as, between allele number, polymorphic information content and probability of non-exclusion. However, no association between the genetic characteristics of the markers and the rates of genotyping errors was significant.

Table 26– Paired Spearman's rank correlation between Polymorphic Information Content (PIC), allele number (A), Combined Non-Exclusion Probability (NE-P), genotyping errors (Er), null alleles (Nu) and inconsistencies (In), in 12 *Araucaria angustifolia* microsatellite loci. Below diagonal are presented the p-values and in the upper diagonal the Spearman correlations.

	In	Nu	Er	P-NE	PIC	A
In	0	-0.305	0.575	-0.347	0.343	0.417
Nu	0.335	0	0.580	-0.022	0.049	-0.278
Er	0.051	0.048	0	-0.331	0.337	0.155
PE	0.278	0.823	0.431	-0.958	0.949	0.838
P-NE	0.270	0.946	0.294	0	-0.997	-0.753
PIC	0.275	0.880	0.283	<b>0.000</b>	0	0.740
A	0.177	0.382	0.630	<b>0.005</b>	<b>0.006</b>	0

The analyze of the inconsistencies using offspring–mother genotype comparison over loci, showed that the minimum difference from mothers alleles to progeny alleles, measured by means of mutational steps, showed that contractions and expansions occur in the same proportion, and the most are a single-steps mutation events (Figure 14).

Figure 14– Frequency of minimum difference between inconsistent genotypes found in the mother-progeny comparison with 12 microsatellite markers of the *Araucaria angustifolia* (minimum mutational steps).



Source: Author's own production

## 5.4 DISCUSSION

The need to investigate the presence of genotyping deviations in microsatellite markers and, consequently, on migration estimates produced by genetic assignment methods was emphasized since the beginning of this century (BONIN et al., 2004; HOFFMAN; AMOS, 2005; MANEL; GAGGIOTTI; WAPLES, 2005; POMPANON et al., 2005; DEWOODY; NASON; HIPKINS, 2006). Nevertheless, in last years, few studies have taken this issue into account (ROBLEDO-ARNUNCIO; GAGGIOTTI, 2017; WANG, 2018). This fact is not only due to an advance of the techniques, but possibly to a disregard in reporting this type of result. Studies showed that genotyping deviations can be generated even with high-quality standards (BONIN et al., 2004), and it is virtually impossible or too expensive to completely eliminate all genotyping deviations (WANG, 2018). Consequently, genotyping deviations are not always synonymous with poorly conducted studies, but instead of studies that effectively report the quality of the data obtained. The deviations rates can be used to detect odd genotypes or unreliable markers (markers that are unstable or difficult to score) and improve the quality of the data (BONIN et al., 2004).

### 5.4.1 Genotyping deviations in parentage analyzes

The overall, genotype deviations rate found in the present study was 1.58%. The type of genotype deviations estimated, based on offspring–mother genotype comparison, compound null alleles, inconsistencies (potential mutations) and genotyping errors. Discarding the possibility of mutation or null alleles, genotype errors can be caused by several reasons (i.e., human errors in handling and pipetting samples, mistyping, scoring wrong alleles, stutters, cross-contamination among others). Thus, in the present study we use the term genotyping errors in the narrower sense (without inclusion of mutations and null alleles), as we consider more appropriate. In substitution for the term genotyping errors used in other studies, we use the term genotyping deviations. It is important to note that unlike genotyping error rates, mutations and null alleles rates cannot be avoided, only estimated.

Studies that report genotype deviations suggest that per-locus this deviations rates are generally below 10% (BONIN et al., 2004; HOFFMAN; AMOS, 2005; MORIN et al., 2009). Pompanon et al. (2005) consider that all studies in which genotyping deviations were

checked a non-negligible rate were reported (from 0.2% to more than 15% per locus), and that a rate of 1% is usual in many laboratories (GÖRING; TERWILLIGER, 2000). These facts corroborate with the results found in the present study. Similarly, Waits et al. (2000) found an average genotype deviation rate of 0.8% across 18 *Ursus arctos*, and Hopley et al. (2015) obtained in a dioecious weed (*Salix Cinerea*) the average genotyping error rate across populations of 0.21 % per locus.

Genotyping deviations in studies carried out with microsatellite is common, but what is not common are reports of these deviations, especially on plant species. Usually, the occurrence of low deviations rates may not drastically affect the results. With moderately variable SSR markers, consistently accurate estimates of pollen immigration could be obtained only for rates of mistyping up to 4.5% (SLAVOV et al., 2005). Thus, a small possibility of mistyping individuals may be considered unlikely to compromise the results of the genetic analysis (HOPLEY; ZWART; YOUNG, 2015). Even very low and with little influence on the results, the genotyping deviations rates should be mentioned in the study reports. Additionally, mentioning the genotyping deviation rate should not discredit the conclusion drawn from the obtained results. On the contrary, it should be considered as a proof of data quality and thus could definitively promote the use of those data in other studies. Results presented without any indication of statistical significance are generally not considered acceptable and in the same way; therefore the stating the genotyping deviations rate in population genetics studies should become a convention such as the *P*-value in statistical tests (BONIN et al., 2004).

An alternative to estimate the deviation rates without know mothers-progeny genotypes is to repeat the amplification of each marker in a random subset of 10-15% of the total number of samples and counting the number of inconsistent genotypes between the first and second attempts (SELKOE; TOONEN, 2006). In one of the few studies that evaluate the influence of microsatellite genotyping deviations used in paternal exclusion in the Antarctic fur seal, Hoffman and Amos (2005) attributed 80.0%, 10.7%, and 6.7% of the errors to scoring, data input and allelic dropouts, in corresponding order. However, errors caused by human factors during genotype production can be minimized if well-trained scientists are involved, as well as use of well-standardized and validated procedures. In addition manipulation should be reduced as much as possible, according to the automation

possibilities, from all handling and pipetting steps up to allele scoring (LI et al., 2001).

