

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MOESES ANDRIGO DANNER

**POLINIZAÇÃO DIRIGIDA E PLANTAS MONÓICAS NO MELHORAMENTO
GENÉTICO DE *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.**

CURITIBA

2013

MOESES ANDRIGO DANNER

**POLINIZAÇÃO DIRIGIDA E PLANTAS MONÓICAS NO MELHORAMENTO
GENÉTICO DE *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.**

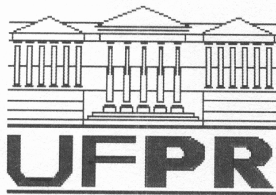
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Flávio Zanette

Co-orientador: Dr^a. Juliana Zanetti Ribeiro

CURITIBA

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL

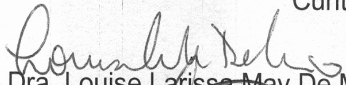


PARECER


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a argüição da Tese de DOUTORADO, apresentada pelo candidato **MOESES ANDRIGO DANNER**, sob o título **“POLINIZAÇÃO DIRIGIDA E PLANTAS MONÓICAS NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.”**, para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

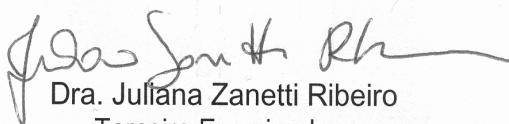
Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato são de parecer pela **"APROVAÇÃO"** da Tese.

Curitiba, 17 de Dezembro de 2012.



Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Coordenadora do Programa


Professor Dr. Miguel Pedro Guerra
Primeiro Examinador


Professora Dra. Juliana Vitoria Messias Bittencourt
Segunda Examinadora


Dra. Juliana Zanetti Ribeiro
Terceira Examinadora


Professor Dr. João Carlos Bernaldo Filho
Quarto Examinador


Professor Dr. Flávio Zanette
Presidente da Banca e Orientador

Dedico este trabalho aos meus pais e
irmãos e à minha esposa Simone.

AGRADECIMENTOS

À Beatriz e Idanir, pais incentivadores e amorosos, pelos ensinamentos de honestidade, trabalho intensivo e perseverança.

Aos meus irmãos Angela e Marcelo, pelo apoio e amor a mim dedicados.

À Simone Sasso por todo amor, carinho e exemplos de inteligência emocional.

À Odila e Irineo Sasso, pelo apoio incondicional e exemplos de paciência e generosidade.

Ao professor Flávio Zanette pela orientação, apoio e confiança.

À Juliana Zanetti Ribeiro e Milena de Luna Alves Lima pelos ensinamentos e auxílio na condução dos trabalhos de laboratório e correções na tese.

À Juliana Vitória Messias Bittencourt e Luciano Medina Macedo pelos primeiros ensinamentos de biologia molecular, doação dos *primers* utilizados e correções na tese.

Ao professor Alexandre Magno Sebbenn pelos ensinamentos em genética de populações e auxílio nas análises estatísticas da tese.

Aos que auxiliaram nas coletas (de pinhões e acículas): Ricardo e Délcio Ströher (Aratiba-RS), Saulo Küster (Parque das Araucárias, Guarapuava-PR), Tassio Dresch Rech (Epagri de Lages-SC), Vânio Czerniak (Caçador-SC) e Derico Dallacosta (Pato Branco-PR).

Aos professores do PGAPV pelos ensinamentos, principalmente Luiz Antonio Biasi e João Carlos Bespalhok pelas excelentes sugestões na qualificação, pré-defesa e defesa da tese. Ao professor Miguel Pedro Guerra pelas sugestões feitas na defesa da tese.

Aos professores que passaram por minha vida, por favorecer meu desenvolvimento como profissional e cidadão, especialmente à Rosmari Locatelli (1ª a 5ª séries, Aratiba-RS) e Idemir Citadin (orientador de Graduação e Mestrado na UTFPR, Campus Pato Branco-PR).

À Lucimara Antunes, secretária do PGAPV, pelo auxílio sempre que necessário, principalmente com as documentações.

Aos colegas da Pós-Graduação, por compartilhar dificuldades e experiências, especialmente aos amigos César Gubert e Celso Lopes de Albuquerque Júnior.

A todos os colegas da Epagri da região de São Lourenço do Oeste, pelo apoio e ensinamentos, especialmente ao gerente Paulo Scremim, pelo apoio incondicional desde o primeiro contato.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Moeses Andriago Danner é nascido em 05 de dezembro de 1984 em Aratiba, Rio Grande do Sul, filho caçula de Beatriz e Idanir, tendo como irmãos Angela e Marcelo. Estudou da 1ª a 5ª séries na Escola Estadual Eduardo Filbert, na Linha Bentevi, e da 6ª série ao 3º ano do Segundo Grau na Escola Estadual de Aratiba. Fez graduação em Agronomia, de 2002 a 2006, na UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná), Campus Pato Branco. Em 2006 foi eleito aluno destaque dos cursos de Engenharia da UTFPR. De 2007 a 2009 fez Mestrado em Agronomia, na mesma Universidade, e apresentou dissertação intitulada “Diagnóstico ecogeográfico e caracterização morfogenética de jabuticabeiras”, com orientação do professor Dr. Idemir Citadin. Em 2008 e 2009 foi professor substituto nas disciplinas de “Estatística” e “Genética e Melhoramento Vegetal” do Curso de Agronomia da UTFPR, em Pato Branco. Em 2009 ingressou no doutorado do PGA-PV (Programa de Pós-Graduação em Agronomia - área de concentração em Produção Vegetal), da UFPR (Universidade Federal do Paraná), e apresenta sua tese intitulada “Polinização dirigida e plantas monóicas no melhoramento genético de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.”, orientado pelo professor Dr. Flávio Zanette. Desde junho de 2010 trabalha como extensionista rural na Epagri (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina), em função de concurso público realizado em 2006. Atualmente, reside em Pato Branco, Paraná, e trabalha na Gerência Regional da Epagri de São Lourenço do Oeste e no Escritório Municipal da Epagri de Jupiá, Santa Catarina.

RESUMO

A araucária (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (Araucariaceae)) é uma espécie nativa do Brasil e atualmente considerada em extinção. Estudos de diversidade genética e sistema de reprodução são importantes para a conservação e melhoramento genético da espécie. O objetivo geral do presente trabalho foi determinar o potencial de progênies de polinizações dirigidas e de progênies de plantas monóicas de *A. angustifolia* para o melhoramento genético. Para isto, os objetivos específicos foram: gerar um novo protocolo para isolamento de DNA de acículas de araucária; verificar a segregação genética dos locos microssatélites utilizados; comparar a diversidade genética de progênies de polinizações dirigidas e de plantas monóicas com progênies de polinização livre de plantas dióicas de araucária; confirmar o parentesco esperado de irmãos-completos em progênies de polinização dirigida; e determinar o sistema de reprodução de plantas monóicas de *A. angustifolia*. Foram genotipados os genitores e os juvenis de progênies de polinização dirigida e de polinização livre de plantas dióicas e monóicas, utilizando oito locos microssatélites. O protocolo estabelecido permitiu o isolamento de DNA de boa qualidade e em grande quantidade, e é uma opção mais rápida e barata que os protocolos descritos na literatura para isolamento de DNA de acículas de *A. angustifolia*. Os oito locos microssatélites (Ag20, Ag23, Ag45, Aang01, Aang14, Aang28, As90 e CRCAc1) podem ser usados para estudos genéticos em *A. angustifolia*, pois apresentaram segregação Mendeliana. As progênies de polinização dirigida e as progênies de polinização livre de plantas monóicas de *A. angustifolia* tem elevado potencial para o melhoramento genético, pois têm alta diversidade genética, embora em menor grau que progênies de polinização livre de plantas dióicas. O parentesco nas progênies de polinização dirigida é de irmãos-completos, o que confirma as hibridações realizadas. As plantas monóicas têm modo de reprodução por xenogamia, gerando progênies com alta proporção de irmãos de cruzamentos (94-95%) e baixa proporção de irmãos de autofecundação (5-6%).

Palavras-chave: Araucária, marcadores microssatélites, monoiccia, diversidade genética, sistema de reprodução.

**ARTIFICIAL POLLINATION AND MONOECIOUS TREES IN BREEDING OF
Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze.**

ABSTRACT

The Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (Araucariaceae)) is a native species from Brazil and currently considered endangered. Genetic diversity and mating system studies become important to promote conservation and breeding of species. The overall objective of this study was to determine the potential of artificial pollination progenies and progenies of monoecious trees of *A. angustifolia* for breeding. For this, the specific objectives were: to generate a new protocol for DNA isolation from Brazilian pine leaves; to investigate the genetic segregation in microsatellite loci used; to compare the genetic diversity of artificial pollination and open pollination progenies of monoecious trees with open pollination progenies of dioecious *A. angustifolia*; to confirm the relatedness expected full-sib in artificial pollination progenies; and to determine the mating system of monoecious *A. angustifolia*. We genotyped the parents and juvenile plants from artificial and open pollination progenies of the dioecious and monoecious trees, using eight microsatellite loci. The established protocol allowed DNA isolation of good quality and large quantity, and is faster and cheaper than other protocols described in the literature for DNA isolation of *A. angustifolia* leaves. The eight microsatellites loci (Ag20, Ag23, Ag45, Aang01, Aang14, Aang28, As90 and CRCAC1) can be used for genetic studies in *A. angustifolia*, showing Mendelian segregation. The artificial pollination progenies and the open pollinated progenies of the monoecious *A. angustifolia* have high potential for breeding, as they have high genetic diversity, although to a lower degree than open pollination progenies of dioecious trees. The relatedness in artificial pollination progenies is full-sib, which confirms the crosses made. The monoecious trees are reproductive mode by xenogamy, generating progeny with high proportion of crosses sibs (94-95%) and low proportion of selfing sibs (5-6%).

Key-words: Brazilian pine, microsatellites markers, monoicy, genetic diversity, mating system.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Araucárias com alta produção de pinhas. A: Planta de Caçador-SC, que produziu 398 pinhas em 2008. B: Planta de Bom Retiro-SC, que produziu 380 pinhas em 2011.....25

Figura 2. Araucária monóica com pinha e mingote visíveis, localizada em Curitiba, Paraná.29

CAPÍTULO I

Figura 1. Ferograma dos produtos de amplificação do DNA de 10 indivíduos de *Araucaria angustifolia*, com o *primer* microssatélite Ag20.44

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Unidades de Conservação da Floresta com Araucária e campos associados, criadas em 2005 e 2006 nos Estados de Santa Catarina e Paraná.....	22
Tabela 2. Volume total e preços médios de comercialização do pinhão, de 2007 a 2011, nos principais mercados atacadistas da área de ocorrência natural da araucária.	24
Tabela 3. Época de maturação de pinhões de cinco variedades de <i>Araucaria angustifolia</i> , segundo descrição de Reitz e Klein (1966).	26

CAPÍTULO I

Tabela 1. Características dos seis protocolos utilizados nos testes iniciais de isolamento de DNA de <i>Araucaria angustifolia</i>	42
Tabela 2. Comparação entre o protocolo de isolamento de DNA obtido no presente trabalho e protocolos da literatura.	46

CAPÍTULO II

Tabela 1. Tipos de progênies, genitores e distância entre genitores utilizados na análise de segregação em <i>Araucaria angustifolia</i>	55
Tabela 2. Locus microssatélites, com motivos de repetição, número de acesso no GenBank, os respectivos autores e a espécie com que foi desenvolvido.	56
Tabela 3. Características dos <i>primers</i> microssatélites utilizados nas análises genéticas em <i>Araucaria angustifolia</i>	57
Tabela 4. Frequências alélicas e presença de alelos privados de oito locos microssatélites em progênies de 11 polinizações dirigidas e seis polinizações livres de <i>Araucaria angustifolia</i>	59
Tabela 5. Teste de herança Mendeliana de oito locos microssatélites em progênies de polinização dirigida de <i>Araucaria angustifolia</i>	61
Tabela 6. Teste de herança Mendeliana de oito locos microssatélites em progênies de polinização livre de <i>Araucaria angustifolia</i>	64

CAPÍTULO III

Tabela 1. Diversidade genética e índice de fixação de árvores adultas dióicas e monóicas de <i>Araucaria angustifolia</i>	76
Tabela 2. Diversidade genética e índice de fixação de juvenis de progênies de polinização dirigida e de polinização livre de <i>Araucaria angustifolia</i>	77
Tabela 3. Diversidade genética e índice de fixação de juvenis de progênies de polinização livre de plantas dióicas e de plantas monóicas de <i>Araucaria angustifolia</i>	79
Tabela 4. Diversidade genética de cada uma das progênies de polinização dirigida e de polinização livre de plantas dióicas e monóicas de <i>Araucaria angustifolia</i>	82

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Estimativas do sistema de reprodução de progênies de polinização dirigida e de polinização livre de plantas dióicas e monóicas de <i>Araucaria angustifolia</i>	94
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 ORIGEM E EVOLUÇÃO DA <i>Araucaria angustifolia</i>	16
2.2 BOTÂNICA E FENOLOGIA DA <i>A. angustifolia</i>	17
2.3 A FLORESTA COM ARAUCÁRIA	19
2.4 PLANTIO DE ARAUCÁRIAS PARA PRODUÇÃO DE PINHÕES	23
2.5 DIVERSIDADE E MELHORAMENTO GENÉTICO DE <i>A. angustifolia</i>	26
2.6 POLINIZAÇÃO DIRIGIDA EM <i>A. angustifolia</i>	28
2.7 OCORRÊNCIA DE PLANTAS MONÓICAS EM <i>A. angustifolia</i>	29
3 CAPÍTULO I - PROTOCOLO RÁPIDO PARA ISOLAMENTO DE DNA DE ACÍCULAS DE <i>Araucaria angustifolia</i>	38
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	40
3.1 INTRODUÇÃO	41
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.4 CONCLUSÕES	47
3.5 REFERÊNCIAS.....	48
4 CAPÍTULO II - SEGREGAÇÃO EM OITO LOCOS MICROSSATÉLITES EM PROGÊNIES DE <i>Araucaria angustifolia</i>	51
RESUMO.....	52
ABSTRACT.....	53
4.1 INTRODUÇÃO	54
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.4 CONCLUSÕES	66
4.5 REFERÊNCIAS.....	67
5 CAPÍTULO III - DIVERSIDADE GENÉTICA EM PROGÊNIES DE POLINIZAÇÃO DIRIGIDA E LIVRE DE <i>Araucaria angustifolia</i>.....	70
RESUMO.....	71
ABSTRACT.....	72

5.1 INTRODUÇÃO	73
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	74
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
5.4 CONCLUSÕES	83
5.5 REFERÊNCIAS.....	84
6 CAPÍTULO IV - EFICIÊNCIA DE POLINIZAÇÕES DIRIGIDAS E AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE REPRODUÇÃO DE PLANTAS MONÓICAS DE <i>Araucaria angustifolia</i>	88
RESUMO.....	89
ABSTRACT.....	90
6.1 INTRODUÇÃO	91
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	92
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
6.4 CONCLUSÕES	99
6.5 REFERÊNCIAS.....	100
7. CONCLUSÕES GERAIS	103
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104

1 INTRODUÇÃO GERAL

A Floresta com Araucária ocorria numa extensão de 18,2 milhões de hectares no Brasil até fim do século XIX, principalmente nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Hueck, 1972). O intenso desmatamento para o cultivo agrícola e utilização da madeira de araucária no século XX reduziu a área ocupada pela Floresta com Araucária para menos de 3% da original (Guerra et al., 2002). Em consequência, a araucária (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.) está na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (MMA, 2008).

Atualmente, as populações de *A. angustifolia* ocorrem predominantemente em fragmentos pequenos, e existem poucas florestas primárias contínuas. O desmatamento ocasionou a extração dos indivíduos de araucária com melhores fenótipos, os quais provavelmente tinham grande potencial para o melhoramento genético. Além disto, a diversidade genética da espécie é menor nas matas fragmentadas em relação àquelas mais conservadas (Auler et al., 2002; Medri et al., 2003; Bittencourt e Sebbenn, 2009). Isto é agravado pela baixa taxa de regeneração natural da araucária na mata fechada (Paludo et al., 2009). Assim, há a necessidade de se desenvolver programas de conservação *in situ* e *ex situ* e de melhoramento genético, visando o manejo sustentável e a instalação de plantios para exploração de pinhões, com consequente valorização econômica da araucária (Guerra et al., 2002; Zanette, 2010).

Neste sentido, o estudo da diversidade genética é essencial, pois auxilia na seleção de plantas e sementes a serem utilizadas para a produção de mudas ou para polinizações dirigidas. Estudos sobre o conhecimento do sistema de reprodução são de fundamental importância no melhoramento genético, pois afetam os níveis de endogamia e de diversidade genética. A *A. angustifolia* é uma espécie comumente dióica e se reproduz por cruzamentos, mas, de forma rara, há algumas plantas monóicas da espécie, que podem se autofecundar, e para as quais não há informações na literatura sobre seu sistema de reprodução. Deste modo, a avaliação da variabilidade genética nas progênies e do sistema de reprodução das araucárias monóicas, assim como a confirmação da efetividade das polinizações dirigidas podem ser verificadas por meio de marcadores microsatélites, de forma a subsidiar programas de melhoramento genético da espécie.

O objetivo geral do presente trabalho foi verificar o potencial de progênies de polinizações dirigidas e de plantas monóicas de *A. angustifolia* para programas de

melhoramento genético da espécie. Para isto, os objetivos específicos foram: (1) Gerar um protocolo para isolamento de DNA de acículas de araucária; (2) Verificar a segregação genética de oito locos microssatélites de *A. angustifolia* nas progênes estudadas; (3) Comparar a diversidade genética de progênes de polinizações dirigidas e de araucárias monóicas com progênes de polinização livre de araucárias dióicas; (4) Confirmar o parentesco esperado de irmãos-completos em progênes de polinização dirigida; e (5) Determinar o sistema de reprodução de araucárias monóicas.

REFERÊNCIAS

AULER, N.M.F.; REIS, M.S.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. The genetics conservation of *Araucaria angustifolia*: 1 - genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptative variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.3, p.329-338, 2002.

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

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

HUECK, K. **As florestas da América do Sul: ecologia, composição e importância econômica**. São Paulo: Polígono, 1972. 466p.

MEDRI, C.; RUAS, P.M.; HIGA, A.R.; MURAKAMI, M.; RUAS, C.F. Effects of forest management on the genetic diversity in a population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Silvae Genetica**, v.52, n.5-6, p.202-205, 2003.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção e com deficiência de dados**. Instrução Normativa 06/2008. Disponível em: <www.mma.gov.br> Acesso em: 10 de outubro de 2010.

PALUDO, G.F.; MANTOVANI, A.; KLAUBERG, C.; REIS, M.S. Estrutura demográfica e padrão espacial de uma população natural de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae), na reserva genética florestal de Caçador, Estado de Santa Catarina. **Revista Árvore**, v.33, n.6, p.1109-1121, 2009.

ZANETTE, F. **A araucaria como fruteira para a produção de pinhões**. Série Frutas Nativas. Jaboticabal: Funep, 2010. 25p.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ORIGEM E EVOLUÇÃO DA *Araucaria angustifolia*

A família Araucariaceae, o grupo mais primitivo de coníferas ainda vivas, atualmente é exclusiva do Hemisfério Sul, embora espécies da família já tenham habitado o Hemisfério Norte (Stockey, 1994). Esta família surgiu há 308 ± 53 milhões de anos, na Era Paleozóica, durante o período Carbonífero Superior (Liu et al., 2009). A família consiste em três gêneros: *Araucaria*, *Agathis* e *Wollemia*. *Araucaria* é o gênero com maior número de espécies, 19. Na América do Sul há apenas duas espécies: *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, denominada de araucária, pinheiro brasileiro ou pinheiro do Paraná, dispersa principalmente no Sul do Brasil; e *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch, conhecida como araucária do Chile e dispersa na região dos Andes, no Chile e na Argentina (Dutra e Stranz, 2009). Análises filogenéticas baseadas em genes do cloroplasto demonstraram que estas duas espécies são extremamente relacionadas (Setoguchi et al., 1998; Kershaw e Wagstaff, 2001; Patreze e Tsai, 2010). As demais espécies de *Araucaria* são encontradas na Nova Caledônia (13 espécies endêmicas), Austrália, Papua Nova Guiné e Ilha Norfolk (Dutra e Stranz, 2009).

A. angustifolia é considerada um fóssil vivo, pois foi submetida a milhões de anos de seleção natural e sobreviveu a grandes transformações climáticas. No Pleistoceno, de 1,8 milhão a 11,5 mil anos atrás, a região dos planaltos subtropicais do Brasil tinha um clima frio, embora não cobertos por gelo, com longos períodos de seca que não permitiam o estabelecimento da araucária. Dados palinológicos indicam que neste período a região era coberta por pastagens de gramíneas, sem formações florestais, e que a araucária sobrevivia em refúgios próximo aos rios (Ledru et al., 1998; Behling e Safford, 2010). No Holoceno houve aumento da temperatura e da umidade, principalmente de 6.000 a 4.000 anos atrás, criando condições mais favoráveis para a expansão de *A. angustifolia*. Porém, a maior expansão da araucária dos refúgios para os campos nos planaltos ocorreu no sul do Brasil e iniciou há menos de 1.500 anos atrás. Uma menor expansão ocorreu nas populações da região Sudeste (MG, SP e RJ), que foram mantidas praticamente isoladas em relação umas das outras, em locais de altitudes superiores a 1.200 m (Behling, 2002). Esta condição de dispersão histórica interferiu na diferenciação genética entre populações do Sul e Sudeste do Brasil, como verificado por Stefenon et al. (2007) e Souza et al. (2009), utilizando marcadores moleculares.