However, some amount of error seems to be unavoidable and this should always be taken into account, because they can provide distinct consequences. In some cases, processing of the data considering the presence of errors could improve statistical power. While ignoring genotyping deviations can be especially problematic when there is no actual migration, because it can lead to the wrong conclusion that there is statistically significant exchange of pollen and/or seeds among populations that are actually isolated (ROBLEDO-ARNUNCIO; GAGGIOTTI, 2017). Mistaken alleles should result in migration overestimation (POMPANON et al., 2005), consequently, positively biasing pollen migration estimates. This is even more damaging consequence in long-lived species, such as *Araucaria angustifolia*, because most assessments of gene flow and the appropriate implications usually are made based on a single reproductive season.

#### 5.4.2 Null alleles

The rate of null alleles in all microsatellite loci evaluated in the present study was variable among populations, ranging from 0 to 17%, with some loci presenting null alleles in all populations and others in only one population (Table 24). The null alleles rate estimated in ML-NUL obtained an average of 0.045 among loci, while the average rate of null alleles obtained by the mother-progeny comparison in CERVUS was 0.0078 (Table 23). This underestimate in the comparative method occurs by considering null alleles only the cases where the mother and progeny are homozygous for different alleles. Thus, this corroborates with the assumption that a fraction of the null alleles non-detectable by the CERVUS program remains as genotyping errors. However, both rates obtained in the present study were within the expected range for null allele frequencies, which usually is lower than 20% (DAKIN; AVISE, 2004).

In accordance with the recommendation of the program CERVUS (MARSHALL et al., 1998), for parentage studies, the loci Ag23, Ag45, Ag56 and Ag94 should be removed from the analysis, due to the relative high rate ( $>0.05$ ) of null alleles (Table 23). However, technical problems such as null alleles and allelic drop-out will occur in many microsatellites studies. Fortunately, simulation studies have shown that parentage assignment approaches such as implemented in CERVUS are quite robust to Type II errors (ODDOU-MURATORIO et al., 2003).

Therefore, since three of these four loci had relatively high polymorphism (Table 25), we suggest keeping them in parentage analyzes conducted in programs that deal with the presence of null alleles. On the other hand, we suggest avoiding the use of the Ag45 locus, by the high rate of null alleles and low polymorphism observed. A major drawback of such practice is that the benefits of accounting for error are often outweighed by costs in precision of paternity assignment that becomes uninformative (ODDOU-MURATORIO et al., 2003; MORRISSEY; WILSON, 2005). This is especially true when only a few (say 10–20) markers are available to an analysis, and abandoning one marker means a substantial loss of information and waste of resources (WANG, 2018).

Nevertheless, the paternity analyzes conduct by CERVUS 2.0 have the presence of null alleles established by deviations from Hardy–Weinberg equilibrium using analyzes of chi-square goodness-of-fit test, with an iterative algorithm based on the difference between observed and expected frequency of homozygotes to estimate the null allele frequency. However, CERVUS 2.0 is unable to discriminate null alleles from other genotyping errors and does not provide alternative methods for estimating null alleles (VAN OOSTERHOUT et al., 2004).

Previously, Medina-Macedo et al., (2015) also performed paternity analyzes on *A. angustifolia* seeds, and reported no evidence of null alleles in 10 microsatellite loci, of which six were used in the present study (Ag45, Crca1, Ag20, Ag56, Aang14 e Aang28). It should be noted that Ag23 and Ag45 were the loci that presented the highest rates of null alleles in the present study. Based on our results, it can be infer that the rate of null alleles can be highly influenced according to the population evaluated.

The association between the presence of null alleles and flanking region highly polymorphic have been demonstrated repeatedly in molecular studies. Several of these studies suggest that microsatellite-flanking region may be less stable than other genomic regions (GRIMALDI; CROUAU-ROY, 1997; CHAPUIS; ESTOUP, 2007). The loci that were more polymorphic (higher number of alleles) and, consequently, with greater exclusion power, did not present correlation with the high rates of null alleles.

Vranckx et al. (2014) investigated the pollen flow with microsatellite markers in small fragmented forest stands of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). The authors showed that out of 10 SSR, nine showed low null allele frequencies in all populations analyzed (<0.05),

however, one of these loci showed consistently high null allele frequencies (0.05–0.15). Because of that the authors Vranckx et al., (2014) removed this locus from the analysis to increase the quality of results.

Removal from analysis may be an alternative for those loci with high rates of null alleles. Therefore, it is extremely important to conduct a preliminary analysis (as suggested by Pompanon et al., 2005). Additionally, based on the results of the present study, we suggest the inclusion of different populations in future studies, to avoid expenditures on loci that will be removed from further analysis. Moreover, a consensus has not been reached regarding the effect of null alleles on parentage analyses. Dakin; Avise (2004) reported that the frequency of null alleles less than 0.2 is unlikely to introduce serious bias into parentage. As loci with null alleles are usually identifiable, they tend not to be a major problem for parentage analysis (JONES et al., 2010). Nevertheless, it does not mean that they should not be reported.

#### **5.4.3 Inconsistencies (potential mutations)**

Mutations are the important class of genotyping errors, which are a real biological phenomenon in which the allele inherited by the offspring changed in some way from the allele present in the parent (JONES et al., 2010). Following the pattern of allele transmissions in parent–progeny pairs is the most effective method to study the processes of microsatellite mutations directly (ELLEGREN, 2004). The mutation rate estimated in this study refers to maternal mutation rate. In addition, at least one known parent offers a powerful tool to detect scoring error (DEWOODY; NASON; HIPKINS, 2006). However, the quantity of this kind of studies is yet very low in comparison with the number of studies that use the information parent-progeny to infer about gene flow. Similarly to the present study, 61 (12,6%) mismatch were verified among seeds with their mother over the 483 seeds genotyped, at one or more loci, in a paternity analysis study of *Fraxinus excelsior* (BACLES; ENNOS, 2008). Nevertheless, we considered that this is not a weight on the analyses performed in the Chapter II, since the all paternity assignments were obtained within the restrict confidence interval (95%).

A way to mitigate genotyping deviations and to discriminate mutations is to process the samples at the same time by families

(mothers together with their progenies). This can avoid problems caused by different amplification conditions and electrophoresis. In addition, since knowledge of the maternal genotype in paternity analyzes of seed is extremely important, because it increases the power of exclusion (MEAGHER; THOMPSON, 1986; MARSHALL et al., 1998). This strategy allowed us to obtain robustness in the results of the chapter II of this document, since we genotyped simultaneously the mothers in triplicate and the seeds with inconsistencies in duplicate.

Mutations within microsatellite loci tend to occur from long alleles to shorter lengths, thereby acting to prevent infinite growth. In addition, expansions are more common than contractions among dinucleotide repeats (ELLEGREN, 2000). If we take into account the inconsistencies as possible mutations, the proportions of expansions and contractions were similar and occurred at an average rate of  $3.3 \times 10^{-3}$  over loci. Yet, mutations involving several mutational steps can occur by recombination. Unique DNA sequences in a genome exhibit a very low mutation rate (approximately  $10^{-9}$  nt per generation), whereas the mutation rates in STR sequences are several orders of magnitude higher (BONIN et al., 2004), ranging from  $10^{-6}$  to  $10^{-2}$  nt per generation (ELLEGREN, 2000). Thus the values obtained in the present study are similar to those found in other studies. Moreover, there was apparently great variation in inconsistencies rates (potential mutation) among loci. Chakraborty and collaborators showed that in human STR loci, dinucleotide repeats display the highest mutation rate in comparison with tri-, and tetranucleotides (CHAKRABORTY et al., 1997). Therefore, it will be valuable the development of new studies with microsatellites markers for *A. angustifolia*, preferably increasing the availability of tetranucleotide markers, in order to increase the possibility of multiplex optimization and selection of loci with low genotyping error rates. In addition, it could be better to choose markers of lower error rates rather than higher polymorphisms in an error-sensitive statistical analysis (WANG, 2018).

#### **5.4.4 Implications and recommendations on genotyping deviations**

The genotyping process is subject to genotyping deviations that may interfere the results of genetic analyzes. The reasons rely on the quality of previous processes (eg.; obtaining DNA and amplification). Neither mistyping nor null alleles should be disregarded when inferring

migration using microsatellite markers, especially if rigorous uncertainty assessment is required (ROBLEDO-ARNUNCIO; GAGGIOTTI, 2017). However, removing deviations might not reduce bias, depending on the number and kind of deviations detected and the bias each one creates (POMPANON et al., 2005). Bacles and Ennos (2008) analyzed ways of correcting genotyping deviations and demonstrated that the transformed data set still includes a genotyping error rate of about 3.6% per locus, which may have an impact on the conclusions drawn from their study. Some authors have recommend that markers with high deviations rates either be excluded from the analysis or be regenotyped in all families (SEAMAN; HOLMANS, 2005). Thus, these error-prone loci, once identified, can be removed from the study to increase its reliability (POMPANON et al., 2005).

Although the removal of loci with deviations has been suggested, recent simulations showed that the loss of information exceeded noise reduction when discarding mistyping-prone loci, not improving, but rather worsening, migration estimates. The best strategy for accurate estimation of seed and pollen migration rates would thus seem to be using all available loci and jointly estimating mistyping rates in the analyses (ROBLEDO-ARNUNCIO; GAGGIOTTI, 2017; WANG, 2018). Based on these results, a further possibility to the presence of genotype deviations is to use software packages that incorporates error models and rates as entry parameters and reports a confidence interval for the results (BONIN et al., 2004). This strategy can be used because the statistical power included in some programs are robust to the occurrence of genotyping deviations (ZOU; ZHAO, 2004). However, estimating deviations rates and integrating them into error-tolerant statistical methods cannot be overstated (WANG, 2018). It should be noted that analyzes are not always robust enough to avoid a possible bias caused by the various types of genotyping deviations. Although not always serious, unaccounted-for genotyping deviations may compromise accurate estimation of contemporary seed and/or pollen migration rates (ROBLEDO-ARNUNCIO; GAGGIOTTI, 2017). Tests of ecological or evolutionary hypotheses should use the appropriate adjusted allele frequencies, and not the raw genotypic data, when possible (DEWOODY; NASON; HIPKINS, 2006). Most estimates of population differentiation, in contrast, are based on allele frequencies and not individual genotypes, and reasonable deviations rates (< 2% of genotypes mistyped) are unlikely to seriously bias these results (BONIN et al., 2004; DEWOODY; NASON; HIPKINS, 2006).