O pico de expansão da floresta com araucária coincidiu com o período de ocupação dos planaltos do Sul do Brasil por grupos indígenas de tradição Taquara/Itararé, principalmente Kaingang e Xokleng, que tinham como característica marcante a construção de casas subterrâneas. Estes povos plantavam araucárias para demarcar seu território e para a produção de pinhão, utilizado como principal alimento no inverno. Por isto, os limites geográficos e altimétricos de sua ocupação são coincidentes com o domínio da Floresta com Araucária (Bitencourt e Krauspenhar, 2006; Iriarte e Behling, 2007). A expansão da Floresta com Araucária sobre os campos no Sul do Brasil, a partir de 1.400 anos atrás, está relacionada também com a redução da frequência do fogo após este período (Jeske-Pieruschka et al., 2010). Segundo Gessert et al. (2011), pela observação do conteúdo de pólen e carvão vegetal em um solo da província de Misiones, Argentina, estima-se que a ocupação pela araucária se deu a partir de 1.810 anos atrás e coincide com a maior intensidade da atividade humana, o que pode ser um indicativo de que a espécie foi introduzida nesta região pelos povos indígenas. Como a semente da araucária (pinhão) é grande e pesada, mesmo a dispersão zoocórica é limitada a pequenas distâncias, o que reforça a idéia da contribuição antropogênica na dispersão da espécie.

2.2 BOTÂNICA E FENOLOGIA DA *A. angustifolia*

A araucária foi descrita cientificamente pelo naturalista europeu Antonio Bertolini, em 1820, a partir da coleta de um exemplar plantado no Morro do Corcovado, Rio de Janeiro. Inicialmente ele a denominou *Columbea angustifolia*. Depois por afinidade à *Araucaria araucana*, passou à *Araucaria angustifolia* (Mattos, 1994). A espécie possui a seguinte classificação botânica: divisão Gymnospermae, classe Coniferopsida, ordem Coniferae, família Araucariaceae, gênero *Araucaria*, espécie *angustifolia* (Joly, 1983).

A *A. angustifolia* é uma espécie dióica, ou seja, com árvores masculinas e femininas distintas, podendo viver de 200 a 300 anos. A árvore é perenifólia, com altura média de 20 a 25 m e 1,0 a 1,5 m de diâmetro. Apresenta o tronco reto e cilíndrico, com ramos dispostos em 8 a 15 verticilos, tendo 6 a 10 ramos por verticilo. As araucárias adultas tem formato de candelabro, devido à perda dos verticilos basais. A gema apical dos ramos primários e secundários é plagiotrópica, ocasionando o crescimento lateral. Os ramos secundários são

conhecidos por grimpas e contém as folhas, denominadas de acículas (Hertel, 1980; Carvalho, 1994; Mattos, 1994).

As inflorescências desenvolvem-se na extremidade dos ramos na planta adulta. A primeira floração normalmente ocorre entre 15 a 20 anos do plantio da semente. Uma característica marcante das coníferas é o arranjo dos órgãos reprodutivos de maneira espiralada, formando um cone, também chamado de estróbilo. As plantas femininas apresentam folhas modificadas denominadas ginostrobilos, os quais são compostos por mais de 200 folhas carpelares, inseridas ao redor de um eixo cônico. O óvulo nasce na axila, protegido por uma folha modificada estéril. Esta folha une-se a outra folha modificada estéril envolvendo o óvulo fecundado, formando a semente da araucária, denominada de pinhão. O estróbilo feminino maduro, denominado de pinha, apresenta três tipos de estruturas: o pinhão cheio, o pinhão chocho (que não foi fecundado) e as escamas de preenchimento. As plantas masculinas possuem folhas modificadas denominadas androstróbilos, conhecidos como mingotes, que são formados por numerosas escamas inseridas em torno de um eixo alongado, de 10 a 15 cm. Em seu interior estão localizados diversos sacos polínicos, onde se desenvolvem os grãos de pólen (Joly, 1983; Mattos, 1994).

Os indivíduos de *A. angustifolia* produzem novos estróbilos anualmente. Nas árvores masculinas, todos os androstróbilos encontram-se no mesmo estágio de desenvolvimento. Para as condições de Curitiba, Paraná, o crescimento ocorre de novembro a agosto, com amadurecimento e liberação dos grãos de pólen em setembro e outubro, quando os mingotes passam da cor verde para marrom, com ciclo de 11 meses. As árvores femininas apresentam ginostrobilos durante todo o ano e em diferentes estádios de desenvolvimento, que podem ser identificados pelo seu tamanho. Entre novembro a junho há ginostrobilos no 1º, 2º e 3º ano de desenvolvimento em uma mesma árvore. O primeiro estágio do ginostrobilo não é visível, pois está protegido por acículas. No segundo estágio os ginostrobilos estão prontos para receber o pólen. No terceiro estágio os ginostrobilos já foram polinizados. De junho a novembro distinguem-se dois estádios de desenvolvimento, pois a indução dos novos ginostrobilos ocorre em novembro. Após a polinização, em setembro e outubro do ano seguinte, ocorre o desenvolvimento dos pinhões, que amadurecem 20 a 25 meses mais tarde, de abril a setembro (Anselmini et al., 2006).

Em Campos do Jordão, São Paulo, a polinização de *A. angustifolia* ocorreu em agosto e setembro, mais precocemente que em Curitiba. Os estróbilos apresentaram crescimento lento durante 10 a 12 meses, seguido de fase acelerada de crescimento até atingirem a maturação, após 20 a 24 meses da polinização, de março a julho (Mantovani et al., 2004). Este

início do rápido crescimento provavelmente coincide com a fertilização, que segundo Shimoya (1962) ocorre aproximadamente um ano após a polinização.

A polinização da *A. angustifolia* é anemófila e é mais efetiva sob tempo seco, pois em anos chuvosos ocorre baixa taxa de fecundação e menor produção de pinhões (Anselmini et al., 2006). Há aproximadamente 1.300 microesporófilos por androstróbilo, cada microesporófilo contém aproximadamente 10 a 15 microesporângios, que contém entre 500 a 1.000 grãos de pólen (Hertel, 1980). Desta forma, cada androstróbilo pode produzir milhões de grãos de pólen. Segundo Sousa e Hattemer (2003), o grão de pólen da araucária é relativamente grande (61,5 μm) e sem vesícula aerífera, o que determina uma capacidade reduzida para flutuar (12 a 19 cm s^{-1}) e o pólen atinge o solo rapidamente. Estes fatores, combinados com a alta densidade populacional típica de florestas com araucária, pode limitar o movimento do pólen entre e dentro das populações. Porém, contrariando estas expectativas, Bittencourt e Sebbenn (2007) detectaram movimento do pólen até 2,1 km de distância, entre um pequeno grupo isolado de 11 árvores e um fragmento florestal de 5,4 hectares.

2.3 A FLORESTA COM ARAUCÁRIA

A Floresta Ombrófila Mista, também denominada de Floresta com Araucária, é integrante do Bioma Mata Atlântica (Brasil, 2006). Esta formação florestal é caracterizada pela elevada dominância da *A. angustifolia*, que representa aproximadamente 40% dos indivíduos (Koch e Corrêa, 2010). A espécie ocupa o dossel superior da floresta, criando condições de sombreamento para o desenvolvimento de espécies arbóreas como imbuia (*Ocotea porosa*), canelas (*Ocotea* sp., *Nectandra* sp. e *Phoebe* sp.), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), espécies frutíferas da família Myrtaceae, além do xaxim (*Dicksonia sellowiana*) (Nascimento et al., 2001). Também abriga grande diversidade de animais, como queixadas (*Tayassu pecari*), antas (*Tapirus terrestris*), pacas (*Agouti paca*), cutias (*Dasyprocta azarae*), bugios (*Alouatta fusca*), serelepes (*Sciurus ingrami*), papagaios (*Amazona* sp.) e gralhas (*Cyanocorax* sp.) (Koch e Corrêa, 2010). O pinhão é o alimento mais importante durante o inverno para estes animais, sendo excelente fonte de energia (Vidolin et al., 2011).

A distribuição geográfica da Floresta com Araucária é de 19° a 30° S de latitude e 40° a 57° W de longitude. Até final do século XIX, a Floresta com Araucária cobria 182.295 km² (18,2 milhões de hectares) nos planaltos brasileiros, em altitudes entre 500 a 2300 m, sendo 40% da área no Estado do Paraná (73.780 km²), 31% em Santa Catarina (56.693 km²), 25% no Rio Grande do Sul (46.482 km²) e 3% em São Paulo (5.340 km²). Também havia pequenas áreas no noroeste do Rio de Janeiro e sul de Minas Gerais (1% da área), assim como no nordeste da Argentina (Província de Misiones) e leste do Paraguai (Departamento de Alto Paraná) (Hueck, 1972).

Atualmente, a *A. angustifolia* é reconhecida como espécie da flora brasileira ameaçada de extinção (MMA, 2008). Isto porque o extrativismo da madeira reduziu mais de 97% da área de ocorrência da Floresta com Araucária. O restante é encontrado na forma de pequenos fragmentos em propriedades privadas ou em reservas governamentais de conservação. Segundo Castella e Britez (2004), no Estado do Paraná, as florestas primárias ou intocadas não existem mais e restam menos de 1% (66.109 ha) de florestas em estágio avançado de sucessão. No Estado de Santa Catarina, na área de ocorrência da Floresta com Araucária, verificou-se cobertura florestal de 28% do território. Porém, dos 155 remanescentes avaliados no Inventário Florístico Florestal, apenas seis (4,1%) apresentaram-se cobertos por vegetação florestal primária (baixa intervenção humana), sendo que a maioria dos remanescentes (76%) apresentaram florestas degradadas e empobrecidas, com baixa diversidade de espécies. A *Araucaria angustifolia* foi encontrada principalmente na forma de indivíduos jovens, com baixos diâmetros e alturas, e constatou-se pequena e esparsa regeneração natural da espécie (Vibrans et al., 2012).

A madeira serrada e laminada de araucária foi durante várias décadas um dos produtos mais importantes da exportação brasileira. Entre 1915 e 1960 exportou-se cerca de 18,5 bilhões de m³ de madeira, sendo 90% da espécie *A. angustifolia*. Com intuito comercial, até 1960, eram cortadas principalmente araucárias com diâmetro superior a 40 cm, pois as tábuas eram utilizadas na construção civil. Depois começou a fabricação de papel e embalagens com a utilização das araucárias de menor diâmetro. A colonização do interior dos Estados do Sul do Brasil foi intensificada nestas décadas e ocorreu a derrubada total de áreas de Floresta com Araucária, com a utilização dessas terras férteis para agricultura e criação de gado (Koch e Corrêa, 2010). A madeira da araucária é composta de 58,3% de celulose de fibra longa e 28,5% de lignina, podendo assim ser utilizada na produção de papel de alta qualidade. A resina proveniente da casca serve para fabricação de vários produtos químicos, como vernizes, terebentina, acetona e ácido pirolenhoso (Carvalho, 1994; Mattos, 1994).

A falta de regeneração natural da *A. angustifolia* no interior da floresta dificulta sua sobrevivência. As mudas de araucária têm suas necessidades supridas pela semente por cerca de 100 dias após a germinação e o hipocótilo serve como dreno e depósito das reservas das sementes neste estágio (Dillenburg et al., 2010). Nos primeiros meses de crescimento as mudas de araucária tem capacidade de se desenvolver em condições de alto sombreamento, com algumas alterações fisiológicas e morfológicas, como redução do acúmulo de massa seca, em comparação às plantas crescendo a pleno sol (Franco e Dillenburg, 2007). Apesar disto, Souza et al. (2008) observaram falta de indivíduos jovens de araucária em florestas fechadas e baixo recrutamento em florestas submetidas a corte seletivo há 60 anos atrás. Observaram também que indivíduos juvenis são encontrados apenas em sítios mais abertos, com maior incidência de luz, demonstrando que a regeneração é dependente de grandes perturbações na floresta. Paludo et al. (2011) também relataram que a regeneração natural da araucária sob a floresta existe, porém com baixa densidade de indivíduos juvenis. Estes autores sugerem que como a espécie é longeva, ela pode ter sucesso na regeneração, mesmo com baixo número de indivíduos regenerantes.

A atual legislação proíbe a exploração da madeira de araucárias nativas, o que está contribuindo para a desvalorização da espécie, e a conseqüente perda de interesse na conservação. Por isso, deve-se estimular o manejo florestal sustentável, considerando a geração de renda e a conservação conjuntamente. Hess et al. (2010) demonstraram que o manejo é decisivo para aumentar a taxa de crescimento das árvores remanescentes de *A. angustifolia* na floresta, auxiliando também na geração de renda aos agricultores. A regeneração da espécie também seria favorecida, em função da abertura de clareiras na floresta (Paludo et al., 2011).

A fragmentação florestal drástica causou efeitos de gargalo genético (população remanescente contém uma pequena amostra do conjunto gênico da população original) em *A. angustifolia*. Grande parte da diversidade genética desta espécie foi perdida, o fluxo gênico foi fortemente limitado e houve aumento dos cruzamentos entre indivíduos aparentados, gerando endogamia (Auler et al., 2002; Medri et al., 2003; Sousa et al., 2005; Bittencourt e Sebbenn, 2007; Stefenon et al., 2007; Bittencourt e Sebbenn, 2009; Souza et al., 2009). Apesar disso, os remanescentes florestais ainda mantêm altos níveis de diversidade genética de *A. angustifolia* (Stefenon et al., 2009). No entanto, devido ao pequeno tamanho populacional, a manutenção desta diversidade genética nas progênies depende da promoção da conectividade entre os remanescentes. Para isto, é necessário definir e executar estratégias

de conservação *in situ* e *ex situ* da Floresta com Araucária, especialmente em escala de paisagem (Bittencourt, 2007).

A conservação *in situ* deve incluir a preservação conjunta de florestas contínuas e de fragmentos florestais em propriedades particulares, com a criação e manutenção de unidades de conservação governamentais, de corredores de biodiversidade e de RPPNs (Reserva Particular do Patrimônio Natural). Além disto, é necessário favorecer a regeneração natural de indivíduos jovens na floresta, incentivando o manejo florestal sustentável, e estabelecer incentivos fiscais ou pagamento por serviços ambientais para agricultores que mantém fragmentos de Floresta com Araucária (Bittencourt, 2007). De forma geral, é necessário efetuar a conservação de todo e qualquer fragmento florestal ou plantas isoladas de araucária, principalmente em regiões onde estes são escassos, pois eles são efetivos na conectividade genética através do fluxo de pólen (Bittencourt e Sebbenn, 2007).

Em dezembro de 2002, o Ministério do Meio Ambiente definiu áreas prioritárias para criação de unidades de conservação (UCs) da Floresta com Araucária e campos associados nos Estados do Paraná e Santa Catarina, sendo que foram criadas duas UCs Federais em Santa Catarina e quatro UCs no Paraná, em 2005 e 2006 (Tabela 1).

Tabela 1. Unidades de Conservação da Floresta com Araucária e campos associados, criadas em 2005 e 2006 nos Estados de Santa Catarina e Paraná.

Estado	Unidade de Conservação	Localização	Área (ha)
Santa Catarina	Estação Ecológica da Mata Preta	Abelardo Luz	9.006
	Parque Nacional das Araucárias	Ponte Serrada e Passos Maia	16.824
Paraná	Parque Nacional dos Campos Gerais	Ponta Grossa, Castro e Carambeí	21.749
	Reserva Biológica das Araucárias	Imbituva, Teixeira Soares e Ipiranga	16.078
	Reserva Biológica das Perobas	Tuneiras do Oeste e Cianorte	11.000
	Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas	Palmas e General Carneiro	16.445

Fonte: MMA - Ministério do Meio Ambiente (2005).

De forma geral, os processos de implantação destas UCs estão em estágios iniciais e ocorrendo lentamente, sendo coordenados pelo ICMBio (Instituto Chico Mendes de Biodiversidade). A implantação deve seguir as seguintes etapas, não necessariamente nesta ordem e podendo ocorrer simultaneamente: 1) consolidação territorial da UC: envolve a regularização fundiária (compra de terras de particulares e/ou transferência/cessão de terras entre União-Estados-Municípios) e a delimitação (instalação de marcos em seu perímetro) e sinalização dos limites; 2) formação do Conselho (consultivo ou deliberativo, conforme a

categoria): é o fórum composto por representantes de órgãos públicos e da sociedade civil, que participam da gestão da UC; 3) elaboração de "Plano de Manejo": documento norteador das ações a serem desenvolvidas pela UC, e que regulamenta seu zoneamento interno e as estruturas físicas a serem implantadas dentro de seus limites para atingir os objetivos de sua existência. Atualmente, estão em andamento negociações para indenização de proprietários particulares de áreas em todas estas UCs, com exceção do Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas, cuja categoria permite a existência de propriedades privadas. O processo que mais avançou foi a criação dos conselhos, que já estão atuando em todas as UCs. O Plano de Manejo já foi elaborado e está sendo executado no Parque Nacional das Araucárias e na Reserva Biológica das Perobas, está em elaboração para a Estação Ecológica da Mata Preta e o Refúgio da Vida Silvestre dos Campos de Palmas, e ainda não foi iniciada a sua elaboração para o Parque Nacional dos Campos Gerais e a Reserva Biológica das Araucárias¹.

Para a conservação *ex situ* é necessário desenvolver programas de reflorestamento utilizando sementes de origem regional, pois as florestas plantadas de araucária são úteis para manter a diversidade genética da espécie (Stefenon et al., 2008a; Ferreira et al., 2012).

2.4 PLANTIO DE ARAUCÁRIAS PARA PRODUÇÃO DE PINHÕES

O pinhão é um alimento rico em carboidratos (principalmente amido), em proteínas, fibras, cálcio, fósforo, ferro e vitaminas (Franco, 2008). O amido do pinhão pode ser utilizado largamente na tecnologia de alimentos (Stahl et al., 2007). No passado, os pinhões serviram de alimentação para os grupos indígenas que habitaram o Sul do Brasil e ainda hoje são muito consumidos pelos humanos durante o outono e inverno.

A importância econômica do pinhão é significativa, principalmente nos Estados de ocorrência natural da araucária, em que o pinhão comercializado provém principalmente de povoamentos naturais. Em 2011 foram comercializados 3.399 toneladas de pinhão nos mercados atacadistas (Ceagesp, de São Paulo, e Ceasa's do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), representando um valor de R\$ 6,23 milhões (Tabela 2). Somam-se a isso quantidades significativas comercializadas informalmente e não registradas.

¹Comunicação pessoal de Fabio Moreira Corrêa e Andrea von der Heyde Lamberts, Analistas Ambientais do ICMBio (Instituto Chico Mendes de Biodiversidade).

Tabela 2. Volume total e preços médios de comercialização do pinhão, de 2007 a 2011, nos principais mercados atacadistas da área de ocorrência natural da araucária.

Ano	Ceagesp-SP		Ceasa-PR		Ceasa-RS		Ceasa-SC	
	Volume (t)	Preço (R\$ por kg)	Volume (t)	Preço (R\$ por kg)	Volume (t)	Preço (R\$ por kg)	Volume (t)	Preço (R\$ por kg)
2007	898,22	1,15	929,06	1,78	427,09	2,21	292,12	2,38
2008	1.253,36	1,19	936,64	2,11	359,93	2,37	475,66	2,71
2009	1.067,80	1,39	614,81	2,18	284,10	2,65	225,82	2,54
2010	1.028,72	1,29	898,87	1,95	434,94	2,25	363,84	1,84
2011	1.010,24	1,41	1.168,00	1,70	829,22	2,08	391,38	2,15

Fonte: consulta aos sites institucionais de Ceagesp-SP, Ceasa-PR, Ceasa-RS e Ceasa-SC, em março de 2012.

A importância social do pinhão também é grande, uma vez que centenas de famílias de baixa renda tem no pinhão a principal fonte de renda anual (Silva e Reis, 2009). No caso da colheita do pinhão de forma extrativa, ainda é necessária uma normatização adequada, de forma a garantir a regeneração natural da araucária na floresta. Por isto, as famílias que tradicionalmente efetuam a comercialização do pinhão devem ser valorizadas e envolvidas em programas de preservação da espécie (Floriani, 2007).

O número de pinhas por araucária é dependente do número de ramos produtivos por planta e de pinhas por ramo. Podem ocorrer dois tipos de formação de pinhas nas araucárias, apenas nos ramos primários ou nos ramos primários e secundários (grimpas) conjuntamente. As plantas mais produtivas são aquelas com pinhas nos dois tipos de ramos, podendo chegar a 14 pinhas em mesmo estágio de desenvolvimento por ramo (Anselmini et al., 2006). Figueiredo Filho et al. (2011) detectaram 20,5 e 9,8 pinhas por árvore em uma floresta natural e uma floresta plantada à 60 anos em Irati-PR, respectivamente. São conhecidas araucárias que não estão em área florestal que produziram quase 400 pinhas² (Figura 1).