The best way to deal with genotype deviations is initially try to prevent them and for this, a prior analysis of the data becomes necessary. Firstly, manual scoring alleles is a practice that went out of use (POMPANON et al., 2005), rather than combining automated allele calling with visual inspection of each sample is recommend, given the capacity of the well-trained analyzer to know about characteristic peak patterns and potential scoring problems in each marker locus (DEWOODY; NASON; HIPKINS, 2006). Semi-automated scoring followed by human visual inspection seems to be the most reliable procedure. In addition, replicating 5–10% of the samples has been recommended, because may help not only to estimate de deviations rate, but also help in the increase the analyzer experience. Although many of the procedures used in preventing mistypes are expensive and time-consuming (BONIN et al., 2004) they can help to detect the different types of genotypes deviations.

As a way to prevent genotype deviations the protocol proposed by Pompanon et al., (2005) recommend that these measures be systemically reported to attest the reliability of published genotyping studies. Other punctual recommendations are (i) have several efficient precautions to prevent contaminations and technical artifacts; (ii) systematic use of blind samples and automation; (iii) experience and rigor for laboratory work and scoring; and (iv) systematic reporting of the deviations rate in population genetics studies (BONIN et al., 2004). Moreover, quality controls should be carried out during each step and each batch of experiments (POMPANON et al., 2005). We recommend to avoid typing the samples information, such as sample name and data results, at each stage of the study. Instead, we suggest to export or import any data whenever possible. In addition we recommend to use the same order of the samples (same positions) to perform the laboratory steps (dilution, amplification and electrophoresis). In the genotyping process, we recommend (i) the use of adequate software that employ allele binning, (ii) always include mother and their progenies to scoring alleles, as well as allelic ladder (mixing of DNA from samples with potential alleles in the population), (iii) perform a rigorous data conference, and (iv) use high fidelity DNA polymerases. An accurately sampling size is also important to avoid overwork and, if necessary, to analyze part of the samples in a different laboratory can help you find sources of error.

## 5.5 FINAL CONSIDERATIONS

The information about inconsistencies in offspring–mother genotype comparison is the first described in *Araucaria angustifolia* and will be useful in population genetics analyses by incorporate potential mutation rates such as source of variation in population dynamics and calculating the effective estimates of migration, population size, and genetic structure indexes. Because in genetic diversity analyses, as null alleles rates tend to decrease the observed genetic variation, the mutation rates tends to increase it; however, both can cause false exclusions in parentage analyses. Further testing will be necessary to know the effective rate of the mutation and null alleles occurs and, how does it influence the accuracy of parentage assignments.

The presence of genotyping errors, null alleles and inconsistencies (mutations) is inherent in the genotyping technique with microsatellite loci. Therefore, the knowledge of the rates with which these events occur is extremely important to use of appropriate methods to avoid possible interferences in genetic studies conducted with microsatellite markers. Since implications of strategies to conservation of several species, including threatened ones, are based on studies that use STR markers, and for most of them there are no reports of occurrence of genotyping errors, it is time to take them in consideration. In doing further studies, it is worth always considering the presence of genotyping deviations and looking for processing methods and analysis that are compatible and robust to detect and measure the genotyping errors, null alleles and inconsistencies (mutations). In case of an unusually high error rate, this value can also give a useful clue about technical difficulties encountered and this would benefit the scientific community greatly (BONIN et al., 2004).

In the analyzes accomplished in chapters I and II of this thesis, we considered that regardless of the possible bias that genotyping deviations might cause in their results and conclusions, measures were taken at all stages to minimize the genotyping errors. Thus, the frequency of markers and the magnitude of genotyping errors found in the present work justify the reporting in a separate chapter to address that issue related to genetic analyzes with microsatellite markers in *A. angustifolia*. Therefore, we consider that the hypotheses formulated and the main conclusions drawn, which refer to the comparison between years and sites, remain valid because they were subject to the same

conditions. For example, even if there is an overestimation of the migration rate found, the assessed years or places will be equally affected.

## 5.6 REFERENCES

ASHLEY, M. V. Plant Parentage, Pollination, and Dispersal: How DNA Microsatellites Have Altered the Landscape. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 3, p. 148–161, 2010.

ASHLEY, M. V.; DOW, B. D. The use of microsatellite analysis in population biology: Background, methods and potential applications. **EXS**, v. 69, p. 185–201, 1994.

BACLES, C. F. E.; ENNOS, R. a. Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior* L. in a chronically fragmented landscape. **Heredity**, v. 101, n. 4, p. 368–380, 2008.

BEHLING, H.; JESKE-PIERUSCHKA, V.; SCHÜLER, L.; PILLAR, V. Dinâmica dos campos no sul do Brasil durante o Quaternário Tardio. In: PILLAR, P. V.; MÜLLER, S. C.; CASTILHOS, Z. M. S.; JACQUES, A. V. A. (Ed.). **Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade**. 1. ed. Brasília: MMA, 2009. p. 13–24.

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

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Pollen movement within a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TwoGener analysis. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 4, p. 855–868, set. 2008.

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Genetic effects of forest fragmentation in high-density *Araucaria angustifolia* populations in Southern Brazil. **Tree Genetics & Genomes**, v. 5, n. 4, p. 573–582, 8 out. 2009.

BONIN, A.; BELLEMAIN, E.; EIDASEN, P. B.; POMPANON, F.; BROCHMANN, C.; TABERLET, P. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 11, p.

3261–3273, 2004.

BRAGA, A. C.; COLLEVATTI, R. G. Temporal variation in pollen dispersal and breeding structure in a bee-pollinated Neotropical tree. **Heredity**, v. 106, n. 6, p. 911–919, 2011.

BREED, M. F.; OTTEWELL, K. M.; GARDNER, M. G.; MARKLUND, M. H. K.; DORMONTT, E. E.; LOWE, A. J. Mating patterns and pollinator mobility are critical traits in forest fragmentation genetics. **Heredity**, v. 115, n. 2, p. 108–114, 4 ago. 2015.

BURCZYK, J.; DIFAZIO, S. P.; ADAMS, W. T. Gene flow in forest trees: How far do genes really travel? **Forest Genetics**, v. 11, n. 3–4, p. 179–192, 2004.

CHAKRABORTY, R.; KIMMEL, M.; STIVERS, D. N.; DAVISON, L. J.; DEKA, R. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 3, p. 1041–6, 4 fev. 1997.

CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 3, p. 621–631, 2007.

COSTA, N. C. F.; GUIDOLIN, A. F.; VARGAS, O. F.; MANTOVANI, A. Efeitos da paisagem de campo e florestamento com Pinus na diversidade e estrutura genética de pequenas populações remanescentes de *Araucaria angustifolia*. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 43, n. 107, p. 551–560, 2015.

DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, n. 5, p. 504–509, 4 nov. 2004.

DEWOODY, J.; NASON, J. D.; HIPKINS, V. D. Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 4, p. 951–957, 2006.

ELLEGREN, H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. **Nature Genetics**, v. 24, n. 4, p. 400–402, 1 abr. 2000.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435–445, 1 jun. 2004.

ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant Conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 217–242, 1993.

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

FAN, H.; CHU, J. Y. A Brief Review of Short Tandem Repeat Mutation. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 5, n. 1, p. 7–14, 2007.

GÖRING, H. H. H.; TERWILLIGER, J. D. Linkage Analysis in the Presence of Errors II: Marker-Locus Genotyping Errors Modeled with Hypercomplex Recombination Fractions. **The American Journal of Human Genetics**, v. 66, n. 3, p. 1107–1118, mar. 2000.

GRIMALDI, M. C.; CROUAU-ROY, B. Microsatellite allelic homoplasmy due to variable flanking sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 44, n. 3, p. 336–40, mar. 1997.

HAHN, C. Z.; MICHALSKI, S. G.; DURKA, W. Gene flow in, and mating system of, *Rhododendron simsii* in a nature reserve in subtropical China. **Nordic Journal of Botany**, v. 35, n. 1, p. 1–7, fev. 2017.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T. a. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4(1), n. 1, p. 1–9, 2001.

HAMRICK, J. . Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management**, v. 197, n. 1–3, p. 323–335, ago. 2004.

HOFFMAN, J. I.; AMOS, W. Microsatellite genotyping errors: Detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 2, p. 599–612, 2005.

HOPLEY, T.; ZWART, A. B.; YOUNG, A. G. Among-population pollen movement and skewed male fitness in a dioecious weed. **Biological**

**Invasions**, v. 17, n. 7, p. 2147–2161, 2015.

IRIARTE, J.; BEHLING, H. The expansion of Araucaria forest in the southern Brazilian highlands during the last 4000 years and its implications for the development of the Taquara/Itararé Tradition. **Environmental Archaeology**, v. 12, n. 2, p. 115–127, 2007.

JANZEN, D. H. The Future of Tropical Ecology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 17, n. 1, p. 305–324, 1986.

JONES, A. G.; SMALL, C. M.; PACZOLT, K. A.; RATTERMAN, N. L. A practical guide to methods of parentage analysis. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 1, p. 6–30, 2010.

KALINOWSKI, S. (Department of E. M. S. **Software for estimating the frequency of null alleles at microsatellite loci**. Disponível em: <<http://www.montana.edu/kalinowski/software/null-freq.html>>. Acesso em: 20 out. 2017.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. **Conservation Genetics**, v. 7, n. 6, p. 991–995, 2006.

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**, v. 16, n. 5, p. 1099–1106, 2007.

KLEIN, R. M. **Mapa fitogeográfico do estado de Santa Catarina**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1978.

KOKKO, H.; LÓPEZ-SEPULCRE, A. The ecogenetic link between demography and evolution: can we bridge the gap between theory and data? **Ecology Letters**, v. 10, n. 9, p. 773–782, set. 2007.

LANDER, T. A.; BOSHIER, D. H.; HARRIS, S. A. Fragmented but not isolated: Contribution of single trees, small patches and long-distance pollen flow to genetic connectivity for *Gomortega keule*, an endangered Chilean tree. **Biological Conservation**, v. 143, n. 11, p. 2583–2590, 2010.

LI, J. L.; DENG, H.; LAI, D. B.; XU, F.; CHEN, J.; GAO, G.; RECKER, R. R.; DENG, H. W. Toward High-Throughput Genotyping:

Dynamic and Automatic Software for Manipulating Large-Scale Genotype Data Using Fluorescently Labeled Dinucleotide Markers. **Genome Research**, v. 11, n. 7, p. 1304–1314, 1 jul. 2001.

LOWE, A. J.; BOSCHER, D.; WARD, M.; BACLES, C. F. E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, v. 95, n. 4, p. 255–273, 2005.

MANEL, S.; GAGGIOTTI, O.; WAPLES, R. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 20, n. 3, p. 136–142, mar. 2005.

MARRIAGE, T. N.; HUDMAN, S.; MORT, M. E.; ORIVE, M. E.; SHAW, R. G.; KELLY, J. K. Direct estimation of the mutation rate at dinucleotide microsatellite loci in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). **Heredity**, v. 103, n. 4, p. 310–317, 2009.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 5, p. 639–655, maio 1998.