Quanto maior a proximidade entre araucárias femininas e masculinas maior será o número de pinhões cheios, devido a maior disponibilidade de pólen para a fecundação. Além disto, é necessário que a abertura do ginostrobilo coincida com o período em que as plantas masculinas próximas estão liberando o pólen (Anselmini et al., 2006). Em populações de araucária de florestas naturais, a produtividade de pinhão observada é geralmente baixa (Mantovani et al., 2004; Silva e Reis, 2009; Figueiredo Filho et al., 2011).

²Comunicação pessoal e fotos dos donos das propriedades que contém estas araucárias altamente produtivas.

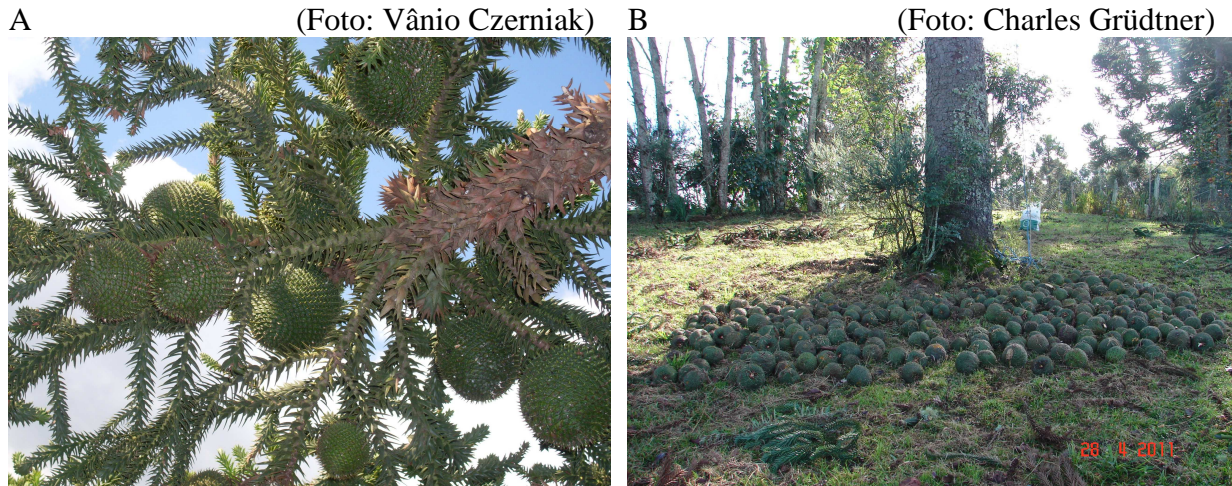


Figura 1. Araucárias com alta produção de pinhas. A: Planta de Caçador-SC, que produziu 398 pinhas em 2008. B: Planta de Bom Retiro-SC, que produziu 380 pinhas em 2011.

Os plantios de araucária para produção de pinhões devem ser incentivados, pois o potencial de produção pode ser muito superior ao encontrado em florestas naturais. No entanto, para obter boa rentabilidade, é necessário efetuar o manejo adequado para aumentar a produção de pinhões, como utilizar grande espaçamento entre as árvores (10 x 10 m), não realizar desbaste de ramos e plantar mudas de araucárias selecionadas pela alta produção de pinhões e propagadas por enxertia (Zanette, 2010).

Considerando que em média há oito ramos principais por verticilo e oito verticilos, o potencial é de 64 ramos produtivos em uma araucária (Zanette, 2010). É possível haver até 14 pinhas por ramo (Anselmini et al., 2006), mas considerando-se média de cinco pinhas por ramo, pode haver 320 pinhas por araucária. Assim, como cada pinha tem cerca de 80 pinhões cheios e média de 8 g por pinhão (Figueiredo Filho et al., 2011), isto equivale a 640 g de pinhão por pinha e 204,8 kg de pinhão por araucária. Então, se for realizado um plantio de araucária em espaçamento 10 x 10 m (Zanette, 2010), com densidade de 70 plantas femininas e 30 masculinas (propagadas por enxertia), a produtividade seria de 14.336 kg ha⁻¹. Se o kg do pinhão *in natura* for vendido a R\$ 1,00 a renda bruta gerada seria de R\$ 14.336,00 ha⁻¹.

O custo de implantação de 1,0 ha de araucária no espaçamento 2,5 x 2,0 m (2.000 árvores por ha) foi calculado em R\$ 2.306,85 e custo de manutenção médio de R\$ 196,00 até o terceiro ano do plantio. Segundo um plano de 5 desbastes (10°, 15°, 20°, 25° e 30° ano do plantio) e corte raso aos 40 anos do plantio, a renda bruta calculada com a venda das toras foi de R\$ 55.067,00 (BRDE, 2005), o que representa aproximadamente R\$ 1.376,67 ha⁻¹ ano⁻¹. Esta renda é bastante inferior a determinada no cálculo acima para produção de pinhões em condições adequadas de manejo (R\$ 14.336,00 ha⁻¹ ano⁻¹). Soma-se a isso que a renda do pinhão de uma araucária é gerada todo ano, enquanto da madeira é uma vez só.

Quando se recomenda o cultivo de araucária, alguns contrapontos são apresentados. Os principais são que a espécie demora muito a produzir e que quando é efetuado o plantio de pinhões não se sabe o sexo das plantas geradas. Embora a araucária demore de 15 a 20 anos para iniciar a produção após plantio dos pinhões, essa planta pode produzir pinhão por mais de 200 anos (Mattos, 1994). O início da produção pode ser antecipado utilizando a propagação por enxertia, a qual também garante a escolha do sexo da planta a ser gerada (Zanette, 2010).

A variabilidade na época de maturação de pinhões foi descrita por Reitz e Klein (1966) para cinco variedades de *A. angustifolia*. Esta parece ser uma estratégia de coevolução da espécie com os animais dispersores de sementes, de forma a ofertar alimento em maior período do ano e, conseqüentemente, ter maior oportunidade de dispersão das sementes para regeneração da espécie. Este aspecto pode ser aproveitado em plantios de araucárias para produção de pinhão, reunindo estas cinco variedades, possibilitando a produção de pinhão durante todos os meses do ano (Tabela 3).

Tabela 3. Época de maturação de pinhões de cinco variedades de *Araucaria angustifolia*, segundo descrição de Reitz e Klein (1966).

Variedade	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
<i>sancti-josephi</i>		■	■									
<i>angustifolia</i>				■	■	■						
<i>caiova</i>						■	■					
<i>semi-alba</i>								■	■			
<i>indehiscens</i>	■									■	■	■

2.5 DIVERSIDADE E MELHORAMENTO GENÉTICO DE *A. angustifolia*

A diversidade genética de araucária é marcante, provavelmente devido sua ampla área de ocorrência geográfica. Reitz e Klein (1966) descreveram nove variedades de *A. angustifolia*, com diferenças principalmente na coloração e na época de amadurecimento dos pinhões. *A. angustifolia* var. *sancti-josephi* Reitz e Klein, conhecida como pinheiro-são-josé, que é a variedade mais precoce, com sementes maduras de fevereiro a março. *A. angustifolia* var. *alba* Reitz e Klein, cujo nome vulgar é pinheiro-branco, apresenta pinhões brancos que quando secos tornam-se amarelados. *A. angustifolia* var. *angustifolia* (Bertol.) Kuntze, possui pinhões vermelhos que amadurecem de abril a maio. *A. angustifolia* var. *indehiscens* Mattos,

conhecido como pinheiro-macaco, mantém suas sementes presas aos ramos mesmo após o amadurecimento dos pinhões, que ocorre de setembro até janeiro. *A. angustifolia* var. *nigra* Reitz e Klein, chamado pinheiro-preto devido seus pinhões de coloração vermelho-escuro, quase pretos. *A. angustifolia* var. *caiova* Reitz e Klein, conhecido como pinheiro-caiová, tem seus pinhões maduros entre junho e julho. *A. angustifolia* var. *estriata* Reitz e Klein, conhecido como pinheiro-rajado por apresentar pinhões vermelhos com listras vermelho-escuras. *A. angustifolia* var. *semi-alba* Reitz e Klein, ou pinheiro-de-ponta-branca, apresenta pinhões no início com a ponta branca, que depois tornam-se totalmente vermelhos e amadurecem em agosto e setembro. *A. angustifolia* var. *elegans* (Hort.) Reitz e Klein, ou pinheiro-elegante, devido aos ramos delgados e numerosos, com folhas menores e mais densas. Uma variedade adicional foi descrita por Mattos (1994), denominada de *catarinensis*, que apresenta a face ventral descoberta, sem casca.

A *A. angustifolia* é uma das espécies nativas do Brasil que vem despertando interesse quanto aos estudos de melhoramento e conservação genética, através da formação de bancos de germoplasma *in situ* e *ex situ*. Para isto, é essencial conhecer a magnitude e organização da diversidade genética, pois esta determina o potencial de uma população para a conservação e melhoramento genético (Guerra et al., 2002).

Para espécies florestais, o uso de marcadores moleculares é essencial para avaliar a diversidade genética (Sebbenn, 2006). Atualmente, a técnica mais indicada para estudar polimorfismos de DNA são os marcadores SSR (*simple sequence repeat*), também denominados de microssatélites. As regiões microssatélites do DNA são sequências de 1 a 6 nucleotídeos repetidas em linha, tais como $(AT)_n$ e $(ATT)_n$, originadas por deslizamentos da enzima DNA polimerase durante a replicação ou ainda por *crossing over* desiguais entre fitas de DNA não alinhadas. Os microssatélites podem ser amplificados através da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), usando um par de *primers* específicos que flanqueiam e são complementares às regiões repetidas. A alta taxa mutacional dos microssatélites os torna altamente polimórficos e multialélicos, gerando diferenças entre os indivíduos quanto ao número de unidades de repetição. Além disto, eles são de herança co-dominante, permitindo distinguir locos homocigotos de heterocigotos. Estas características os tornam marcadores altamente informativos para estudos de genética e melhoramento (Li et al., 2002).

Dois estudos foram realizados para desenvolver bibliotecas enriquecidas com sequências microssatélites de DNA para *A. angustifolia* (Salgueiro et al., 2005; Schmidt et al., 2007). Estes são de extrema importância para obtenção de informações genéticas, que serão utilizadas como subsídios em programas de melhoramento, conservação e manejo da

araucária. Neste sentido, já foram desenvolvidos alguns estudos de aspectos genéticos utilizando marcadores microssatélites (Salgueiro et al., 2005; Bittencourt e Sebbenn, 2007, 2008, 2009; Schmidt et al., 2007; Stefenon et al., 2008b; Patreze e Tsai, 2010).

Para a aplicação das técnicas de marcadores moleculares, primeiramente é necessário o isolamento de DNA livre de substâncias de interferência, como polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos, das quais as acículas de araucária apresentam grande quantidade (Fonseca et al., 2000; Mazza e Bittencourt, 2000). Por isto, é necessária a utilização de reagentes que removam esses contaminantes durante o isolamento do DNA. O método mais utilizado com sucesso para extração de DNA em diferentes espécies vegetais é o baseado no uso do detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), o qual solubiliza as membranas, formando um complexo com o DNA que facilita sua posterior precipitação (Romano e Brasileiro, 1998).

A etapa de isolamento de DNA é a mais morosa em estudos genéticos. Assim, é desejável reduzir o tempo, bem como o número de passos de manipulação em protocolos de isolamento, sem comprometer a qualidade de DNA. Mazza e Bittencourt (2000) e Stefenon et al. (2004) desenvolveram protocolos viáveis para o isolamento de DNA de *A. angustifolia*. Mais ajustes podem ser realizados para reduzir o custo e o tempo gasto neste processo, em relação a estes protocolos já desenvolvidos para isolamento de DNA de araucária.

2.6 POLINIZAÇÃO DIRIGIDA EM *A. angustifolia*

A polinização dirigida pode ser uma importante ferramenta no melhoramento genético de *A. angustifolia*, permitindo efetuar cruzamentos entre genitores de interesse e aumentar os ganhos genéticos para características de interesse. Há apenas dois trabalhos na literatura de polinização dirigida de *A. angustifolia* (Tesdorff, 1956; Anselmini e Zanette, 2012).

O cruzamento dirigido interespecífico entre *A. araucana* e *A. angustifolia* foi realizado na Argentina. Apesar das duas espécies ocorrerem separadas por mais de 2.000 km, e da maturação do pólen e receptividade do ginostrobilo serem em épocas diferentes, houve viabilidade dos cruzamentos, com a formação de pinhões (Tesdorff, 1956), provavelmente devido as espécies terem mesmo número de cromossomos, $2n = 26$ (Miranda et al., 2007). No trabalho de Tesdorff (1956), *A. angustifolia* foi polinizada com pólen de *A. araucana* obtendo-se pinhas com média de 2 a 3 pinhões. O autor sugere a diminuição da capacidade

germinativa do pólen armazenado por mais de dez meses como o fator causador desta baixa produtividade. Foram obtidos 68 híbridos, em que as características da árvore mãe foram dominantes e houve rapidez de crescimento após cinco anos do cruzamento.

Anselmini e Zanette (2012) desenvolveram uma metodologia de polinização controlada para *A. angustifolia*. A realização de duas polinizações em semanas sequenciais em ginostrobilos com mais de 30 mm de diâmetro aumenta a produção de pinhões por pinha. Foram obtidas progênes de 10 combinações híbridas de araucária. A diversidade genética gerada nas progênes oriundas destas polinizações dirigidas ainda não foi verificada.

2.7 OCORRÊNCIA DE PLANTAS MONÓICAS EM *A. angustifolia*

A. angustifolia é uma espécie dióica e, conseqüentemente, se reproduz por polinização cruzada. Porém, são conhecidas plantas monóicas de araucária, de ocorrência rara, as quais apresentam ginostrobilos e androstróbilos na mesma planta (Figura 2).



Figura 2. Araucária monóica com pinha (à direita) e mingote (à esquerda) visíveis, localizada em Curitiba, Paraná. (Foto: Flávio Zanette).

A descrição de plantas monóicas de *A. angustifolia* foi feita por Reitz e Klein (1966), indicando que este fato devia-se a cortes e doenças nas plantas adultas. Porém, mais recentemente, Stefenon e Caprestano (2009) observaram que ginostrobilos, androstróbilos e grãos de pólen de plantas monóicas de araucária apresentam morfologia normal, igual às plantas dióicas. Além disto, não foram observadas injúrias ou infecções de fungos nos órgãos

sexuais que pudessem sugerir a causa da monoícia. Desta forma, ainda não foi detectada a causa da monoícia em araucária, o que deve ser alvo para estudos futuros.

O conhecimento do sistema de reprodução de uma espécie vegetal é de fundamental importância no melhoramento genético, visto que determina a forma como as plantas recombina seus genes a cada geração para formar a população descendente. Afeta também os níveis de endogamia e os índices de diversidade genética da espécie. Além disto, é fundamental para garantir a produção de sementes melhoradas nos pomares de sementes, que constituem estratégia fundamental no melhoramento de espécies florestais (Sebbenn, 2006).

Em espécies vegetais, quando há cruzamentos entre diferentes flores o sistema de reprodução é definido como alogamia, que pode ser de dois tipos: a geitonogamia, polinização de flores por grãos de pólen de outras flores da mesma planta; e a xenogamia, polinização de flores por grãos de pólen de flores de outras plantas. Por outro lado, a polinização dos órgãos femininos pelos órgãos masculinos de mesma flor é definida como autogamia (Finkeldey, 2005).

No caso das araucárias monóicas não há informações na literatura e ainda é necessário verificar se a polinização ocorre por geitonogamia ou por xenogamia. A primeira tem mesma consequência genética que a autogamia, ou seja, gera endogamia. A última pode gerar maior diversidade genética na progênie, devido formar combinações diferentes de alelos. Para detectar a forma de polinização das plantas monóicas de araucária podem ser usados marcadores moleculares microssatélites, que auxiliam na determinação da taxa de cruzamentos, proporção de cruzamentos endogâmicos ou biparentais, taxa de autofecundação e do número de doadores de pólen na reprodução de uma planta (Sebbenn, 2006).

REFERÊNCIAS

ANSELMINI, J.I.; ZANETTE, F.; BONA, C. Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, na região de Curitiba – PR. **Floresta e Ambiente**, v.13, n.1, p.44-52, 2006.

ANSELMINI, J.I.; ZANETTE, F. Polinização controlada em *Araucaria angustifolia*. **Cerne**, v.18, n.2, p.247-255, 2012.

AULER, N.M.F.; REIS, M.S.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. The genetics conservation of *Araucaria angustifolia*: 1 - genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptative variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.3, p.329-338, 2002.

BEHLING H. South and Southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v.177, p.19–27, 2002.

BEHLING, H.; SAFFORD, H.D. Late-glacial and Holocene vegetation, climate and fire dynamics in the Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro State, southeastern Brazil. **Global Change Biology**, v.16, p.1661-1671, 2010.

BITENCOURT, A.L.V.; KRAUSPENHAR, P.M. Possible prehistoric anthropogenic effect on *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze expansion during the late Holocene. **Revista Brasileira de Paleontologia**, v.9, n.1, p.109-116, 2006.

BITTENCOURT, J.V.M. Proposta para conservação genética da *Araucaria angustifolia*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n.55, p.87-93, 2007.

BITTENCOURT, J.V.M.; SEBBENN, A.M. Patterns of pollen and seeds dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, v.99, 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. **Conservations Genetics**, v.9, p.855-868, 2008.

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

BRASIL. **Lei Nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006**. Dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Lei/L11428.htm> Acesso em: 15 dez. 2011.

BRDE - Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul. **Cultivo da *Araucaria angustifolia***. 2005. Disponível em: <www.brde.com.br/estudos_e_publicacoes/IS%202005-01Cultivo%20da%20araucária%20SC.pdf> Acesso em 19 fev. 2012.

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

CASTELLA, P.R.; BRITZ, R.M.A (org.). **Floresta com Araucária no Paraná: conservação e diagnóstico dos remanescentes florestais.** Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004. 233p.

DILLENBURG, L.B.; ROSA, L.M.; MÓSENA, M. Hypocotyl of seedlings of the large-seeded species *Araucaria angustifolia*: an important underground sink of the seed reserves. **Trees**, v.24, p.705-711, 2010.

DUTRA, T.L.; STRANZ, A. Biogeografia, evolução e ecologia da família Araucariaceae: o que mostra a Paleontologia. In: FONSECA, C.R.; SOUZA, A.F.; LEAL-ZANCHET, A.M.; DUTRA, T.L.; BACKES, A.; GANADE, G. (Eds.). **Floresta com Araucária: Ecologia, Conservação e Desenvolvimento Sustentável.** Ribeirão Preto: Editora Holos, 2009. p.15-33.

FERREIRA, D.K.; NAZARENO, A.G.; MANTOVANI, A.; BITTENCOURT, R.; SEBBENN, A.M.; 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, 2012.

FIGUEIREDO FILHO, A.; ORELLANA, E.; NASCIMENTO, F.; DIAS, A.N.; INOUE, M.T. Produção de sementes de *Araucaria angustifolia* em plantio e em floresta natural no Centro-Sul do Estado do Paraná. **Floresta**, v.41, n.1, p.155-162, 2011.

FINKELDEY, R. **An introduction to tropical forest genetics.** Göttingen: Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, 2005. 241p.

FLORIANI, G.S. Debulhando pinha, semeando pinhão: propostas de uso e conservação para a araucária. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.1, p.1803-1806, 2007.

FONSECA, F.N.; FERREIRA, A.J.S.; SARTORELLI, P.; LOPES, N.P.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W.; KATO, M.J. Phenylpropanoid derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v.55, p.575-580, 2000.

FRANCO, A.M.S.; DILLENBURG, L.R. Ajustes morfológicos e fisiológicos em plantas jovens de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em resposta ao sombreamento. **Hoehnea**, v.34, n.2, p.135-144, 2007.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 307p.

GESSERT, S.; IRIARTE, J.; RÍOS, R.C.; BEHLING, H. Late Holocene vegetation and environmental dynamics of the *Araucaria* forest region in Misiones Province, NE Argentina. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v.166, p.29-37, 2011.

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

HERTEL, R.J.G. **Interpretação morfológica da *Araucaria angustifolia***. 1980. 143f. Tese (Concurso para professor titular na área de Morfologia Vegetal) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

HESS, A.F.; CALGAROTTO, A.R.; PINHEIRO, R.; WANGINIAC, T.C.R. Proposta de manejo de *Araucaria angustifolia* utilizando o quociente de Liocourt e análise de incremento, em propriedade rural no Município de Lages, Santa Catarina. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.30, n.64, p.337-345, 2010.

HUECK, K. **As florestas da América do Sul: ecologia, composição e importância econômica**. São Paulo: Polígono, 1972. 466p.

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, p.115-127, 2007.

JESKE-PIERUSCHKA, V.; FIDELIS, A.; BERGAMIN, R.S.; VÉLEZ, E.; BEHLING, H. *Araucaria* forest dynamics in relation to fire frequency in southern Brazil based on fossil and modern pollen data. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v.160, n.1-2, p.53-65, 2010.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 6. Ed. São Paulo: Editora Nacional, 1983. 777p.