MATTOS, J. R. **O pinheiro brasileiro**. 1 ed ed. Florianópolis: Editora UFSC, 2011.

MEAGHER, T. R.; THOMPSON, E. The relationship between single parent and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. **Theoretical Population Biology**, v. 29, n. 1, p. 87–106, 1986.

MEDINA-MACEDO, L.; SEBBENN, A. M.; LACERDA, A. E. B.; RIBEIRO, J. Z.; SOCCOL, C. R.; BITTENCOURT, J. V. M. High levels of genetic diversity through pollen flow of the coniferous *Araucaria angustifolia*: a landscape level study in Southern Brazil. **Tree Genetics & Genomes**, v. 11, n. 1, p. 814, 2015.

MITTERMEIER, R. A.; TURNER, W. R.; LARSEN, F. W.; BROOKS, T. M.; GASCON, C. Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In: ZACHOS, F. E.; HABEL, J. C. (Ed.). **Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 3–22.

MORIN, P. A.; LEDUC, R. G.; ARCHER, F. I.; MARTIEN, K. K.; HUEBINGER, R.; BICKHAM, J. W.; TAYLOR, B. L. Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium caused by low levels of microsatellite genotyping errors. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 2, p. 498–504, 31 jan. 2009.

MORRISSEY, M. B.; WILSON, A. J. The potential costs of accounting for genotypic errors in molecular parentage analyses. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 13, p. 4111–4121, nov. 2005.

MYERS, N.; MITTERMIER, A. R.; MITTERMIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. February, p. 853–858, 2000.

ODDOU-MURATORIO, S.; HOUOT, M. L.; DEMESURE-MUSCH, B.; AUSTERLITZ, F. Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 12, p. 3427–3439, 2003.

OHTA, T.; KIMURA, M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population\*. **Genetical Research**, v. 89, n. 5–6, p. 367, 29 dez. 2007.

OTTEWELL, K.; GREY, E.; CASTILLO, F.; KARUBIAN, J. The pollen dispersal kernel and mating system of an insect-pollinated tropical palm, *Oenocarpus bataua*. **Heredity**, v. 109, n. 6, p. 332–339, 2012.

POMPANON, F.; BONIN, A.; BELLEMAIN, E.; TABERLET, P. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 11, p. 847–846, 2005.

ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; GAGGIOTTI, O. E. Estimating contemporary migration rates: effect and joint inference of inbreeding, null alleles and mistyping. **Journal of Ecology**, v. 105, n. 1, p. 49–62, 2017.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, v. 109, n. 6, p. 365–71, set. 2000.

SEAMAN, S. R.; HOLMANS, P. Effect of Genotyping Error on Type-I Error Rate of Affected Sib Pair Studies with Genotyped Parents. **Human Heredity**, v. 59, n. 3, p. 157–164, 2005.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, n. 5, p. 615–629, 2006.

SHINDE, D.; LAI, Y.; SUN, F.; ARNHEIM, N. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)<sub>n</sub> and (A/T)<sub>n</sub> microsatellites. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 3, p. 974–980, 2003.

SLAVOV, G. T.; HOWE, G. T.; GYAUROVA, A. V.; BIRKES, D. S.; ADAMS, W. T. Estimating pollen flow using SSR markers and paternity exclusion: Accounting for mistyping. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 10, p. 3109–3121, 2005.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535–538, 2004.

VRANCKX, G.; MERGEAY, J.; COX, K.; MUYS, B.; JACQUEMYN, H.; HONNAY, O. Tree density and population size affect pollen flow and mating patterns in small fragmented forest stands of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). **Forest Ecology and Management**, v. 328, p. 254–261, 2014.

WAITS, L.; TABERLET, P.; SWENSON, J. E.; SANDEGREN, F.; FRANZEN, R. Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the *Scandinavian brown bear* (*Ursus arctos*). **Molecular Ecology**, v. 9, n. 4, p. 421–431, abr. 2000.

WANG, J. Estimating genotyping errors from genotype and reconstructed pedigree data. **Methods Ecol Evol**, v. 9, n. July 2017, p. 109, 2018.

WATTIER, R.; ENGEL, C. R.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; VALERO, M. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: Experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). **Molecular Ecology**, v. 7, n. 11, p. 1569–1573, 1998.

WEBER, J. L.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. **Human Molecular Genetics**, v. 2, n. 8, p. 1123–1128, 1993.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 10, p. 413–418, 1996a.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 10, p. 413–418, 1996b.

ZOU, G.; ZHAO, H. The impacts of errors in individual genotyping and DNA pooling on association studies. **Genetic Epidemiology**, v. 26, n. 1, p. 1–10, jan. 2004.

## 6 CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO DA *Araucaria angustifolia*

Apesar do importante papel cultural, ecológico e social da *Araucaria angustifolia*, o viés econômico para exploração madeireira é o que mais pesa, o qual muitas vezes, visa apenas a obtenção de lucro imediato. Com isso, as pressões para liberação da exploração e manejo da espécie são iminentes e podem representar um risco para manutenção da espécie, pois, se ocorrerem de maneira intensa, desordenada e sem critérios, estas podem levar novamente a severas reduções populacionais, como ocorreu no passado, fato que culminou na ameaça de extinção da espécie. A pressão de uso sobre a espécie e a perda de habitats para plantios agrícolas e florestais, aliadas a proibição de corte para exploração madeireira pela legislação tem causado um efeito reverso no que tange a conservação da espécie, pois, alguns proprietários optam por não deixar a espécie se desenvolver, eliminando as plantas ainda na fase jovem.