KERSHAW, P.; WAGSTAFF, B. The Southern Conifer family Araucariaceae: History, status and value for paleoenvironmental reconstruction. **Annual Review of Ecological Systematics**, v.32, p.397-414, 2001.

KOCH, Z.; CORRÊA, M.C. **Araucária: A floresta do Brasil Meridional**. 2. Ed. Curitiba: Olhar Brasileiro, 2010. 168p.

LEDRU, M.P.; SALGADO-LABOURIAU, M.L.; LORSCHHEITTE, M.L. Vegetation dynamics in southern and central Brazil during the last 10,000 yr BP. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v.99, p.131-142, 1998.

LI, Y-C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.2453-2465, 2002.

LIU, N.; ZHU, Y.; WEI, Z.; CHEN, J.; WANG, Q.; JIAN, S.; ZHOU, D.; SHI, J.; YANG, Y.; ZHONG, Y. Phylogenetic relationships and divergence times of the family Araucariaceae based on the DNA sequences of eight genes. **Chinese Science Bulletin**, v.54, n.15, p.2648-2655, 2009.

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

MATTOS, J.R. **O pinheiro brasileiro**. 2. Ed. Lages: Artes Gráficas princesa, 1994. 228p.

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

MEDRI, C.; RUAS, P.M.; HIGA, A.R.; MURAKAMI, M.; RUAS, C.F. Effects of forest management on the genetic diversity in a population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Silvae Genetica**, v.52, n.5-6, p.202-205, 2003.

MIRANDA, M.; ALMEIDA, C.C.S.; GUERRA, M. Karyotype of *Araucaria angustifolia* and the decondensation/activation mode of its nucleolus organiser region. **Australian Journal of Botany**, v.55, p.165-170, 2007.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Proteção e recuperação da Floresta com Araucárias**. Propostas de criação de novas Unidades de Conservação Federais no Paraná e em Santa Catarina. 2005. Disponível em: <<http://homolog-w.mma.gov.br/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=202&idConteudo=8642&idMenu=9276>> Acesso em: 30 jan. 2012.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa 06/2008. **Espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção e com deficiência de dados**. Disponível em: <(www.mma.gov.br)> Acesso em: 10 de outubro de 2010.

NASCIMENTO, A.R.T.; LONGHI, S.J.; BRENA, D.A. Estrutura e padrões de distribuição espacial de espécies arbóreas em uma amostra de floresta Ombrófila Mista em Nova Prata, RS. **Ciência Florestal**, v.11, n.1, p. 105-119, 2001.

PALUDO, G.F.; MANTOVANI, A.; REIS, M.S. Regeneração de uma população natural de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Revista Árvore**, v.35, n.5, p.1107-1119, 2011.

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

REITZ, R.; KLEIN, R.M. **Araucariáceas**. Itajaí: Tipografia e Livraria Blumenauense, 1966. 37p.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.2, n.9, p.40-43, 1998.

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

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, p.340-342, 2007.

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

SETOGUCHI, H.; OSAWA, T.A.; OINAUD, J-C.; JAFFRÉ, T.; VEILLON, J-M. Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on *rbcL* gene sequences. **American Journal of Botany**, v.85, p.1507-1516, 1998.

SHIMOYA, C. Contribuição ao estudo do ciclo biológico de *Araucaria angustifolia* (Bertolini) O. Ktze. **Experientie**, v.2, n.2, p.519-540, 1962.

SILVA, C.V.; REIS, M.S. Produção de pinhão na região de Caçador, SC: aspectos da obtenção e sua importância para comunidades locais. **Ciência Florestal**, v.19, n.4, p.363-374, 2009.

SOUSA, V.A.; HATTEMER, H.H. Pollen dispensal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**, v.51, p.309-317, 2003.

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

SOUZA, A.F.; FORGIARINI, C.; LONGHI, S.J.; BRENA, D.A. Regeneration patterns of a long-lived dominant conifer and the effects of logging in southern South America. **Acta Oecologica**, v.34, p.221-232, 2008.

SOUZA, M.I.F.; SALGUEIRO, F.; CARVANALE-BOTTINO, M.; FÉLIX, D.B.; ALVES-FERREIRA, M.; BITTENCOURT, J.V.M.; MARGIS, R. Patterns of genetic diversity in southern and southernwest *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze relict populations. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, n.3, p.546-556, 2009.

STAHL, J.A.; LOBATO, L.P.; BOCHI, V.C.; KUBOTA, E.H.; GUTKOSKI, L.C.; EMANUELLI, T. Physicochemical properties of Pinhão (*Araucaria angustifolia*, Bert, O. Ktze) starch phosphates. **Food Science and Technology**, v.40, p.1206-1214, 2007.

STEFENON, V.M.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Genética e conservação de *Araucaria angustifolia*: III. Protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPD para análise da diversidade genética em populações naturais. **Biotemas**, v.17, n.1, p.47-63, 2004.

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

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

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, p.356-364, 2008b.

STEFENON, V.M.; STEINER, N.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Integrating approaches towards the conservation of forest genetic resources: a case study of *Araucaria angustifolia*. **Biodiversity and Conservation**, v.18, p.2433-2448, 2009.

STEFENON, V.M.; CAPRESTANO, C.A. Monoicy in *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae): I. Morphological aspects of the reproductive structures. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.81, n.4, p.701-704, 2009.

STOCKEY, R.A. Mesozoic Araucariaceae: Morphology and systematic relationships. **Journal of Plant Research**, v.107, n.4, p.493-502, 1994.

TESDORFF, H. Kreuzungsversuche mit *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch und *Araucaria angustifolia* (Bertolini) O. Ktze. **Zeitschrift für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung**, v.5, n.3, p.79-84, 1956.

VIBRANS, A.C.; SEVEGNANI, L.; GASPER, A.L.; MÜLLER, J.J.V.; REIS, M.S. **Inventário florístico florestal de Santa Catarina**. Blumenau: FURB / CCA-UFSC / Epagri, 2012. 33p.

VIDOLIN, G.P.; BATISTA, D.B.; WANDEMBRUCK, A. Landscape valuation based on the ecological requirements of '*Tayassu pecari*' and '*Tapirus terrestris*' - a forest with araucaria, in Paraná State, Brazil. **Ciência Florestal**, v.21, n.3, p.505-515, 2011.

ZANETTE, F. **A araucária como fruteira para a produção de pinhões**. Série Frutas Nativas. Jaboticabal: Funep, 2010. 25p.

3 CAPÍTULO I
PROTOCOLO RÁPIDO PARA ISOLAMIENTO DE DNA DE ACÍCULAS DE
Araucaria angustifolia

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo eficiente, rápido e de baixo custo para o isolamento de DNA de acículas de *Araucaria angustifolia*. O método de isolamento foi estabelecido a partir de seis protocolos testados e possibilitou a obtenção de DNA de boa qualidade, amplificável através de PCR (“Polymerase Chain Reaction”). A razão DO_{260}/DO_{280} de 80% das amostras apresentou um valor entre 1,7 e 2,0, indicando baixo nível de contaminação por proteínas, polissacarídeos e polifenóis. O protocolo é mais rápido e mais barato que outros protocolos descritos na literatura para isolamento de DNA de *A. angustifolia*.

Palavras-chave: araucária; qualidade de DNA; método CTAB.

RAPID PROTOCOL FOR DNA ISOLATION OF *Araucaria angustifolia* LEAVES

ABSTRACT

This study aimed to establish an efficient, rapid and low cost protocol for DNA isolation from *Araucaria angustifolia* leaves. The isolation method was standardized by six tested protocols and it was possible to obtain good quality DNA, which can be amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction). The OD_{260}/OD_{280} ratio ranged from 1.7 to 2.0 in 80% of the samples, indicating a low level of protein, polysaccharides and polyphenolics contamination. The protocol is faster and cheaper than other protocols described for DNA isolation of *Araucaria angustifolia*.

Key-words: Brazilian pine; DNA quality; CTAB method.

3.1 INTRODUÇÃO

A araucária (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze) é reconhecida como espécie da flora brasileira ameaçada de extinção (MMA, 2008). Até final do século XIX, a Floresta com Araucária ocorria numa extensão de 18,2 milhões de hectares no Brasil, sendo 40% da área no Estado do Paraná, 31% em Santa Catarina, 25% no Rio Grande do Sul, 3% em São Paulo e 1% em Minas Gerais e Rio de Janeiro. Também havia pequenas áreas na Argentina (extremo nordeste, província de Misiones) e no Paraguai (região leste, Departamento de Alto Paraná) (Mattos, 1994). Esta área de Floresta com Araucária foi reduzida para menos de 3% da original, devido ao intenso desmatamento para a expansão das fronteiras agrícolas e a utilização da madeira de araucária (Guerra et al., 2002).

O desmatamento ocasionou aumento dos níveis de endogamia e redução da diversidade genética de *A. angustifolia*, o que é evidenciado especialmente em populações mais fragmentadas (Auler et al., 2002; Medri et al., 2003; Sousa et al., 2005; Bittencourt e Sebbenn, 2007; Schmidt et al., 2007; Stefenon et al., 2007; Stefenon et al., 2008; Souza et al., 2009). Por isso, há a necessidade de se desenvolver um plano de conservação, restauração e de melhoramento genético, visando a sobrevivência da espécie e a instalação de plantios para produção de pinhões (Guerra et al., 2002; Zanette, 2010). Para isso, o estudo da diversidade genética por técnicas moleculares é essencial para o planejamento de programas de melhoramento e de conservação *in situ* e *ex situ*, pois possibilita a correta seleção de plantas e sementes a serem utilizadas para a produção de mudas ou para cruzamentos controlados.

Para a aplicação de técnicas moleculares, primeiramente é necessário o isolamento de DNA (ácido desoxirribonucleico) livre de substâncias de interferência, como polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos, das quais as acículas de *A. angustifolia* apresentam grande quantidade (Fonseca et al., 2000; Mazza e Bittencourt, 2000). Assim, é necessária a utilização de reagentes que removam esses contaminantes durante isolamento do DNA, pois eles inibem a ação de enzimas DNA polimerases e de restrição, impedindo a amplificação por meio da PCR (reação de polimerase em cadeia) e interferindo no padrão de migração do DNA em gel de eletroforese (Couch e Fritz, 1990; Fang et al., 1992; Pandey et al., 1996).

Mazza e Bittencourt (2000) e Stefenon et al. (2004) desenvolveram protocolos viáveis para extração de DNA de *A. angustifolia*, adaptados do método utilizado para diversas espécies vegetais, baseado no detergente catiônico CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*), descrito por Doyle e Doyle (1990). Porém, mais ajustes podem ser realizados para reduzir o custo e o tempo gasto no processo de isolamento.

Este trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo eficiente, rápido e de baixo custo para o isolamento de DNA de acículas de *Araucaria angustifolia*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas acículas de 316 plantas de *Araucaria angustifolia*, de diferentes idades e locais de coleta, as quais foram acondicionadas em sacos plásticos, contendo sílica gel. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Genética de Microorganismos (LabGeM) da UFPR (Universidade Federal do Paraná), onde foram liofilizadas durante 72 horas, acondicionadas em microtubos e armazenadas em freezer (-20°C) até o momento do isolamento de DNA.

Inicialmente foram testados seis protocolos para isolamento de DNA (Tabela 1), baseados no protocolo descrito em Ferreira e Grattapaglia (1996), utilizado 10 amostras de acículas. As principais modificações foram realizadas visando evitar o uso de reagentes de maior custo, tornar o processo mais rápido, além de obter DNA com baixo nível de substâncias de interferência.

Tabela 1. Características dos seis protocolos utilizados nos testes iniciais de isolamento de DNA de *Araucaria angustifolia*.

Protocolo	Principais modificações em relação ao protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1996, pág. 127-129)
1	Adição de Etanol 76% + acetato de amônio 10 mM; redução de duas para uma lavagem com etanol 70%.
2	Semelhante ao protocolo 1; mas com duas lavagens com etanol 70%.
3	Adição de acetato de amônio 7,5 M + álcool isopropílico P.A.; duas lavagens com etanol 70%.
4	Não adição de acetato de amônio; não adição de CTAB 10% + NaCl 1,4 M; com duas lavagens com etanol 70%.
5	Semelhante ao protocolo 4, mas com aumento da concentração de 0,2% para 2% de 2-mercaptoetanol no tampão de extração.
6	Semelhante ao protocolo 4, mas sem adição de 2-mercaptoetanol, aumento de 1% para 2% de PVP no tampão de extração e aumento de 5 para 10 minutos de centrifugação.

O protocolo mais eficiente foi o número seis, pois houve melhor qualidade de bandas visualizadas em gel de agarose 0,8%. Por isso, esse protocolo foi utilizado para isolamento de DNA das 316 amostras de *Araucaria angustifolia* coletadas de plantas de várias idades e origens, seguindo os passos abaixo.

Utilizou-se 100 mg de acículas liofilizadas de cada amostra, as quais foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas completamente em almofariz. Ao pó resultante adicionou-

se 700 μL de tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,5 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl pH 8,0 100 mM; PVP 2%). A solução foi acondicionada em microtubos de 1,5 mL e mantida em banho-maria (60°C) por 45 minutos, sendo homogeneizados a cada 15 minutos. Em seguida foram acrescidos 700 μL de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 24:1), a temperatura ambiente. A solução foi homogeneizada sob forte agitação por cinco minutos e centrifugada a 15.500 g (13.000 RPM) por dez minutos. A porção aquosa (que continha o DNA) foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e realizou-se segunda extração orgânica com CIA, adicionando 700 μL . Novamente a solução foi submetida à forte agitação por cinco minutos e centrifugado a 15.500 g por dez minutos. Após essa etapa, a porção aquosa foi colocada em novo microtubo de 1,5 mL e foi adicionado 2/3 do volume de álcool isopropílico P.A. gelado (-20°C). A solução foi mantida por 60 minutos ou *overnight* a -20°C e, posteriormente, centrifugado a 15.500 g por dez minutos. O álcool isopropílico foi descartado e o pellet de DNA lavado duas vezes com 1,0 mL de etanol 70% gelado (-20°C) e uma vez com 1,0 mL de etanol 95% gelado (-20°C), deixando-se secar à temperatura ambiente em cada uma das etapas de lavagem. Adicionou-se ao DNA 100 μL de água ultrapura e 1,0 μL de RNase A (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), mantendo a 37°C por 30 minutos. Em seguida, a solução contendo o DNA foi armazenada a -20°C.

A quantidade de DNA foi estimada através de espectrofotometria, assumindo a equivalência de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para uma unidade de absorbância a 260 nm e a qualidade de DNA foi determinada através da razão de densidade ótica ($\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$), em espectrofotômetro *NanoDrop 2000*[®] (Thermo Scientific).

Realizou-se a amplificação por PCR do DNA de 10 amostras de *Araucaria angustifolia*, utilizando o primer SSR (*simple sequence repeat*) Ag20, desenvolvido por Salgueiro et al. (2005). As condições da reação foram: 40 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1,5 U de Taq polimerase, 0,025 μM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl_2 e volume final de 20 μl . A amplificação foi realizada em Termociclador *Mastercycler Gradient*[®] (Eppendorf), com desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 66°C e 30 segundos a 72°C, seguida de extensão final de 4 minutos a 72°C e após foram mantidas as amostras a 4°C.

Os produtos da amplificação foram visualizados através da técnica de eletroforese em gel de agarose 1,5%, aplicando-se 5 μL do produto de PCR e 2 μL do corante GelRed[®] (Biotium) 100X. Utilizou-se como padrão o marcador de peso molecular Ladder[®] 100 pb (Ludwig Biotec). A eletroforese foi realizada a uma corrente elétrica de 3 V/cm durante 120 minutos, em tampão TBE 1X. Os fragmentos amplificados foram visualizados em

transiluminador de luz ultravioleta, onde o complexo formado pelo DNA e o corante ficam fluorescentes.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração obtida após o isolamento de DNA foi de 15,9 a 1.660,9 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ a partir de 100 mg de acículas liofilizadas nas 316 amostras de *Araucaria angustifolia*, com média de $346,8 \pm 288,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. A razão $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ situou-se entre 1,7 a 2,0 em 80% das amostras, indicando baixo nível de substâncias de interferência (polifenóis, polissacarídeos e proteínas). O protocolo estabelecido permitiu a amplificação por PCR (Figura 1), demonstrando a qualidade do DNA isolado.

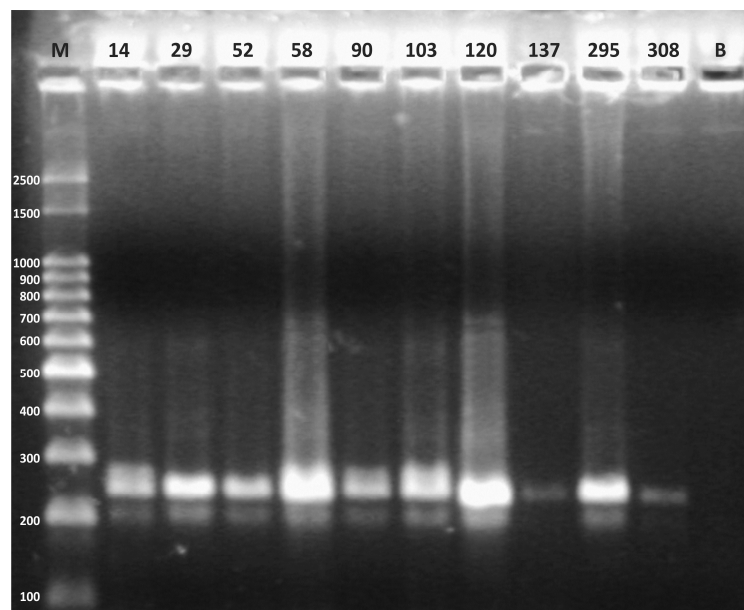


Figura 1. Ferograma dos produtos de amplificação do DNA de 10 indivíduos de *Araucaria angustifolia*, com o primer microssatélite Ag20. M corresponde ao marcador de peso molecular (100 pb) e B corresponde ao branco.

Em comparação com este estudo, Mazza e Bittencourt (2000) obtiveram 77% das amostras de DNA de *Araucaria angustifolia* com razão $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ entre 1,7 a 2,0, e menor quantidade a qual foi de 14,5 a 357,3, com média de $110,6 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Já Stefenon et al. (2004) também obtiveram 80% das amostras de *Araucaria angustifolia* com razão $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ entre 1,7 a 2,0 e quantidade de DNA isolado de 33,3 a 400, com média de $147,3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Comparando-se os seis protocolos testados inicialmente, observou-se que é necessária a utilização de duas lavagens do DNA com etanol 70%, de forma a deixar o DNA livre dos

contaminantes. Além disso, para extrair quantidade suficiente de DNA, é necessário utilizar forte agitação e aumentar o tempo de centrifugação de cinco minutos (Ferreira e Grattapaglia, 1996) para 10 minutos. Sperisen et al. (2000) também utilizaram forte agitação e centrifugação por maior período (30 minutos) em protocolo desenvolvido para isolamento de DNA de 32 espécies de gimnospermas, dentre elas a *Araucaria angustifolia*. No presente trabalho, observou-se também que não é necessária a utilização de acetato de amônio, recomendado por Doyle e Doyle (1990).

Em relação ao protocolo utilizado para *Araucaria angustifolia* por Stefenon et al. (2004) o protocolo do presente trabalho proporcionou economia de uma extração com CIA. Também não foi necessária a utilização de 2-mercaptoetanol e da solução de CTAB 10% + NaCl 1,4 M, a qual foi utilizada pelos autores citados em seu trabalho, visando a eliminação de polifenóis e polissacarídeos da amostra, respectivamente. Desta forma, o CTAB (2%) utilizado no tampão de extração e as duas extrações com CIA foram suficientes para a remoção desses contaminantes das amostras de araucária no presente trabalho.

Ressalta-se que as amostras de acículas foram liofilizadas e permaneceram em freezer (-20°C) por pelo menos 120 dias, sem se verificar degradação do DNA isolado. Mazza e Bittencourt (2000) relataram que a obtenção do DNA de araucária de boa qualidade somente foi possível com a liofilização prévia das acículas. Stefenon et al. (2004) observaram degradação do DNA isolado de acículas de araucária armazenadas a -20°C por uma semana a três meses, sendo maior a degradação do DNA quanto maior o tempo de armazenamento. Esses autores não efetuaram a liofilização das amostras, o que indica que esta técnica é importante para evitar a degradação do DNA de acículas de araucária armazenadas.

Mazza e Bittencourt (2000) observaram que o uso da proteinase K (0,01% no tampão de extração) foi fundamental para obtenção de DNA de *Araucaria angustifolia* livre de proteínas. Esses autores utilizaram apenas uma lavagem com etanol 70%. No presente trabalho, como não foi efetuada a adição de proteinase K ao tampão de extração, pode-se inferir que as proteínas foram satisfatoriamente eliminadas pelas duas extrações orgânicas com CIA e duas lavagens com etanol 70% (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação entre o protocolo de isolamento de DNA obtido no presente trabalho e protocolos da literatura.