De maneira geral estudos conduzidos a longo prazo ou conduzidos em diferentes anos são essenciais e desejáveis para obtenção de informações concisas acerca dos processos biológicos principalmente de espécies longevas como *A. angustifolia*. Sua presença na Floresta Ombrófila Mista, tanto em formações florestais como em meio as paisagens de campo torna a espécie relevante para tentar compreender como alguns dos aspectos que moldam a diversidade genética atuam nestes diferentes ambientes. Por ser uma espécie representativa da fitofisionomia de uma região estudos demo-genéticos com a espécie tem ocupado uma posição de destaque, no entanto, e a continuação destes ao longo dos anos é muito importante, principalmente em relação a obtenção de informações que possam auxiliar a desenhar perspectivas do que poderá ocorrer com a espécie no contexto do Antropoceno. Dessa forma, as descobertas do presente estudo permitiram gerar informações inéditas para *Araucaria angustifolia* e assim compreender de maneira dinâmica e abrangente os processos aos quais a espécie está submetida em seu ecossistema de ocorrência, permitindo avançar em questões pertinentes a sua conservação.

Ao serem avaliados os aspectos genéticos da espécie foram empregadas de maneira integrativa metodologias de análise distintas buscando-se entender como ocorre a dinâmica espaço-temporal na

diversidade genética e no fluxo de pólen de fragmentos e árvores de *Araucaria angustifolia* isolados na paisagem. De modo geral, grande parte resultados encontrados no presente estudo destacam que existem variações nas informações obtidas em avaliações feitas em diferentes anos. Deste modo, é essencial que novos estudos genéticos-ecológicos devam focar tanto na avaliação de diferentes anos, assim como em diferentes locais. Ainda cabe ressaltar que na condução de estudos genéticos futuros com a espécie os desvios de genotipagem devem ser considerados no processamento e análise de marcadores microsatélites.

Em resumo os resultados encontrados demonstraram que as populações de *A. angustifolia* presentes em áreas de campo apresentaram ausência de estrutura genética espacial, o que significa dizer que indivíduos mais próximos geneticamente não ocorrem mais próximos no paisagem, ou seja, estes estão distribuídos de maneira aleatória no espaço. Fato este que permite que planos de coletas de sementes nestes locais sejam feitos sem a necessidade de respeitar uma distância mínima entre plantas para evitar a coleta de indivíduos aparentados. Foram encontrados índices de fixação significativos nas populações adultas e também nas progênies, índices que podem representar o potencial de perda de diversidade genética das populações, ao longo das gerações. Contudo, a alta diversidade genética encontrada pode contrapor esse efeito se o amplo fluxo gênico verificado continuar a ocorrer na populações. Com isso, a baixa taxa de cruzamentos entre indivíduos aparentados encontrada pode ter ocorrido devido a este amplo fluxo gênico. Os valores de imigração de pólen encontrados indicam que pelo menos metade do pólen é oriundo de fora das populações avaliadas. Isso indica que ambas as populações estudadas de *A. angustifolia* não encontram-se geneticamente isoladas e além do mais, apresentam um potencial para conservação genética da espécie na paisagem, por representarem a conexão genética com outros fragmentos ou árvores isoladas. Isso demonstra que essas populações possuem um alto valor para conservação *in situ*, bem como para coleta de sementes para programas de melhoramento, restauração e conservação *ex situ*. Contudo, os padrões de movimentação de pólen demonstram que as coletas devem envolver mais de um ano, de modo a abranger o máximo da variabilidade genética e do potencial adaptativo da espécie.

Embora a *A. angustifolia* seja polinizada pelo vento, houve uma baixa associação dos padrões de movimentação de pólen desta com os ventos predominantes na região, indicando um padrão anisotrópico de fluxo de pólen. Todavia, a alta associação das características da

paisagem com os padrões de movimentação de pólen demonstram que a composição da paisagem é determinante na movimentação de pólen. Os indícios da presença de forças evolutivas como deriva, migração, endogamia, mutação e migração nos resultados encontrados deste estudo contribuem no avanço da compreensão de como esses processos biológicos podem agir sobre a diversidade genética das populações.



## APÊNDICES

**Apêndice 1** - Variáveis de diâmetro em centímetros das plantas avaliadas nas áreas FSR e FECAV.

Local	N	Mínimo	Máximo	Média	E.pad	Dev.pad,	S-W (p)
FSR	170	31	207	98,8	3,0	39,4	0,0001
FECAV	65	49	220	119,4	5,1	40,9	0,976

Er.pad = Erro padrão; Dev.pad = Desvio padrão; S-W (p), valor de p para o teste de aderência a distribuição normal Shapiro-Wilk.

**Apêndice 2** - Variáveis de produtividade de sementes de *Araucaria angustifolia* em diferentes eventos reprodutivos, avaliados para região de Lages SC. Letras A, B, C e D representam diferentes populações avaliadas no município de Lages – SC.