Característica	Doyle e Doyle (1990)*	Ferreira e Grattapaglia (1996)*	Mazza e Bittencourt (2000)**	Stefenon et al. (2004)**	Presente trabalho**
Quantidade de PVP no tampão	0%	1%	1%	2%	2%
Quantidade de 2-mercaptoetanol no tampão	0,20%	0,20%	0,10%	1%	0%
Utilização de proteinase k 0,01%	não	não	sim	não	não
Utilização de CTAB 10% + NaCl 1,4 M (50 µL/amostra)	não	sim	não	sim	não
Utilização de acetato de amônio	sim	não	não	não	não
Quantidade de lavagens etanol 70%	nenhuma	2	1	nenhuma	2
Quantidade de RNase A por amostra (µL)	não informado	não informado	3	5	1
Quantidade Lavagens CIA	1	2	2	3	2
Média DNA isolado (ng µL ⁻¹)	não informado	não informado	110,6	147,3	346,8
Pureza (razão OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀)	não informado	não informado	77%	80%	80%
Custo (R\$) por amostra***	não calculado	não calculado	0,80	0,82	0,72

*Protocolos recomendados para várias espécies vegetais. **Protocolos desenvolvidos com *Araucaria angustifolia*. ***Calculado em função das quantidades utilizadas nos protocolos e dos custos dos reagentes, utilizando valor médio de orçamentos de quatro empresas de Curitiba-PR, em julho de 2011.

Kim et al. (1997) desenvolveram um protocolo de isolamento de DNA para coníferas, preconizando a utilização de PVP na concentração de 6% e a adição de uma solução de acetato de amônio 7,5 M. Esta última solução foi utilizada no protocolo três testado no presente trabalho. Apesar de favorecer a obtenção de DNA de boa qualidade, essa solução aumenta o custo e o tempo gasto durante o isolamento. Como houve a obtenção de DNA de boa qualidade e quantidade com o protocolo seis, a utilização de solução de acetato de amônio 7,5 M é dispensável e a concentração de PVP pode ser de 2%, assim como observado também por Stefenon et al. (2004).

Considerando a alta presença de polifenóis nas acículas de araucária (Fonseca et al., 2000), a adição de PVP 2% foi imprescindível para evitar a oxidação e eliminar estes compostos (Cheng et al., 1997). Assim, o DNA de araucária observado na precipitação com isopropanol foi incolor, característica que demonstra ausência de polifenóis. A formação de DNA escuro denota ligação de polifenóis oxidados ao DNA (Peterson et al., 1997). Mazza e Bittencourt (2000) utilizaram 1% de PVP, porém utilizaram também 2-mercaptoetanol, o qual também evita a oxidação de fenóis. No presente trabalho optou-se por aumentar a concentração de PVP para 2% e não utilizar o 2-mercaptoetanol, pelas dificuldades de manuseio e sua toxicidade.

Verificou-se que o custo de isolamento de DNA de araucária é menor utilizando o protocolo estabelecido neste trabalho, em relação àqueles descritos por Mazza e Bittencourt (2000) e por Stefenon et al. (2004). Embora o número de lavagens com etanol 70% foi aumentado, ocorreu a economia de reagentes de maior custo, não sendo utilizados o 2-mercaptoetanol, a proteinase K e a solução de CTAB 10% + NaCl 1,4 M, e reduzindo-se a quantidade de RNase A utilizada (Tabela 2).

O protocolo estabelecido neste trabalho torna o isolamento de DNA de *Araucaria angustifolia* mais rápido em relação aos demais protocolos descritos na literatura para a espécie. Isto porque o protocolo se tornou mais simples, pois apresenta menor número de etapas e devido à supressão dos reagentes que demandam maior tempo para utilização, como o 2-mercaptoetanol e a solução de CTAB 10% + NaCl 1,4 M. Como os estudos de diversidade genética demandam um grande número de plantas amostradas, um protocolo que proporcione uma rápida obtenção de DNA é desejável. Dessa forma, o presente protocolo de isolamento de DNA se torna um eficiente subsídio para o desenvolvimento de análises com marcadores moleculares para *Araucaria angustifolia*, as quais podem servir de direcionamento para estratégias de conservação e melhoramento genético da espécie.

3.4 CONCLUSÕES

O protocolo estabelecido foi eficiente no isolamento de DNA de *Araucaria angustifolia* de boa qualidade e é uma opção mais rápida e mais barata que os protocolos descritos na literatura para a espécie. Com isso, o protocolo pode se tornar uma ferramenta eficiente nas análises de DNA, que são necessárias para estudos visando definir estratégias de conservação e melhoramento genético da araucária.

3.5 REFERÊNCIAS

- AULER, N.M.F.; REIS, M.S.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. The genetics conservation of *Araucaria angustifolia*: 1 - genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptative variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.3, p.329-338, 2002.
- 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.
- CHENG, F.S.; BROWN, S.K.; WEEDEN, N.F. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. **HortScience**, v.32, n.5, p.921-922, 1997.
- COUCH, J.A.; FRITZ, P.J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.8, n.1, p.8-12, 1990.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- FANG, G.; HAMMAR, S.; GRUMET, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. **Biotechniques**, v.13, n.1, p.52-56, 1992.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: CENARGEN, 1996. 220p.
- FONSECA, F.N.; FERREIRA, A.J.S.; SARTORELLI, P.; LOPES, N.P.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W.; KATO, M.J. Phenylpropanoid derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v.55, n.6, p.575-580, 2000.
- GUERRA, M.P.; SILVEIRA, V.; REIS, M.S.; SCHNEIDER, L. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: SENAC, 2002. p.85-101.
- KIM, C.S.; LEE, C.H.; SHIN, J.S.; CHUNG, Y.S.; HYUNG, N.I. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.5, p.1085-1086, 1997.

MATTOS, J.R. **O pinheiro brasileiro**. 2. ed. Lages: Artes Gráficas Princesa, 1994. 228p.

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

MEDRI, C.; RUAS, P.M.; HIGA, A.R.; MURAKAMI, M.; RUAS, C.F. Effects of forest management on the genetic diversity in a population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Silvae Genetica**, v.52, n.5-6, p.202-205, 2003.

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Instrução Normativa 06/2008. **Espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção e com deficiência de dados**. Disponível em: <(www.mma.gov.br)> Acesso em: 10 de outubro de 2010.

PANDEY, R.N.; ADAMS, R.P.; FLOURNOY, L.E. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.14, n.1, p.17-22, 1996.

PETERSON, D.G.; BOEHM, K.S.; STACK S.M. Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), a plant containing high levels of polyphenolic compounds. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.15, n.2, p.148-153, 1997.

SALGUEIRO, F.; CARON, H.; 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.

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

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

SOUZA, M.I.F.; SALGUEIRO, F.; CARVANALE-BOTTINO, M.; FÉLIX,D.B.; ALVES-FERREIRA, M.; BITTENCOURT, J.V.M.; MARGIS,R. Patterns of genetic diversity in southern and southernwest *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze relict populations. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, n.3, p.546-556, 2009.

SPERISEN, C.; GUGERLI, F.; BÜCHLER, U.; MÁTYÁS, G. Comparison of two rapid DNA extraction protocols for gymnosperms for application in population genetic and phylogenetic studies. **Forest Genetics**, v.7, n.2, p.133-136, 2000.

STEFENON, V.M.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Genética e conservação de *Araucaria angustifolia*: III. Protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPD para análise da diversidade genética em populações naturais. **Biotemas**, v.17, n.1, p.47-63, 2004.

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

STEFENON, V.M.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. Genetic structure of plantations and the conservation of genetic resources of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*). **Forest Ecology and Management**, v.255, n.7, p.2718-2725, 2008.

ZANETTE, F. **A araucaria como fruteira para a produção de pinhões**. Série Frutas Nativas. Jaboticabal: Funep, 2010. 25p.

4 CAPÍTULO II
SEGREGAÇÃO EM OITO LOCOS MICROSSATÉLITES EM PROGÊNIES DE
Araucaria angustifolia

RESUMO

Para que marcadores moleculares possam ser utilizados como marcadores genéticos em estudos de genética e melhoramento deve-se confirmar que os locos moleculares apresentam segregação Mendeliana. O objetivo deste trabalho foi investigar a segregação em oito locos microssatélites de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae). O estudo foi realizado comparando a segregação de progênies de polinização dirigida e de polinização livre de plantas maternas dióicas e monóicas da espécie. A segregação Mendeliana foi confirmada para todos os oito locos testados (Ag20, Ag23, Ag45, Aang01, Aang14, Aang28, As90 e CRCAC1), pois não foram detectados desvios da segregação esperada, em todas as progênies avaliadas. Estes oito locos podem ser usados para estudos genéticos em populações de *A. angustifolia*.

Palavras-chave: araucária, polinização dirigida, polinização livre, monoicia.

SEGREGATION IN EIGHT MICROSATELLITE LOCI IN PROGENIES OF
Araucaria angustifolia

ABSTRACT

To use molecular markers as genetic markers in genetic and breeding studies, it is important to confirm that the molecular markers present a Mendelian segregation. The aim of this research was to investigate the genetic segregation in eight microsatellite loci of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae). The study was carried out comparing the genetic segregation in artificial and open pollination progenies of maternal dioecious and monoicous trees of the species. The Mendelian segregation was confirmed for all eight studied loci (Ag20, Ag23, Ag45, Aang01, Aang14, Aang28, As90 and CRCAc1), because no deviation of the expected hypotheses of segregations was detected in all progenies. These eight loci can be used for genetic studies in *A. angustifolia* populations.

Key-words: Brazilian pine, artificial pollination, open pollination, monoicy.

4.1 INTRODUÇÃO

A araucária (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae)) é uma conífera dióica, raramente monóica, polinizada pelo vento. A espécie é endêmica principalmente do Sul e Sudeste do Brasil, e com pequena área de ocorrência na Argentina e no Paraguai (Hueck, 1972). Atualmente é considerada em extinção (MMA, 2008), uma vez que sua área de ocorrência no Brasil foi reduzida a menos de 3% da original, a qual era de 18,2 milhões de hectares até final do século XIX (Hueck, 1972; Guerra et al., 2002). A espécie apresenta grande importância ecológica, pois as árvores adultas criam condições de sombreamento necessárias para a regeneração de outras espécies nativas sob seu dossel (Barbosa et al., 2009). Além disso, o pinhão (semente da araucária) apresenta extrema importância alimentícia para animais que habitam as florestas com araucária, sendo excelente fonte de energia no inverno (Vidolin et al., 2011). Os humanos também utilizam o pinhão como alimento e sua comercialização é a principal fonte de renda anual para centenas de famílias de baixa renda no Sul do Brasil (Silva e Reis, 2009).

O conhecimento do sistema de reprodução, fluxo gênico, diversidade e estrutura genética são de fundamental importância para definir estratégias de conservação e melhoramento genético de espécies arbóreas (Sebbenn, 2006). Tais informações podem ser eficientemente elucidadas com base em dados de marcadores moleculares, como os SSR (*simple sequence repeat*), também denominados de microssatélites. Contudo, para que marcadores moleculares possam ser utilizados como marcadores genéticos em estudos populacionais, para evitar viés nas estimativas dos parâmetros genéticos, deve-se confirmar que os locos têm segregação mendeliana (Gillet e Hattemer, 1989).

Segregação é a proporção em que um par de alelos é separado nos gametas durante a meiose e como são distribuídos em uma dada população. Para verificar se há desvios de segregação em locos marcadores podem ser utilizadas: (a) progênies de polinização dirigida de genótipos parentais conhecidos (progênie de irmãos-completos); e (b) progênies de polinização livre de genótipos maternos heterozigotos (progênie pode conter misturas de irmãos-completos, meio-irmãos e irmãos de autofecundação).

O objetivo deste trabalho foi investigar a segregação em oito locos microssatélites de *A. angustifolia*. O estudo foi realizado comparando a segregação de progênies de polinização dirigida e de polinização livre de plantas maternas dióicas e monóicas da espécie.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Para obtenção das progênie de polinização dirigida de *A. angustifolia*, as hibridações foram realizadas nos anos de 2005 e 2006, seguindo metodologia descrita em Anselmini e Zanette (2012). Foram realizadas 11 polinizações dirigidas (Tabela 1), utilizando cinco genitores femininos (PF_1, PF_3, PF_Social e PF_Solos, localizadas na cidade de Curitiba-PR; e PF_Fazenda, localizada em Pinhais-PR) e seis genitores masculinos doadores de pólen (Gua_1 e Gua_2, localizadas em Guarapuava-PR; PB_1, localizada em Pato Branco-PR; e Lg_Galpão, Lg_Horta e Lg_5, localizadas em Lages-SC). Uma das polinizações dirigidas foi realizada através da autofecundação da planta monóica PF_3 (PF_3 x PF_3). As progênie de polinização livre (sem controle dos genitores masculinos) foram obtidas de três plantas femininas dióicas (Pinha_400, localizada em Caçador-SC; PF_Social e PF_Fazenda, localizações mencionadas acima) e de três plantas monóicas de *A. angustifolia* (MN_Ara, de Aratiba-RS; MN_SD, de São Domingos-SC; e MN_Gua, de Guarapuava-PR).

Tabela 1. Tipos de progênie, genitores e distância entre genitores utilizados na análise de segregação em *Araucaria angustifolia*.

Tipo da progênie	Genitor feminino	Genitor masculino	Distância entre genitores (km)
Polinização dirigida	PF_3	PB_1	348,3
Polinização dirigida	PF_3	Gua_1	223,3
Polinização dirigida	PF_3	Lg_Galpão	284,2
Polinização dirigida	PF_Social	PB_1	350,1
Polinização dirigida	PF_Solos	PB_1	348,4
Polinização dirigida	PF_Solos	Lg_Horta	284,5
Polinização dirigida	PF_Fazenda	Lg_5	291,8
Polinização dirigida	PF_Fazenda	Gua_2	235,3
Polinização dirigida	PF_1	Lg_Horta	284,4
Polinização dirigida	PF_3	Lg_Horta	284,3
Polinização dirigida	PF_3	PF_3	-
Polinização livre	Pinha_400	-	-
Polinização livre	PF_Fazenda	-	-
Polinização livre	PF_Social	-	-
Polinização livre	MN_Ara	-	-
Polinização livre	MN_SD	-	-
Polinização livre	MN_Gua	-	-

A distância entre genitores é em linha reta. PF_3, MN_Ara, MN_SD e MN_Gua são plantas monóicas de *A. angustifolia*.

Os pinhões maduros das progênes de polinização dirigida e livre foram colhidos e semeados em sacos de polietileno contendo terra como substrato. As mudas obtidas de cada progênie foram separadas e identificadas, sendo cultivadas ao ar livre no Setor de Ciências Agrárias da UFPR (Universidade Federal do Paraná), em Curitiba-PR.

Foram coletadas acículas dos indivíduos adultos utilizados como genitores e de 18 plantas juvenis (2 a 3 anos de idade) de cada progênie de polinização dirigida e de polinização livre, totalizando 321 amostras. Após a coleta, as acículas foram acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados, contendo sílica gel. As amostras foram transportadas para o Laboratório de Genética de Microorganismos (LabGeM) da UFPR, onde foram liofilizadas durante 72 horas e armazenadas em freezer (-20° C) até o momento do isolamento de DNA. Procedeu-se ao isolamento de DNA das acículas de *A. angustifolia* utilizando o protocolo descrito no capítulo I. Realizou-se a quantificação de DNA de cada amostra utilizando-se o espectrofotômetro *NanoDrop 2000*[®] (Thermo Scientific). Após a quantificação, cada amostra foi diluída com água milli-Q autoclavada a uma concentração final de 10 ng µl⁻¹.

Análises genéticas

Para as análises de DNA foram utilizados oito locos microssatélites desenvolvidos para espécies de *Araucaria* (Tabela 2).

Tabela 2. Locos microssatélites, com motivos de repetição, número de acesso no GenBank, os respectivos autores e a espécie com que foi desenvolvido.

Locos	Motivo de repetição	GenBank	Autores	Espécie
Ag20	(GA) ₁₂	AJ749964	Salgueiro et al. (2005)	<i>Araucaria angustifolia</i>
Ag23	(TA) ₅ (GT) ₄	AJ749965	Salgueiro et al. (2005)	<i>Araucaria angustifolia</i>
Ag45	(GT) ₄ AT(GT) ₇	AJ749966	Salgueiro et al. (2005)	<i>Araucaria angustifolia</i>
Aang01	(CT) ₂₂	AY865575	Schmidt et al. (2007)	<i>Araucaria angustifolia</i>
Aang14	(GA) ₂₇	AY865583	Schmidt et al. (2007)	<i>Araucaria angustifolia</i>
Aang28	(CT) ₁₁	AY865592	Schmidt et al. (2007)	<i>Araucaria angustifolia</i>
As90	(CA) _{10n} (CA) ₈	-	-	<i>Araucaria subulata</i>
CRCAc1	(GA) ₁₉	AF522871	Scott et al. (2003)	<i>Araucaria cunninghamii</i>

O loco As90 não foi publicado em artigo ou no GenBank e foi desenvolvido juntamente com os locos descritos em Robertson et al. (2004). As informações sobre o *primer* foram prestadas pelo Dr. Peter Hollingsworth, Diretor de Ciências do Royal Botanic Garden, de Edinburgo, Escócia.

Para verificar a temperatura de anelamento (Ta ° C) mais adequada para cada um dos oito locos, utilizaram-se 10 amostras de DNA e procedeu-se à PCR (*Polymerase Chain Reaction*), com gradientes de temperatura, em termociclador Maxygene[®] (Axygen). O

produto da PCR foi visualizado através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, aplicando-se 5 μL do produto de PCR e 2 μL do corante GelRed[®] (Biotium). A eletroforese foi realizada em corrente elétrica de 3 volts/cm, durante 120 minutos e o resultado visualizado por transiluminação com luz ultravioleta.

Para a amplificação por PCR de todas as amostras, utilizou-se solução de reação com volume final de 10 μL , contendo 5 μL de Qiagen Multiplex PCR Master Mix 2x, 1 μL de mix de primers 10x (2 μM de cada primer), 2 μL de DNA genômico (10 ng μL^{-1}), 1 μL de Q-Solution 5x e 1 μL de água Milli-Q. O programa de PCR utilizado no termociclador foi: (i) etapa inicial de desnaturação do DNA e ativação da *Taq* DNA polimerase a 95° C por 15 minutos; (ii) 35 ciclos de amplificação em três fases: 94° C por 30 segundos, temperatura de anelamento (Tabela 3) por 90 segundos e 72° C por 60 segundos; e (iii) extensão final a 72° C por 10 minutos. Após a amplificação foi adicionado 10 μL de Água Milli-Q em cada amostra, as quais foram mantidas em freezer (-20°C) até o momento da genotipagem.

Para a genotipagem, utilizou-se 1,0 μL da solução com os fragmentos amplificados de cada amostra, misturados com 0,125 μL de padrão GS 500 ROX[®] ou 0,5 μL de GS 600 LIZ[®], completando-se o volume para 10 μL com formamida Hi-Di[®]. O polimorfismo foi detectado por rotulagem dos *primers* com corantes fluorescentes e realização da PCR em combinações biplex ou triplex (Tabela 3), seguido de detecção dos fragmentos por eletroforese capilar, em sequenciador automático ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Tabela 3. Características dos *primers* microssatélites utilizados nas análises genéticas em *Araucaria angustifolia*.

Combinação	Fluorescência	Fragmento detectado (pb)	Temperatura de anelamento
Ag20	FAM (azul)	240-258	59,3°C
Triplex			
Ag45	FAM (azul)	154-168	57,8°C
CRCAc1	FAM (azul)	203-225	57,8°C
As90	NED (amarelo)	160-180	57,8°C
Biplex			
Aang01	HEX (verde)	200-260	56°C
Aang14	FAM (azul)	150-190	56°C
Biplex			
Aang28	HEX (verde)	130-170	55 °C
Ag23	FAM (azul)	245-259	55 °C

O padrão de tamanho de fragmento utilizado foi o GS 500 ROX[®] para as amostras com os microssatélites Ag20, Ag45, As90 e CRCAc1 e o GS 600 LIZ[®] com Ag23, Aang01, Aang14 e Aang28.

O tamanho dos fragmentos (alelos) foi determinado pela interpretação dos picos dos eletroferogramas gerados, utilizando o software GeneMapper v.4.1 (Applied Biosystems). Os

números referentes aos tamanhos dos alelos foram exportados para planilhas, para efetuar as análises estatísticas.

Análises estatísticas

Para as análises de segregação foram utilizados dados de tamanho de alelos de 314 indivíduos, pois para sete indivíduos não foi possível determinar o tamanho dos alelos de forma inequívoca.