Evento reprodutivo	2013 A		2013 B		2015 C		2016 C		2017 C		2017 D		GERAL	
Variável	Média	(DP)												
Peso da pinha (g)	1304,0	387,0	1312,6	511,1	-	-	1193,8	441,9	1495,3	436,2	1714,8	635,7	1404,1	204,6
Número de pinhões/pinha	97,6	111,0	83,9	30,5	86,4	35,3	85,0	30,8	85,4	33,7	73,1	27,7	85,2	7,8
Peso pinhões (g)	576,7	220,0	580,1	256,8	664,3	294,3	573,5	250,1	566,4	254,3	581,4	287,1	590,4	36,6
Peso falhas (g)	1206,4	388,6	1228,6	490,9			1095,5	441,7	1410,7	424,0	1133,4	435,7	1214,9	121,9
Peso/por pinhão (g)	6,9	2,2	8,4	11,0	8,3	6,3	6,7	1,8	6,8	1,6	7,7	2,0	7,5	0,8
% Peso pinhões na pinha	43,9	11,1	45,9	16,5			47,2	12,3	40,4	39,8	33,2	11,5	42,1	5,6
N árvores (total)	10,0	-	10,0	-	16	-	18	-	18,0	-	12,0	-	84*	-
N pinhas (total)	50	-	50	-	76	-	90	-	84	-	57	-	407	-

DP = Desvio padrão.

**Apêndice 3** – Sucesso reprodutivo (Srp) de plantas masculinas de *Araucaria angustifolia* em diferentes anos e locais de avaliação (Fazenda Santa Rita - FSR e Fazenda Experimental do CAV – FECAV) no município de Lages, SC.

Pai determinado	Srp (%) FSR 2015	Srp (%) FSR 2016	Srp (%) FSR 2017	Pai determinado	Srp (%) FECAV 2017
19M	3,3	2,6	-	07M	1,7
20M	2,2	5,2	2,9	11M	2,6
21I	1,6	-	-	12M	10,3
22M	0,5	0,5	0,5	17I	0,9
24M	-	2,1	1,9	18I	0,9
25M	29,3	10,9	9,7	19I	2,6
27M	2,2	7,3	3,4	21I	0,9
28M	1,1	1,0	-	22M	0,9
30M	-	1,0	1,0	23I	3,4
31M	2,7	5,2	5,3	24M	2,6
32M	-	1,0	0,5	26M	1,7
33M	2,2	3,1	0,5	27M	12,9
35I	0,5	1,0	1,0	28I	4,3
36I	-	0,5	0,5	30I	1,7
37I	0,5	-	-	33M	1,7
38I	0,5	0,5	-	35M	0,9
39I	0,5	-	-	38M	1,7
39M	-	0,5	-	39I	3,4
40M	-	2,6	1,5	44I	7,8
42M	-	-	1,9	53I	0,9
45M	-	2,1	3,4	57I	5,2
46M	-	0,5	-	59M	0,9
49I	-	1,0	-	60M	2,6
52M	1,1	-	0,5	61M	6,0
55M	-	1,6	1,0	62I	0,9
57M	-	1,0	0,5	64M	0,9
58M	-	-	0,5	66I	11,2
59I	-	1,0	0,5	67I	5,2
61I	0,5	-	-	68I	3,4
62I	-	0,5	-		
63M	0,5	-	0,5		
64M	-	0,5	-		
65M	0,5	-	0,5		
66M	0,5	-	-		
69M	-	0,5	1,9		
69MF	1,1	-	-		
72M	6,5	1,0	3,4		

Continua

## Continuação

Pai determinado	Srp (%) FSR 2015	Srp (%) FSR 2016	Srp (%) FSR 2017	Pai determinado	Srp (%) FECAV 2017
73M	1,6	1,0	2,9		
74I	-	0,5	-		
78M	-	-	0,5		
80I	1,1	0,5	0,5		
81I	0,5	1,0	0,5		
82M	0,5	1,6	0,5		
83M	0,5	1,6	-		
85M	2,2	1,6	11,7		
86M	0,5	-	0,5		
87M	2,7	4,2	5,3		
88M	0,5	-	-		
89M	0,5	0,5	-		
96M	0,5	-	-		
102I	-	1,0	-		
103M	0,5	-	1,0		
104I	1,1	1,0	0,5		
105M	0,5	0,5	0,5		
106M	0,5	0,5	-		
107M	-	0,5	0,5		
108M	0,5	-	0,5		
109I	-	1,6	0,5		
110I	-	0,5	-		
112I	0,5	1,6	-		
114I	-	2,1	-		
115M	1,1	0,5	-		
116I	-	0,5	-		
117I	-	0,5	0,5		
119M	2,2	0,5	1,5		
121I	0,5	1,6	-		
122I	-	0,5	0,5		
123I	-	0,5	0,5		
126I	-	0,5	0,5		
128M	2,2	-	1,0		
131I	4,3	1,0	-		
132I	-	0,5	-		
133I	1,1	0,5	4,4		
134M	2,7	0,5	6,8		
135I	1,1	-	0,5		
137M	-	0,5	1,0		
138M	-	1,0	-		
141I	1,1	0,5	1,5		
142M	-	0,5	-		
143I	0,5	-	-		
144I	-	1,6	0,5		
149I	0,5	1,0	-		
147I	0,5	-	-		
151M	0,5	-	2,9		
154I	-	0,5	-		
155I	-	0,5	-		
158M	0,5	-	-		

Continua

## Continuação

Pai determinado	Srp (%) FSR 2015	Srp (%) FSR 2016	Srp (%) FSR 2017	Pai determinado	Srp (%) FECAV 2017
159I	-	1,0	0,5		
161M	0,5	-	0,5		
162M	-	0,5	0,5		
163M	0,5	0,5	-		
164M	-	1,0	-		
166M	-	1,0	-		
168I	0,5	0,5	0,5		
171I	-	-	0,5		
174M	1,1	-	0,5		
175I	-	0,5	-		
177M	0,5	-	2,4		
179M	-	0,5	0,5		
180M	2,2	-	0,5		
182I	0,5	1,0	1,9		
184I	1,1	0,5	1,0		
185I	0,5	1,0	-		
187I	-	0,5	-		