Para o estudo da segregação dos oito locos microssatélites em *A. angustifolia* adotou-se o método descrito por Gillet e Hattemer (1989). Foram comparados os genótipos materno e paterno (quando havia o controle) com a segregação de suas progênes de polinização dirigida ou polinização livre. O teste prevê que as seguintes condições devem ser satisfeitas: a) toda progênie de uma árvore materna A_iA_i deve possuir o alelo A_i da árvore-mãe; b) Em casos de uma árvore-mãe heterozigota (ex. A_iA_j , $i \neq j$): b.1) cada indivíduo de uma progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna, A_i ou A_j , b.2) o número de progênes heterozigotas A_iA_j (N_{ij}) deve ser igual à soma das progênes homozigotas A_iA_i (N_{ii}) e A_jA_j (N_{jj}), $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$; b.3) o número de progênes heterozigotas A_iA_k (N_{ik}) deve ser igual ao número de progênes heterozigotas A_jA_k (N_{jk}), $N_{ik} = N_{jk}$, com $k \neq i, j$. Os fenótipos observados em cada progênie de árvores maternas heterozigotas foram comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1 ou 1:2:1, por meio de um teste G de máxima verossimilhança, usando a fórmula abaixo (Weir, 1996):

$$G = 2 \left[n_i \ln \left(\frac{n_i}{E(n)} \right) + n_j \ln \left(\frac{n_j}{E(n)} \right) \right]$$

em que, n_i e n_j são o número de genótipos observados contendo alelos A_i e A_j , respectivamente; $E(n)$ é o número de genótipos esperados para alelos A_i e A_j , sendo $E(n) = 0,5(n_i + n_j)$; \ln é o logaritmo natural. O teste G checa se o desvio entre a segregação observada e a esperada é estatisticamente significativo ou pode ser explicado pelo acaso. Aplicou-se também uma correção sequencial de Bonferroni para múltiplas comparações (95%, $\alpha = 0,05$).

Também foi calculada a frequência dos alelos em todos os locos. As frequências foram classificadas em três classes: (a) frequência alta ($p > 0,25$), (b) frequência intermediária ($0,05 < p \leq 0,25$), (c) frequência rara ($p \leq 0,05$). Os alelos privados de cada tipo de progênie também foram identificados.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos oito locos microssatélites, foram detectados de três (Ag45 e CRCAc1) até 17 alelos (Aang01 e Aang14), com média de 8,8 alelos por locos e total de 71 alelos. As progênies de polinização livre apresentaram 25 alelos privados, em relação às progênies de polinização dirigida (com apenas dois alelos privados), apesar de ter menor número de indivíduos genotipados, N = 107 e N = 192, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Frequências alélicas e presença de alelos privados de oito locos microssatélites em progênies de 11 polinizações dirigidas (N = 192) e seis polinizações livres (N = 107) de *Araucaria angustifolia*.

Ag20	Polinização dirigida	Polinização livre	Ag23	Polinização dirigida	Polinização livre
239	0,05	0,07	247	0,07	0,09
241	0,08	0,06	249	0,55	0,44
243	0,71	0,67	251	0,04	0,06
245	0,00	0,01	253	0,07	0,07
249	0,16	0,16	255	0,27	0,28
253	0,00	0,03	257	0,00	0,06
Privados	-	2	Privados	-	1
Ag45			CRCAc1		
151	0,00	0,04	199	0,10	0,14
163	0,19	0,17	201	0,79	0,74
165	0,81	0,79	203	0,11	0,12
Privados	-	1	Privados	-	-
Aang01			Aang14		
200	0,00	0,02	148	0,00	0,02
202	0,00	0,07	150	0,02	0,04
204	0,00	0,02	152	0,09	0,15
206	0,00	0,02	154	0,00	0,01
208	0,32	0,07	156	0,00	0,01
210	0,02	0,01	160	0,00	0,01
212	0,04	0,10	162	0,04	0,07
214	0,00	0,20	164	0,29	0,26
216	0,17	0,10	168	0,15	0,05
218	0,23	0,11	170	0,26	0,25
220	0,02	0,05	172	0,00	0,08
222	0,06	0,04	174	0,06	0,02
224	0,11	0,09	176	0,00	0,01
226	0,02	0,01	180	0,00	0,01
230	0,00	0,07	182	0,02	0,02
232	0,00	0,01	184	0,06	0,00
244	0,00	0,01	188	0,00	0,01
Privados	-	8	Privados	1	8

Continuação da tabela 4.

Aang28	Polinização dirigida	Polinização livre	As90	Polinização dirigida	Polinização livre
134	0,00	0,02	173	0,05	0,08
136	0,06	0,00	175	0,31	0,32
144	0,00	0,01	177	0,44	0,22
150	0,13	0,18	179	0,06	0,09
152	0,12	0,22	181	0,14	0,22
154	0,21	0,07	183	0,00	0,06
156	0,02	0,03	189	0,00	0,01
158	0,04	0,02	-	-	-
160	0,00	0,01	-	-	-
162	0,07	0,09	-	-	-
166	0,26	0,12	-	-	-
168	0,10	0,23	-	-	-
Privados	1	3	Privados	-	2

Todos os locos tiveram alelos privados nas progênies de polinização livre, exceto o CRCAc1. As progênies de polinização dirigida apresentaram apenas dois alelos privados, um alelo no loco Aang14 e um no loco Aang28. Todos os locos apresentaram um ou dois alelos com frequência alta ($p > 0,25$), a exceção das progênies de polinização livre no loco Aang01, em que houve oito alelos de frequência intermediária ($0,05 < p \leq 0,25$) e nove alelos raros ($p \leq 0,05$). Em alguns locos não houve alelos raros, como nas progênies de polinização dirigida dos locos Ag45 e CRCAc1 e nas progênies de polinização livre dos locos Ag23 e CRCAc1.

Bittencourt e Sebbenn (2009) detectaram a perda de alelos de baixa frequência em populações fragmentadas de *A. angustifolia* em relação a uma floresta contínua bem conservada de Mangueirinha-PR. A alta presença de alelos privados e de baixa frequência, encontrada no presente trabalho, nas progênies de polinização livre de *A. angustifolia* demonstra o potencial de geração de diversidade genética que tem estas progênies. Porém, é necessário salientar que se trata de progênies de seis plantas (três femininas e três monóicas), localizadas distantes entre si, em três diferentes Estados (PR, SC e RS). Assim, a diferenciação de alelos é esperada devido ao efeito do isolamento por distância (Wright, 1943). Embora estes alelos microssatélites sejam marcadores neutros, outros alelos que fazem parte de regiões gênicas podem ter sido incorporados aos indivíduos das progênies. Estes podem ter efeito sobre características importantes para a adaptação e melhoramento genético da araucária. Segundo Bergmann et al. (1990) alelos raros e de frequência intermediária podem ser importantes para o desempenho e adaptabilidade de uma população em longo prazo.

Comparando aos demais trabalhos na literatura realizados com uso de marcadores microsatélites em *A. angustifolia*, o presente trabalho apresentou menor número de alelos nos locos Ag20, Ag23, As90 e CRCAc1, e maior número de alelos que o detectado nos locos Aang14 e Aang28. Assim como no presente trabalho, o loco Aang01 foi o que apresentou maior número de alelos dentre os locos na maioria dos trabalhos em que foi testado (Schmidt et al., 2007; Stefenon et al., 2007; Sant’Anna, 2011), embora para Patreze e Tsai (2010) o loco Aang01 teve menor número de alelos em relação aos cinco demais locos testados.

Pela análise de segregação Mendeliana, usando o teste G e correção de Bonferroni, não foram detectados desvios significativos em relação à hipótese de segregação esperada (1:1 ou 1:2:1) em nenhuma das progênes testadas, seja de polinização dirigida (Tabela 5) ou polinização livre (Tabela 6) de *A. angustifolia*. Os maiores valores de G dentre todos os locos foram encontrados no loco Ag45 para as progênes de polinização dirigida PF_3 x Gua_1 ($G = 5,72$) e PF_3 x Lg_Galpão ($G = 5,66$).

Tabela 5. Teste de herança Mendeliana de oito locos microsatélites em progênes de polinização dirigida de *Araucaria angustifolia*.

Hibridação	Genótipos	n	$n_{ij}:n_{ii}+n_{jj}$	$n_{ik}:n_{jk}$	$n_{il}:n_{jl}$	G	GL
Ag20							
PF_3 x PB_1	243/249 x 243/249	18	10:8	0:0	0:0	2,32	2
PF_3 x Gua_1	243/249 x 239/243	17	7:6	2:2	0:0	5,09	3
PF_3 x Lg_Galpão	243/249 x 239/243	18	5:5	5:3	0:0	0,73	3
PF_Social x PB_1	239/241 x 243/249	17	0:0	6:5	2:4	2,26	3
PF_Solos x PB_1	241/243 x 243/249	17	4:3	0:0	4:6	1,08	3
PF_Solos x Lg_Horta	241/243 x 243/243	16	5:11	0:0	0:0	2,31	1
PF_Fazenda x Lg_5	243/243 x 241/243	18	0:10	8:0	0:0	0,22	1
PF_Fazenda x Gua_2	243/243 x 243/243	17	0:17	0:0	0:0	-	-
PF_1 x Lg_Horta	243/243 x 243/243	18	0:18	0:0	0:0	-	-
PF_3 x Lg_Horta	243/249 x 243/243	18	6:12	0:0	0:0	2,04	1
PF_3 x PF_3	243/249 x 243/249	18	6:12	0:0	0:0	2,04	2
Ag23							
PF_3 x PB_1	249/255 x 249/253	18	5:4	0:0	5:4	0,22	3
PF_3 x Gua_1	249/255 x 249/249	17	7:10	0:0	0:0	0,53	1
PF_3 x Lg_Galpão	249/255 x 249/251	18	4:5	0:0	4:5	0,22	3
PF_Social x PB_1	249/255 x 249/253	17	5:4	0:0	4:4	0,17	3
PF_Solos x PB_1	247/255 x 249/253	17	0:5	5:4	5:3	0,68	3
PF_Solos x Lg_Horta	247/255 x 249/249	16	0:0	8:8	0:0	0,00	1
PF_Fazenda x Lg_5	249/255 x 247/249	18	5:4	5:4	0:0	0,22	3
PF_Fazenda x Gua_2	249/255 x 249/251	17	5:4	0:0	4:4	0,17	3
PF_1 x Lg_Horta	249/255 x 249/249	18	10:8	0:0	0:0	0,22	1
PF_3 x Lg_Horta	249/255 x 249/249	18	10:8	0:0	0:0	0,22	1
PF_3 x PF_3	249/255 x 249/255	18	8:10	0:0	0:0	0,22	2

Continuação da tabela 5.

Hibridação	Genótipos	<i>n</i>	$n_{ij}:n_{ii}+n_{jj}$	$n_{ik}:n_{jk}$	$n_{il}:n_{jl}$	<i>G</i>	<i>GL</i>
Ag45							
PF_3 x PB_1	163/165 x 165/165	18	7:11	0:0	0:0	0,90	1
PF_3 x Gua_1	163/165 x 163/165	17	4:13	0:0	0:0	5,72	2
PF_3 x Lg_Galpão	163/165 x 163/165	18	4:14	0:0	0:0	5,66	2
PF_Social x PB_1	163/165 x 165/165	17	7:10	0:0	0:0	0,53	1
PF_Solos x PB_1	165/165 x 165/165	17	0:17	0:0	0:0	-	-
PF_Solos x Lg_Horta	165/165 x 165/165	16	0:16	0:0	0:0	-	-
PF_Fazenda x Lg_5	165/165 x 163/165	18	0:10	8:0	8:0	0,22	1
PF_Fazenda x Gua_2	165/165 x 165/165	17	0:17	0:0	0:0	-	-
PF_1 x Lg_Horta	165/165 x 165/165	18	0:18	0:0	0:0	-	-
PF_3 x Lg_Horta	163/165 x 165/165	18	7:11	0:0	0:0	0,90	1
PF_3 x PF_3	163/165 x 163/165	18	9:9	0:0	0:0	0,00	2
Aang01							
PF_3 x PB_1	208/218x208/216	18	6:6	0:0	3:3	2,04	3
PF_3 x Gua_1	208/218x208/222	17	5:4	0:0	4:4	0,17	3
PF_3 x Lg_Galpão	208/218x212/212	18	0:0	10:8	0:0	0,22	1
PF_Social x PB_1	216/220x208/216	17	5:4	4:4	0:0	0,17	3
PF_Solos x PB_1	218/222x208/216	17	0:0	5:4	4:4	0,17	3
PF_Solos x Lg_Horta	218/222x216/224	16	0:0	4:4	4:4	0,00	3
PF_Fazenda x Lg_5	208/224x208/210	18	5:0	0:0	4:5	0,22	3
PF_Fazenda x Gua_2	208/224x218/218	17	0:0	9:8	0:0	0,06	1
PF_1 x Lg_Horta	216/226x216/224	18	4:5	0:0	4:5	0,22	3
PF_3 x Lg_Horta	208/218x216/224	18	0:0	4:6	4:4	0,63	3
PF_3 x PF_3	208/218x208/218	18	5:13	0:0	0:0	3,68	2
Aang14							
PF_3 x PB_1	164/170 x 168/184	18	0:0	5:5	4:4	0,22	3
PF_3 x Gua_1	164/170 x 152/164	17	4:5	4:4	0:0	0,17	3
PF_3 x Lg_Galpão	164/170 x 164/182	18	7:2	0:0	4:5	3,05	3
PF_Social x PB_1	164/170 x 168/184	17	0:0	4:6	3:4	1,08	3
PF_Solos x PB_1	152/174 x 168/184	17	0:0	5:3	6:3	1,58	3
PF_Solos x Lg_Horta	152/174 x 164/168	16	0:0	5:4	3:4	0,51	3
PF_Fazenda x Lg_5	162/170 x 164/170	18	3:9	4:6	0:0	1,13	3
PF_Fazenda x Gua_2	162/170 x 150/170	17	4:9	5:4	0:0	0,17	3
PF_1 x Lg_Horta	152/174 x 164/168	18	0:0	5:5	3:5	0,73	3
PF_3 x Lg_Horta	164/170 x 164/168	18	4:5	0:0	4:5	0,22	3
PF_3 x PF_3	164/170 x 164/170	18	8:5	0:0	0:0	0,22	2

Continuação da tabela 5.

Hibridação	Genótipos	<i>n</i>	$n_{ij}:n_{ii}+n_{jj}$	$n_{ik}:n_{jk}$	$n_{il}:n_{jl}$	<i>G</i>	<i>GL</i>
Aang28							
PF_3 x PB_1	154/166 x 136/168	18	0:0	4:4	5:5	0,22	3
PF_3 x Gua_1	154/166 x 156/162	17	0:0	5:4	4:4	0,17	3
PF_3 x Lg_Galpão	154/166 x 152/168	18	0:0	4:5	5:4	0,22	3
PF_Social x PB_1	150/152 x 136/168	17	0:0	4:4	4:5	0,17	3
PF_Solos x PB_1	152/158 x 136/168	17	0:0	4:4	5:4	0,17	3
PF_Solos x Lg_Horta	152/158 x 150/166	16	0:0	4:4	4:4	0,00	3
PF_Fazenda x Lg_5	154/162 x 150/166	18	0:0	5:4	5:4	0,22	3
PF_Fazenda x Gua_2	154/162 x 150/152	17	0:0	4:4	4:5	0,17	3
PF_1 x Lg_Horta	154/166 x 150/166	18	5:4	4:5	0:0	0,22	3
PF_3 x Lg_Horta	154/166 x 150/166	18	4:5	4:5	0:0	0,22	3
PF_3 x PF_3	154/166 x 154/166	18	9:9	0:0	0:0	0,00	2
As90							
PF_3 x PB_1	175/177 x 177/177	18	12:6	0:0	0:0	2,04	1
PF_3 x Gua_1	175/177 x 175/181	17	3:3	0:0	6:5	1,58	3
PF_3 x Lg_Galpão	175/177 x 177/177	18	8:10	0:0	0:0	0,22	1
PF_Social x PB_1	173/175 x 177/177	17	0:0	8:9	0:0	0,06	1
PF_Solos x PB_1	179/181 x 177/177	17	0:0	9:0	0:0	0,06	1
PF_Solos x Lg_Horta	179/181 x 175/175	16	0:0	7:9	0:0	0,25	1
PF_Fazenda x Lg_5	177/181 x 177/181	18	7:11	0:0	0:0	0,99	2
PF_Fazenda x Gua_2	177/181 x 177/179	17	4:4	0:0	4:5	0,17	3
PF_1 x Lg_Horta	173/177 x 175/175	18	0:0	10:8	0:0	0,22	1
PF_3 x Lg_Horta	175/177 x 175/175	18	11:7	0:0	0:0	0,90	1
PF_3 x PF_3	175/177 x 175/177	18	7:11	0:0	0:0	0,90	2
CRCAc1							
PF_3 x PB_1	201/201 x 199/201	18	0:9	9:0	0:0	0,00	1
PF_3 x Gua_1	201/201 x 201/201	17	0:17	0:0	0:0	-	-
PF_3 x Lg_Galpão	201/201 x 201/203	18	0:11	0:0	7:0	0,90	1
PF_Social x PB_1	199/201 x 199/201	17	7:10	0:0	0:0	0,93	2
PF_Solos x PB_1	201/201 x 199/201	17	0:9	8:0	0:0	0,06	1
PF_Solos x Lg_Horta	201/201 x 201/203	16	0:9	0:0	7:0	0,25	1
PF_Fazenda x Lg_5	201/201 x 201/203	18	0:7	0:0	11:0	0,90	1
PF_Fazenda x Gua_2	201/201 x 201/201	17	0:17	0:0	0:0	-	-
PF_1 x Lg_Horta	199/201 x 201/203	18	4:5	0:0	4:5	0,22	3
PF_3 x Lg_Horta	201/201 x 201/203	18	0:11	0:0	7:0	0,90	1
PF_3 x PF_3	201/201 x 201/201	18	0:18	0:0	0:0	-	-

n é o tamanho da amostra. *G* é o valor da estatística *G* de máxima verossimilhança para as hipóteses $n_{ij} = n_{ii} + n_{jj}$ e $n_{ik} = n_{jk}$. Nenhum valor de *G* foi significativo ($P \leq 0,05$). *GL* = graus de liberdade. Em progênies com 2 *GL* a hipótese testada foi a de 1:2:1, nas demais progênies a hipótese testada foi de 1:1.

No loco Aang28 observou-se que o alelo 136 foi encontrado apenas no genitor masculino PB_1 utilizado nas polinizações dirigidas e conseqüentemente em suas progênies.

Isto demonstra a capacidade deste tipo de polinização para formar novos genótipos, uma vez que esta hibridação não seria realizada na natureza (devido a grande distância entre os genitores).

No caso do loco Ag23, as árvores maternas genotipadas apresentaram baixa variabilidade para este loco. Das nove plantas, sete tem o mesmo genótipo (249/255), a exceção da dióica PF_Solos (247/255) e da monóica MN_Ara (249/249). Este fato pode ser devido à amostragem, pois outros autores verificaram maior variação dos alelos das árvores maternas genotipadas para este mesmo loco (Bittencourt, 2007; Sant'Anna, 2011), não sendo confirmada a hipótese de seleção de alguns alelos nas árvores maternas. Por outro lado, os doadores de pólen genotipados (polinização dirigida) e não genotipados (polinização livre) foram importantes para o aumento do número de alelos diferentes nas progênes para este loco.

Tabela 6. Teste de herança Mendeliana de oito locos microssatélites em progênes de polinização livre de *Araucaria angustifolia*.

Mãe	Genótipo	<i>n</i>	$n_{ij}:n_{ii}+n_{jj}$	$n_{ik}:n_{jk}$	<i>G</i>	Mãe	Genótipo	<i>n</i>	$n_{ij}:n_{ii}+n_{jj}$	$n_{ik}:n_{jk}$	<i>G</i>
Ag20						Aang28					
PF_Social	239/241	18	4:2	7:5	0,00	PF_Fazenda	154/162	17	0:0	11:6	1,49
Ag23						PF_Social	150/152	18	0:0	10:8	0,22
PF_Fazenda	249/255	17	3:0	9:5	1,16	Pinha_400	150/152	18	1:0	8:9	0,06
PF_Social	249/255	18	3:0	8:7	0,29	MN_SD	150/168	18	1:7	5:5	0,06
Pinha_400	249/255	18	3:2	6:7	0,07	MN_Gua	152/162	18	4:6	6:2	1,16
MN_SD	249/255	18	5:7	3:3	0,08	As90					
MN_Gua	249/255	18	3:7	5:3	0,60	PF_Fazenda	177/181	17	3:2	7:5	1,16
Ag45						PF_Social	173/175	18	7:3	4:4	0,09
PF_Social	239/241	18	8:10	0:0	0,22	Pinha_400	175/177	18	3:2	7:6	0,60
Aang01						MN_Ara	175/181	18	5:8	3:2	0,08
PF_Fazenda	208/224	17	0:0	8:9	0,06	MN_SD	179/183	18	3:4	7:4	0,07
PF_Social	216/220	18	1:0	10:7	0,53	MN_Gua	175/181	18	3:6	5:4	0,07
Pinha_400	214/216	18	4:1	10:3	4,86	CRCAc1					
MN_Ara	202/214	18	1:6	4:7	1,49	PF_Social	199/201	18	7:3	3:5	2,36
MN_Gua	212/230	18	2:5	2:9	2,31	MN_Gua	199/201	18	7:5	5:1	0,09
Aang14											
PF_Fazenda	162/170	17	0:0	8:9	0,06						
PF_Social	164/170	18	0:0	9:9	0,00						
Pinha_400	150/164	18	1:0	6:11	0,90						
MN_Ara	152/172	18	4:3	3:8	2,66						
MN_SD	152/170	18	4:5	2:7	2,66						
MN_Gua	164/170	18	7:6	4:1	0,83						

n é o tamanho da amostra. *G* é o valor da estatística *G* de máxima verossimilhança para as hipóteses $n_{ij} = n_{ii} + n_{jj}$ e $n_{ik} = n_{jk}$. Nenhum valor de *G* foi significativo ($P \leq 0,05$).

No loco As90, o alelo 183 foi exclusivo na progênie de polinização livre de MN_SD, alelo que estava presente neste genitor. Apesar deste loco ter sido desenvolvido para *Araucaria subulata*, espécie de Nova Caledônia, ele tem transferibilidade e segrega em progênies de *A. angustifolia*, como já havia sido verificado por Bittencourt e Sebbenn (2007).

O loco CRCAc1 apresentou baixo número de alelos (três). Nenhum genitor materno apresentou o alelo 203, apenas os genitores masculinos doaram este alelo, o que demonstra a importância das polinizações dirigidas para formação de novos genótipos. Observou-se que das nove plantas utilizadas como genitores femininos apenas três foram heterozigotas (PF_Social, PF_1 e MN_Gua) para este locus, com genótipo 199/201, enquanto as demais apresentaram genótipo homozigoto 201/201. Bittencourt (2007) também relatou que a grande maioria das árvores maternas de *A. angustifolia* genotipadas foram homozigotas para o loco CRCAc1, sendo que apenas duas árvores foram heterozigotas (200/202).

Scott et al. (2003) desenvolveram o loco CRCAc1 para *Araucaria cunninghamii* e verificaram que as sequências flanqueadoras deste loco são extremamente conservadas e, por isso, transferíveis para quatro espécies do gênero (*A. columnaris*, *A. heterophylla*, *A. luxurians* e *A. bidwillii*), e também para a espécie *Aghatis robusta* (também da família Araucariaceae). Segundo os autores, a baixa variação deste loco microssatélite evidencia sua associação com regiões gênicas, que estariam sob forte pressão seletiva contra eventuais mutações. A transferibilidade do loco CRCAc1 para *A. angustifolia* foi primeiramente verificada por Salgueiro et al. (2005).

Pelos resultados observados, pode-se afirmar que a herança Mendeliana foi confirmada para os oito locos microssatélites testados, pois não foram detectados desvios da segregação Mendeliana esperada (1:1 ou 1:2:1) em locos com herança codominante. Em todos os casos testados (110 no total), as progênies de polinização dirigida e polinização livre apresentaram baixos valores de *G* (máximo de 5,72). Assim, estes locos podem ser utilizados sem restrição para estudos do sistema de reprodução, diversidade genética, fluxo gênico e análise de parentesco em *A. angustifolia*.

Ao contrário do presente trabalho, Bittencourt (2007) detectou significativo desvio da segregação esperada de 1:1 nas progênies de duas das oito árvores maternas testadas para os locos Ag20 e As90, e em duas das 10 árvores maternas para o loco Ag23, em populações naturais de *A. angustifolia* de Mangueirinha-PR. Apesar disto, em 42 dos 52 casos não houve desvio da segregação esperada.

Desvios significativos encontrados na segregação pode ser resultado de erro de amostragem, baixo número de indivíduos analisados por progênie, erros de interpretação do tamanho dos alelos, ou ainda devido à presença de alelos nulos (Gillet e Hattemer, 1989).

Dos oito locos microssatélites utilizados neste trabalho, seis foram desenvolvidos para *A. angustifolia* (Salgueiro et al., 2005; e Schmidt et al., 2007), CRCAc1 foi desenvolvido por Scott et al. (2003) para *A. cunninghamii* e As90 foi desenvolvido para *A. subulata*. Estes autores e também Bittencourt (2007) e Sant'Anna (2011), que utilizaram estes locos em análises de populações de *A. angustifolia*, não detectaram significativos desequilíbrios de ligação entre os locos, após aplicar a correção de Bonferroni. Isto comprova que os mesmos não estão ligados nos cromossomos e segregam independentemente. Assim, estes locos podem ser usados conjuntamente em análises genéticas que requeiram locos em equilíbrio de ligação, como em análises de sistema de reprodução e de paternidade.

4.4 CONCLUSÕES

Os oito locos microssatélites (Ag20, Ag23, Ag45, Aang01, Aang14, Aang28, As90 e CRCAc1) apresentaram segregação Mendeliana em todas as progênies testadas de *Araucaria angustifolia*. Por isso, podem ser usados como marcadores genéticos em estudos de diversidade genética, análise de parentesco e fluxo gênico da espécie.

4.5 REFERÊNCIAS

ANSELMINI, J.I.; ZANETTE, F. Polinização controlada em *Araucaria angustifolia*. **Cerne**, v.18, n.2, p.247-255, 2012.

BARBOSA, C.E.A.; BENATO, T.; CAVALHEIRO, A.L.; TOREZAN, J.M.D. Diversity of regenerating plants in reforestations with *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze of 12, 22, 35, and 43 years of age in Paraná State, Brazil. **Restoration Ecology**, v.17, n.1, p.60-67, 2009.

BERGMANN, F.; GREGORIUS, H.H.; LARSEN, J.B. Levels of genetic variation in European silver fir (*Abies alba*) – are they related to the species' declines? **Genetica**, v.82, n.1, p.1-10, 1990.

BITTENCOURT, J.V.M. **Genetic diversity and dynamics in remnant patches of *Araucaria angustifolia* forest in Paraná State, Brazil: Implications for conservation and restoration**. 228f. Thesis, The University of Reading, 2007.

BITTENCOURT, J.V.M.; SEBBENN, A.M. Patterns of pollen and seeds dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, v.99, 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 & Genome**, v.5, p.573-582, 2009.

GILLET, E.; HATTEMER, H.H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, v.63, n.1, p.135-141, 1989.

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

HUECK, K. **As florestas da América do Sul: ecologia, composição e importância econômica**. São Paulo: Polígono, 1972. 466p.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção e com deficiência de dados.** Instrução Normativa 06/2008. Disponível em: <www.mma.gov.br> Acesso em: 10 de outubro de 2010.

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

ROBERTSON, A.; HOLLINGSWORTH, P.M.; KETTLE, C.J.; ENNOS, R.A.; GARDNER, M.F. Characterization of nuclear microsatellites in New Caledonia *Araucaria* species. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.62-63, 2004.

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

SANT'ANNA, C.S. **Diversidade genética, estrutura genética espacial e dispersão realizada de pólen e sementes em uma população contínua de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no Planalto Norte de Santa Catarina.** 2011. 89f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SCHMIDT, A.B.; CIAMPI, A.Y.; GUERRA, M.P.; NODARI, R. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Molecular Ecology Notes**, v.7, n.2, p.340-342, 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. Sistemas de reprodução em espécies tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: HIGA, A.R.; SILVA, L.D. (Coord.). **Pomar de sementes de espécies florestais nativas.** Curitiba: FUPEF, 2006. p.93-138.

SILVA, C.V.; REIS, M.S. Produção de pinhão na região de Caçador, SC: aspectos da obtenção e sua importância para comunidades locais. **Ciência Florestal**, v.19, n.4, p.363-374, 2009.

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

VIDOLIN, G.P.; BATISTA, D.B.; WANDEMBRUCK, A. Landscape valuation based on the ecological requirements of '*Tayassu pecari*' and '*Tapirus terrestris*' - a forest with araucaria, in Paraná State, Brazil. **Ciência Florestal**, v.21, n.3, p.505-515, 2011.

WEIR, B.S. **Genetic Data Analysis II: Methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 376p.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v.28, p.114-138, 1943.

5 CAPÍTULO III
DIVERSIDADE GENÉTICA EM PROGÊNIES DE POLINIZAÇÃO DIRIGIDA E
LIVRE DE *Araucaria angustifolia*

RESUMO

A araucária (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze) é uma espécie endêmica do Sul e Sudeste do Brasil e atualmente é considerada em extinção. Assim, estudos de diversidade genética se tornam importantes para fomentar a conservação e o melhoramento genético da espécie. O objetivo deste trabalho foi determinar a diversidade genética gerada em progênies de polinização dirigida e de polinização livre de plantas dióicas e monóicas de *A. angustifolia*. Foi avaliada a diversidade genética de 11 progênies de polinização dirigida, incluindo a progênie de autopolinização dirigida de uma planta monóica, e de seis progênies de polinização livre, incluindo progênies de três plantas monóicas de *A. angustifolia*. Para isto, foram utilizados oito locos microssatélites para genotipar os indivíduos. As progênies de polinização dirigida e as progênies de polinização livre de plantas monóicas de *A. angustifolia* tem elevado potencial para o melhoramento genético, pois têm alta diversidade genética, embora em menor grau que progênies de polinização livre de plantas dióicas da espécie.

Palavras-chave: araucária, marcadores microssatélites, melhoramento genético.

**GENETIC DIVERSITY IN ARTIFICIAL AND OPEN POLLINATION PROGENIES
OF *Araucaria angustifolia***

ABSTRACT

The Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze) is an endemic species to southern and southeastern Brazil and is currently considered endangered. Thus, genetic diversity studies become important to promote conservation and breeding of the species. The objective of this study was to determine the genetic diversity generated in artificial and open pollination progenies of dioecious and monoecious *A. angustifolia*. The genetic diversity was assessed in eleven artificial pollinated progenies, including the progeny of artificial selfing of the monoecious tree, and six open pollinated progenies, including progenies of the three monoecious *A. angustifolia*. For this, eight microsatellite loci were used to genotype individuals. The artificial pollination progenies and the open pollinated progenies of the monoecious *A. angustifolia* have high potential for genetic improvement, as they have high genetic diversity, although to a lesser degree than open pollination progenies of dioecious trees.

Key-words: Brazilian pine, microsatellites markers, genetic improvement.

5.1 INTRODUÇÃO

A araucária (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae)) é uma espécie conífera dióica, raramente monóica, polinizada pelo vento. É endêmica do Sul e Sudeste do Brasil, e em menor área na Argentina e no Paraguai. É a espécie vegetal predominante na Floresta Ombrófila Mista, formação florestal do Bioma Mata Atlântica, que ocupava 18,2 milhões de hectares no Brasil até final do século XIX (Hueck, 1972). Atualmente, está reduzida a menos de 3% da área original (Guerra et al., 2002). No período de 1930 a 1970 houve intensa fragmentação florestal e a madeira da *A. angustifolia* foi um dos principais produtos de exportação do Brasil. Por isto, a araucária está na lista de espécies brasileiras ameaçadas de extinção e o corte de exemplares nativos é proibido (MMA, 2008).

A diversidade genética representa o potencial de uma população para produzir diferentes genótipos. Por isto, ela é fundamental para o melhoramento genético, pois possibilita a seleção, e para a sobrevivência, adaptação e evolução das espécies, especialmente sob mudanças ambientais (Rajora e Pluhar, 2003; Isagi et al., 2007).

Muitos autores descreveram a diversidade genética existente em *A. angustifolia*. Previamente, reportou-se a existência de diversidade em características de crescimento de progênies de polinização livre de diferentes regiões (Gurgel, 1965) e a descrição de nove variedades que se diferenciavam pela época de amadurecimento e coloração da semente (Reitz e Klein, 1966). A grande área de distribuição geográfica da araucária (19°15' a 30° S e 41°20' a 54° W) contribuiu para esta diversidade. Na última década, os estudos de diversidade genética de araucária foram conduzidos utilizando marcadores moleculares. Na maioria destes estudos verificou-se a ocorrência de ampla diversidade genética entre e dentro de populações naturais. Porém, também foi demonstrada a fragilidade das futuras gerações da espécie, devido aos efeitos de deriva genética (redução do tamanho efetivo, aumento da endogamia e perda de alelos) após a ampla fragmentação das populações (Auler et al., 2002; Medri et al., 2003; Bittencourt e Sebbenn, 2007; Stefenon et al., 2007; Stefenon et al., 2008a; Bittencourt e Sebbenn, 2009; Souza et al., 2009). Assim, é urgente a implantação de estratégias de conservação e melhoramento genético da araucária no Brasil.

O melhoramento genético da *A. angustifolia* ainda é incipiente e alguns problemas genéticos nos testes de progênies foram detectados. Shimizu (1999) verificou que para a produtividade de madeira houve mudanças substanciais na posição hierárquica entre as

procedências de araucária ao longo de 23 anos do plantio. Pelos resultados deste trabalho, a seleção precoce para esta característica se torna ineficaz. Sebbenn et al. (2003) observaram que a obtenção de progênies de polinização aberta de várias famílias e procedências não proporcionou ganhos genéticos significativos (<4,9%) para diâmetro, altura e volume de madeira avaliada aos 21 anos do plantio, devido a baixa herdabilidade dos caracteres (<0,15). Em *A. cunninghamii*, espécie da Austrália e Papua Nova Guiné, Nikles (1980) relatou ganhos genéticos superiores de volume de madeira e retidão do tronco em progênies de polinização dirigida em relação às progênies de polinização livre. No caso da *A. angustifolia* também a obtenção de progênies de polinização dirigida pode ser utilizada como alternativa para aumentar os ganhos genéticos de características de interesse em programas de melhoramento genético.

A metodologia de obtenção de progênies de polinização dirigida em *A. angustifolia* foi descrita em Anselmini e Zanette (2012). Ainda é necessário verificar a diversidade genética gerada nestas progênies, de forma a determinar seu potencial para o melhoramento genético. Para isso, foi muito importante o desenvolvimento de marcadores microssatélites específicos para *A. angustifolia*, efetuados por Salgueiro et al. (2005) e Schmidt et al. (2007), pois possibilitam a avaliação de diversidade, endogamia e fluxo gênico, que são parâmetros genéticos importantes ao melhoramento e conservação da espécie.

O objetivo deste trabalho foi determinar a diversidade genética gerada em progênies de polinização dirigida e de polinização livre de plantas dióicas e monóicas de *A. angustifolia*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram coletadas acículas de 321 indivíduos adultos e juvenis de *A. angustifolia*. Os indivíduos juvenis representavam 11 progênies de polinização dirigida e seis progênies de polinização livre de três plantas dióicas e de três plantas monóicas de araucária e os indivíduos adultos representavam os genitores de cada progênie (mais detalhes descritos no capítulo II).

Após coleta, as acículas foram liofilizadas e armazenadas em freezer (-20°C) até o momento do isolamento do DNA. Este foi realizado seguindo protocolo descrito no capítulo I.

O DNA de cada amostra foi quantificado e diluído com água milli-Q autoclavada a uma concentração final de $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$.

Análises genéticas

Realizaram-se as PCRs do DNA das amostras, utilizando oito *primers* microssatélites em combinações bplex ou tríplex, seguido de detecção dos fragmentos por eletroforese capilar, em sequenciador automático ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). O tamanho dos fragmentos (alelos) foi determinado pela interpretação dos picos dos eletroferogramas gerados, utilizando o software GeneMapper v.4.1 (Applied Biosystems). Os números referentes ao tamanho dos alelos foram exportados para planilhas (mais detalhes destas análises são descritos no capítulo II).

Análises estatísticas

Para as análises de diversidade genética foram utilizados dados de tamanho de alelos de 314 indivíduos, pois para sete indivíduos não foi possível determinar o tamanho dos alelos.

A magnitude da diversidade genética foi caracterizada pela estimativa do número de alelos por locos (A), heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e) em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). O nível de endogamia foi estimado usando o índice de fixação (F). A significância do valor de F foi calculada usando 1.000 reamostragens por permutação e foi aplicada a correção sequencial de Bonferroni para múltiplas comparações ($\alpha = 0,05$). A diferenciação genética entre as progênes foi calculada pelo índice de Weir e Cockerham (1984). Os parâmetros foram estimados usando o programa FSTAT, v.2.9.3.2. (Goudet, 2002). O intervalo de confiança das estimativas a 95% de probabilidade foi calculado através de reamostragem *jackknife*.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas adultas dióicas tiveram número de alelos (A), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) significativamente maior em relação às plantas monóicas de *A. angustifolia*, demonstrando maior diversidade genética (Tabela 1). Os locos Ag23, Aang01,

Aang14, Aang28 e As90 apresentaram os maiores valores destes parâmetros, mesmo no caso das plantas monóicas, demonstrando serem de alta utilidade em análises de diversidade genética de *A. angustifolia*. O loco As90 foi desenvolvido para *A. subulata* e não apresentou resultados satisfatórios, não sendo publicado dentre os locos recomendados por Robertson et al. (2004). Porém, a transferibilidade deste loco para *A. angustifolia* já havia sido comprovada por Bittencourt e Sebbenn (2007).

O loco Ag45 apresentou valores de H_e e H_o inferiores a 0,5, para ambos os tipos de plantas, sugerindo que este loco não apresenta diversidade satisfatória para contribuir na caracterização da diversidade genética de *A. angustifolia*. Para as plantas monóicas, os locos Ag45, Ag20 e CRCAc1 apresentaram valor de H_e e H_o de 0,25, o que indica alto número de homozigotos nestes locos, o que reduziu a diversidade genética. Ainda assim, na média dos oito locos, as plantas monóicas apresentaram elevada diversidade genética.

Tabela 1. Diversidade genética e índice de fixação de árvores adultas dióicas (5 femininas e 6 masculinas) e monóicas de *Araucaria angustifolia*.

Locos	Dióicas (N = 11)			
	A	H_o	H_e	F
Ag20	4	0,54	0,52	-0,05
Ag23	5	0,82	0,65	-0,25
Ag45	2	0,36	0,31	-0,18
Aang01	10	0,82	0,91	0,10
Aang14	9	1,00	0,88	-0,14
Aang28	9	1,00	0,88	-0,13
As90	5	0,73	0,77	0,05
CRCAc1	3	0,54	0,45	-0,21
Média (IC 95%)	5,87 (5,29 – 6,43)	0,73 (0,69 – 0,78)	0,67 (0,64 – 0,72)	-0,084
Total	47			
Locos	Monóicas (N = 4)			
	A	H_o	H_e	F
Ag20	2	0,25	0,25	0,00
Ag23	2	0,75	0,50	-0,50
Ag45	2	0,25	0,25	0,00
Aang01	6	0,75	0,92	0,18
Aang14	4	1,00	0,79	-0,26
Aang28	6	0,75	0,92	0,18
As90	5	1,00	0,83	-0,20
CRCAc1	2	0,25	0,25	0,00
Média (IC 95%)	3,62 (3,29 – 3,86)	0,62 (0,57 – 0,68)	0,59 (0,54 – 0,64)	-0,062
Total	29			

A é o número de alelos; H_o é a heterozigosidade observada; H_e é a heterozigosidade esperada; F é o índice de fixação.

Embora na maioria dos locos e na média, a H_o foi maior em relação a H_e , tanto nas plantas dióicas quanto das monóicas, esta diferença não foi significativa, como pode ser verificado pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade. Assim, não há excesso ou falta de heterozigotos em relação ao esperado em equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) nos locos utilizados. O índice de fixação (F) não foi significativo em nenhum dos locos, tanto para plantas adultas dióicas como monóicas.

Os indivíduos juvenis de progênes de polinização dirigida tiveram número de alelos significativamente menor, mas H_o e H_e semelhante aos juvenis de progênes de polinização livre de *A. angustifolia*. Isto demonstra o potencial de geração de diversidade genética das polinizações dirigidas (Tabela 2).

Tabela 2. Diversidade genética e índice de fixação de juvenis de progênes de polinização dirigida (exceto autofecundação PF_3 x PF_3) e de polinização livre de *Araucaria angustifolia*.

Locos	Juvenis de polinização dirigida (N = 174)			
	A	H_o	H_e	F
Ag20	4	0,48	0,47	-0,023
Ag23	5	0,73	0,62	-0,175*
Ag45	2	0,22	0,27	0,194*
Aang01	9	0,87	0,81	-0,067*
Aang14	9	0,88	0,82	-0,067*
Aang28	9	0,95	0,86	-0,108*
As90	5	0,76	0,70	-0,092*
CRCAc1	3	0,40	0,38	-0,029
Média (IC 95%)	5,75 (5,29 – 6,29)	0,66 (0,62 – 0,72)	0,62 (0,58 – 0,67)	-0,070*
Total	46			
Locos	Juvenis de polinização livre (N = 107)			
	A	H_o	H_e	F
Ag20	6	0,53	0,51	-0,034
Ag23	6	0,78	0,71	-0,099*
Ag45	3	0,35	0,34	-0,042
Aang01	17	0,86	0,90	0,049
Aang14	16	0,87	0,84	-0,040
Aang28	11	0,80	0,84	0,042
As90	7	0,77	0,78	0,023
CRCAc1	3	0,45	0,42	-0,062
Média (IC 95%)	8,62 (7,43 – 9,43)	0,68 (0,65 – 0,72)	0,67 (0,64 – 0,72)	-0,012
Total	69			

A é o número de alelos; H_o é a heterozigosidade observada; H_e é a heterozigosidade esperada; F é o índice de fixação. *Significância ($P \leq 0,05$) baseada em 4.160 permutações.

Comparado aos adultos, os juvenis apresentaram maior número de alelos, principalmente no caso das progênes de polinização livre. Isto ocorreu mesmo com a

inclusão das progênies de três plantas monóicas de *A. angustifolia*, as quais tem possibilidade de autofecundação, que foi comprovada pela obtenção de sementes férteis na polinização dirigida de uma planta monóica (PF_3 x PF_3). Isto se justifica devido ao maior número de doadores de pólen que contribuem com alelos para progênies de polinização livre, enquanto as progênies de polinização dirigida tem apenas um genitor masculino. Bittencourt e Sebbenn (2007) detectaram 12,6 doadores de pólen por árvore materna de *A. angustifolia* em um fragmento florestal de 5,4 ha. Já Bittencourt e Sebbenn (2008) detectaram 6,4 doadores de pólen por árvore materna de araucária em uma área de 14 ha pertencentes a uma floresta contínua. Assim, a coleta de sementes seguida de formação e avaliação das progênies de polinização livre apresenta grande potencial para o melhoramento genético de *A. angustifolia*, devido a grande diversidade genética observada. Mesmo assim, também se observou elevada diversidade genética nas progênies de polinização dirigida avaliadas, também demonstrando elevado potencial para o melhoramento.

Novamente os locos Ag23, Aang01, Aang14, Aang28 e As90 se destacaram com maior diversidade genética detectada, em ambas as progênies, assim como observado nas plantas adultas. Por outro lado, o loco Ag45, seguido do loco CRCAC1, foram os locos que apresentaram menores valores de A , H_o e H_e em relação aos demais, em ambas as progênies, denotando a baixa diversidade dos indivíduos genotipados para estes locos.

O índice de fixação (F) foi negativo e significativo na maioria dos locos (exceto Ag20, Ag45 e CRCAC1) e na média dos locos das progênies de polinização dirigida, o que denota a presença de excesso de heterozigotos. Este efeito foi verificado, pois a H_o foi maior que a H_e . Isto também ocorreu em apenas um loco (Ag23) das progênies de polinização livre, para os demais locos a na média dos locos o valor de F não foi significativo. Apenas no loco Ag45 as progênies de polinização dirigida apresentaram valor de F positivo e significativo, demonstrando excesso de homozigotos. Porém, isto é efeito do baixo número de alelos do loco, apenas dois, sendo que em muitos indivíduos um dos alelos estava fixado.

Os indivíduos juvenis de progênies de polinização livre de plantas dióicas tiveram maior diversidade genética em relação às progênies de plantas monóicas de *A. angustifolia*, com valores de A , H_e e H_o significativamente maiores, conforme denota o intervalo de confiança a 95% de probabilidade (Tabela 3).

Os locos Ag23, Aang01, Aang14, Aang28 e As90 foram os que mais contribuíram para a diversidade genética. Por outro lado, os locos Ag45, CRCAC1 e Ag20 apresentaram baixa diversidade, principalmente nas progênies de plantas monóicas. Bittencourt e Sebbenn (2007, 2008) também observaram que os locos Ag45 e CRCAC1 apresentaram os menores

número de alelos e H_o e H_e em relação aos demais locos testados para *A. angustifolia*. No caso do loco CRCAc1, Scott et al. (2003) demonstraram que as sequências flaqueadoras deste loco, desenvolvido para *A. cunninghamii*, são extremamente conservadas e que a baixa variação deste loco evidencia sua associação com regiões gênicas, que estariam sob forte pressão seletiva contra mutações.

Tabela 3. Diversidade genética e índice de fixação de juvenis de progênies de polinização livre de plantas dióicas e de plantas monóicas de *Araucaria angustifolia*.

Locos	Juvenis de polinização livre de plantas dióicas (N = 53)			
	A	H_o	H_e	F
Ag20	5	0,70	0,66	-0,051
Ag23	6	0,96	0,77	-0,250*
Ag45	3	0,49	0,46	-0,074
Aang01	14	0,98	0,87	-0,129*
Aang14	15	1,00	0,86	-0,169*
Aang28	11	1,00	0,86	-0,158*
As90	5	0,89	0,76	-0,147*
CRCAc1	3	0,66	0,53	-0,253*
Média (IC 95%)	7,75 (6,86 – 8,43)	0,83 (0,81 – 0,88)	0,72 (0,70 – 0,76)	-0,156*
Total	62			
Locos	Juvenis de polinização livre de plantas monóicas (N = 54)			
	A	H_o	H_e	F
Ag20	4	0,37	0,32	-0,164
Ag23	5	0,61	0,63	0,029
Ag45	3	0,22	0,20	-0,105
Aang01	12	0,74	0,87	0,152*
Aang14	10	0,74	0,80	0,077
Aang28	8	0,61	0,78	0,213*
As90	6	0,67	0,78	0,150*
CRCAc1	3	0,24	0,29	0,179*
Média (IC 95%)	6,37 (5,57 – 6,71)	0,53 (0,49 – 0,57)	0,58 (0,54 – 0,64)	0,102*
Total	51			

A é o número de alelos; H_o é a heterozigiosidade observada; H_e é a heterozigiosidade esperada; F é o índice de fixação. *Significância ($P \leq 0,05$) baseada em 4.160 permutações.

O potencial da polinização livre em gerar heterozigiosidade nas progênies de *A. angustifolia* novamente foi comprovado, uma vez que foram observados valores de A e H_o significativamente maiores nas progênies de plantas dióicas em relação às árvores genitoras. No caso das progênies de polinização livre de plantas monóicas o A foi significativamente maior, embora a H_o foi menor em relação às árvores genitoras (Tabela 3).

Os valores de F foram significativos para seis dos oito locos e para quatro dos oito locos para progênies de polinização livre de plantas dióicas e monóicas, respectivamente,

assim como para a média dos locos em ambas as progênies. Porém, todos os valores significativos foram negativos no caso das progênies de plantas dióicas, sugerindo excesso de heterozigotos, e foram positivos para as progênies de plantas monóicas, sugerindo excesso de homozigotos (Tabela 3). Isto é um indício da geração de endogamia através de cruzamentos entre parentes e/ou autofecundação nas plantas monóicas de *A. angustifolia*. A veracidade desta hipótese deve ser verificada através do estudo do sistema de reprodução destas plantas (ver capítulo IV).

Índices de fixação (F) positivos e significativos já foram detectados em populações naturais e plantadas de *A. angustifolia* (Auler et al., 2002; Bittencourt e Sebbenn, 2007, 2008, 2009; Schmidt et al., 2007; Stefenon et al., 2007, 2008a; Sant'Anna, 2011; Ferreira et al., 2012), demonstrando que pode haver endogamia devido a cruzamentos entre indivíduos parentes. Este efeito não foi detectado em uma população bem conservada e de alta diversidade genética em Campos do Jordão-SP (Mantovani et al., 2006; Patreze e Tsai, 2010). Altos índices de fixação (níveis de endogamia) não são esperados em espécies dióicas ou predominantemente de cruzamento, como é a araucária, devido ao fato de que a depressão endogâmica tende a eliminar plantas endogâmicas entre a fase de fertilização e a fase adulta (Gribel e Gibbs 2002; Hufford e Hamrick 2003; Naito et al., 2008). No caso da *A. angustifolia*, assim como para outras coníferas, são observados múltiplos embriões (poliembriõnia) nos estágios iniciais de desenvolvimento da semente. Entretanto, na maioria das vezes, um único embrião dominante sobrevive e dá origem à planta, enquanto os demais embriões são eliminados através da morte programada das células. Este processo de determinação do embrião dominante ainda não está bem esclarecido. Uma hipótese formulada é de que um embrião com determinada constituição genética seria favorecido, tornando-se dominante, através de mecanismos de seleção natural (Agapito-Tenfen et al., 2011).

A detecção de excesso de homozigotos (valor de F positivo e significativo) pode ser efeito da ocorrência de alelos nulos e/ou alelos dominantes (Nybom, 2004), sendo que a presença deste tipo de alelos é difícil de demonstrar, requerendo experimentos específicos (Morand et al., 2002). Porém, no presente experimento, a falta de indivíduos homozigotos para alelos nulos (falta total de amplificação) em locos específicos, indica que é improvável que alelos nulos estejam presentes e afetando o nível da H_o . Além disso, pelo menos um alelo maternal foi detectado em todos os indivíduos e em todos os locos utilizados na análise de segregação (capítulo II), não havendo evidência de herança não mendeliana devido à presença de alelos dominantes.

A endogamia diminui a heterozigosidade, ou seja, a riqueza alélica da população, o que em curto prazo pode causar redução no desempenho e da viabilidade individual e em longo prazo pode limitar a habilidade da espécie para responder a mudanças ambientais e incrementar a susceptibilidade a pragas e doenças e a fixação de alelos deletérios. Isto ocorre principalmente em espécies que sofreram fragmentação intensa do habitat original (Isagi et al., 2007). A perda de diversidade genética e o aumento da endogamia em populações fragmentadas em comparação às populações bem conservadas foram detectados em *A. angustifolia* (Auler et al., 2002; Medri et al., 2003; Stefenon et al., 2007; Bittencourt e Sebbenn, 2009; Souza et al., 2009). No caso da *A. angustifolia* a endogamia pode ser gerada nos indivíduos das progênies apenas por cruzamentos entre genitores com algum nível de parentesco, por ser uma espécie dióica (Sebbenn, 2006). No caso das araucárias monóicas, a endogamia também pode ser gerada pela autofecundação.

Considerando as progênies individualmente, na média dos oito locos, observa-se que todas as progênies de polinização livre, exceto a progênie de MN_Ara, apresentaram número de alelos (A) significativamente superior a todas as progênies de polinização dirigida. A progênie de PF_3 x PF_3 (autofecundação dirigida) foi a que apresentou menor valor de A dentre todas as progênies. Na maioria dos casos, os valores de H_o foram significativamente superiores a H_e nas progênies de polinização dirigida e livre de plantas dióicas. Não houve diferença significativa entre estes dois índices para as progênies de polinização livre das três plantas monóicas, enquanto para a progênie de PF_3 x PF_3 a H_o foi significativamente menor que H_e (Tabela 4).

Os valores de F foram negativos e significativos para todas as progênies de polinização dirigida e livre de plantas dióicas, o que sugere que está ocorrendo seleção a favor de embriões heterozigotos. O valor de F da progênie de PF_3 x PF_3 foi positivo e significativo, o que era esperado por se tratar de uma autofecundação dirigida desta planta monóica, já que a autofecundação gera pelo menos 50% de endogamia a cada geração. As progênies de polinização livre de plantas monóicas não apresentaram valor de F significativo, indicando que em polinização livre as plantas monóicas privilegiam os cruzamentos, para evitar a depressão endogâmica (Tabela 4).

O valor médio de Theta (Weir e Cockerham, 1984) foi de 0,159, demonstrando que há 15,9% de diferenciação entre as progênies. Assim, testes de progênies devem ser realizados devido o elevado potencial que as progênies apresentam para o melhoramento genético.

Tabela 4. Diversidade genética (média de oito locos microssatélites) de cada uma das progênie de polinização dirigida e de polinização livre de plantas dióicas e monóicas de *Araucaria angustifolia*.

Progênie	<i>n</i>	<i>A</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F</i>
PF_3 x PB_1	18	2,75 (2,57 – 2,86)	0,69 (0,65 – 0,74)	0,55 (0,52 – 0,58)	-0,266*
PF_3 x Gua_1	17	2,63 (2,43 – 2,86)	0,57 (0,51 – 0,66)	0,51 (0,47 – 0,58)	-0,125*
PF_3 x Lg_Galpão	18	2,75 (2,57 – 2,86)	0,68 (0,63 – 0,74)	0,56 (0,53 – 0,59)	-0,213*
PF_Social x PB_1	17	3,13 (3,00 – 3,29)	0,79 (0,76 – 0,85)	0,63 (0,61 – 0,67)	-0,262*
PF_Solos x PB_1	17	3,13 (3,00 – 3,43)	0,79 (0,76 – 0,90)	0,59 (0,56 – 0,67)	-0,341*
PF_Solos x Lg_Horta	16	2,88 (2,71 – 3,14)	0,72 (0,68 – 0,82)	0,52 (0,49 – 0,60)	-0,375*
PF_Fazenda x Lg_5	18	2,63 (2,43 – 2,71)	0,65 (0,60 – 0,68)	0,54 (0,51 – 0,57)	-0,194*
PF_Fazenda x Gua_2	17	2,38 (2,14 – 2,57)	0,54 (0,47 – 0,61)	0,42 (0,37 – 0,48)	-0,284*
PF_1 x Lg_Horta	18	2,50 (2,29 – 2,71)	0,60 (0,54 – 0,68)	0,46 (0,42 – 0,53)	-0,290*
PF_3 x Lg_Horta	18	2,50 (2,29 – 2,57)	0,59 (0,53 – 0,63)	0,48 (0,44 – 0,51)	-0,233*
PF_3 x PF_3	18	1,88 (1,86 – 2,00)	0,36 (0,34 – 0,41)	0,44 (0,43 – 0,50)	0,175*
Pinha_400	18	5,50 (4,86 – 6,00)	0,76 (0,72 – 0,80)	0,62 (0,60 – 0,66)	-0,212*
PF_Fazenda	17	4,75 (4,43 – 5,00)	0,87 (0,85 – 0,91)	0,68 (0,66 – 0,72)	-0,273*
PF_Social	18	5,50 (4,86 – 6,00)	0,87 (0,86 – 0,94)	0,73 (0,71 – 0,76)	-0,202*
MN_Ara	18	3,13 (2,86 – 3,43)	0,47 (0,42 – 0,54)	0,43 (0,39 – 0,50)	-0,088
MN_SD	18	4,13 (3,86 – 4,57)	0,53 (0,49 – 0,61)	0,51 (0,48 – 0,58)	-0,052
MN_Gua	18	4,38 (4,00 – 4,71)	0,57 (0,55 – 0,62)	0,57 (0,54 – 0,62)	-0,007
Theta			0,159 (0,142 – 0,176)		

() = intervalo de confiança a 95% de probabilidade determinado por reamostragem *jackknife* sobre locos.

*Significância ($P \leq 0,05$) baseada em 4.160 permutações.

Vários autores já efetuaram a caracterização da diversidade genética por marcadores microssatélites em populações naturais de *A. angustifolia* (Salgueiro et al., 2005; Bittencourt e Sebbenn, 2007, 2008, 2009; Schmidt et al., 2007; Stefenon et al., 2007; Patreze e Tsai, 2010; Sant'Anna, 2011), demonstrando importantes resultados para a conservação das populações. Salienta-se que o presente trabalho apresenta resultados de diversidade genética de progênie de polinização dirigida e de progênie de plantas monóicas de *A. angustifolia*, demonstrando seu potencial para o melhoramento genético, parâmetros ainda não descritos na literatura.

As polinizações dirigidas em *A. angustifolia* possibilitam cruzamentos entre genitores escolhidos por características de interesse e também possibilitam utilizar como matrizes ou doadores de pólen as araucárias isoladas em lavouras, pastagens ou áreas urbanas. Isto é importante para aproveitar o conjunto gênico destas plantas, pois suas sementes praticamente não formam indivíduos e as próprias plantas estão sob risco de serem suprimidas, devido ao habitat em que se encontram.

Os resultados obtidos no presente trabalho têm implicações para o desenvolvimento do melhoramento e conservação genética de *A. angustifolia*. As progênie geradas por polinizações dirigidas apresentaram alta diversidade genética, que é a matéria prima para o melhoramento. Por isso, recomenda-se efetuar a formação deste tipo de progênie para

fomentar a formação de bancos de germoplasma e testes de progênies em órgãos públicos de pesquisa. Futuramente, os genótipos selecionados poderão ser utilizados para reflorestamentos comerciais (produção de pinhão e/ou madeira) e ambientais (recomposição de APP e reserva legal), que também serão importantes para a conservação genética *ex situ* da espécie. Neste sentido, Stefenon et al. (2008b) e Ferreira et al. (2012) postularam que florestas plantadas de *A. angustifolia* podem ser úteis para a conservação e melhoramento, devido a alta diversidade genética verificada.

Além disso, as progênies de polinização livre de plantas monóicas também apresentaram alta diversidade genética, embora em menor grau em relação às progênies de polinização livre de plantas dióicas. Conseqüentemente, estas progênies também podem ser utilizadas no melhoramento genético de *A. angustifolia*, principalmente porque as árvores monóicas são raras na natureza. Além disso, as monóicas tem um potencial que as árvores dióicas não têm que é de produzir sementes (pinhão) e pólen na mesma planta. Este potencial pode ser aproveitado para a formação de pomares para comercialização de pinhão, pois todas as plantas serão produtoras. Quando são plantados pinhões de araucárias dióicas, apenas em torno de 50% das plantas serão fêmeas e produzirão pinhões (Guerra et al., 2002). Porém, ainda é necessário verificar se a monoicia é herdável em *A. angustifolia* e se os indivíduos formados serão férteis.

5.4 CONCLUSÕES

As progênies obtidas por polinização dirigida e por polinização livre de plantas monóicas de *Araucaria angustifolia* têm alta diversidade genética, demonstrando elevado potencial para o melhoramento. Isto pode ser aproveitado para testes de progênies e/ou procedências em programas de melhoramento genético da espécie, de forma a aumentar os ganhos genéticos na produção pinhão e/ou de madeira, ou ainda para fins de conservação genética *ex situ* em reflorestamentos ambientais e bancos de germoplasma.

5.5 REFERÊNCIAS

AGAPITO-TENFEN, S.Z.; STEINER, N.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Patterns of polyembryony and frequency of surviving multiple embryos of the Brazilian pine *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**, v.59, p.749-755, 2011.

ANSELMINI, J.I.; ZANETTE, F. Polinização controlada em *Araucaria angustifolia*. **Cerne**, v.18, n.2, p.247-255, 2012.

AULER, N.M.F.; REIS, M.S.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. The genetics conservation of *Araucaria angustifolia*: 1 - genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptative variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.3, p.329-338, 2002.

BITTENCOURT, J.V.M.; SEBBENN, A.M. Patterns of pollen and seeds dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, v.99, 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. **Conservations Genetics**, v.9, p.855-868, 2008.

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

FERREIRA, D.K.; NAZARENO, A.G.; MANTOVANI, A.; BITTENCOURT, R.; SEBBENN, A.M.; 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, 2012.

GOUDET, J. **FSTAT**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne, Switzerland: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, 2002. Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>> Acesso em: 21 ago. 2012.

GRIBEL, R.; GIBBS, P.E. High outbreeding as a consequence of selfed ovule mortality and single vector bat pollination in the Amazonian tree *Pseudobombax munguba* (Bombacaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v.163, n.6, p.1035-1043, 2002.

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

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

HUECK, K. **As florestas da América do Sul: ecologia, composição e importância econômica**. São Paulo: Polígono, 1972. 466p.

HUFFORD, K.M.; HAMRICK, J.L. Viability selection at three early life stages of the tropical tree, *Platypodium elegans* (Fabaceae, Papilionoideae). **Evolution**, v.57, n.3, p.518-526, 2003.

ISAGI, Y.; TATENO, R.; MATSUKI, Y.; HIRAO, A.; WATANABE, S.; SHIBATA, M. Genetic and reproductive consequences of forest fragmentation for populations of *Magnolia obovata*. **Ecological Research**, v.22, p.382-389, 2007.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, 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.

MEDRI, C.; RUAS, P.M.; HIGA, A.R.; MURAKAMI, M.; RUAS, C.F. Effects of forest management on the genetic diversity in a population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Silvae Genetica**, v.52, n.5-6, p.202-205, 2003.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção e com deficiência de dados**. Instrução Normativa 06/2008. Disponível em: <www.mma.gov.br> Acesso em: 10 de outubro de 2010.

MORAND, M.E.; BRACHET, S.; ROSSIGNOL, P.; DUFOUR, J.; FRASCARIA-LACOSTE, N. A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. **Molecular Ecology**, v.11, n.3, p.377-385, 2002.

NAITO, Y.; KANZAKI, M.; IWATA, H.; OBAYASHI, K.; LEE, S.L.; MUHAMMAD, N.; OKUDO, T.; TSUMURA, Y. Density-dependent selfing and its effects on seed performance in a tropical canopy tree species, *Shorea acuminata* (Dipterocarpaceae). **Forest Ecology and Management**, v.256, p.375-383, 2008.

- NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraespecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v.13, n.5, p.1143-1155, 2004.
- NIKLES, D.G. Realized and potential gains from using and conserving genetic resources of *Araucaria*. In: IUFRO Meeting on Forestry Problems of the Genus *Araucaria*, 1., Curitiba, 1979. **Anais...** Curitiba: FUPEF, 1980. p.87-95.
- PATREZE, C.M.; TSAI, S.M. Intrapopulational genetic diversity of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is different when assessed on the basis of chloroplast or nuclear markers. **Plant Systematics and Evolution**, v.284, p.111-122, 2010.
- RAJORA, O.P.; PLUHAR, S.A. Genetic diversity impacts of forest fire, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.1203-1212, 2003.
- REITZ, R.; KLEIN, R.M. **Araucariáceas**. Itajaí: Tipografia e Livraria Blumenauense, 1966. 37p.
- ROBERTSON, A.; HOLLINGSWORTH, P.M.; KETTLE, C.J.; ENNOS, R.A.; GARDNER, M.F. Characterization of nuclear microsatellites in New Caledonia *Araucaria* species. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.62-63, 2004.
- SALGUEIRO, F.; CARON, H.; SOUZA, M.I.F.; KREMER, A.; MARGIS, R. Characterization of nuclear microsatellite loci in South American Araucariaceae species. **Molecular Ecology Notes**, v.5, p.256-258, 2005.
- SANT'ANNA, C.S. **Diversidade genética, estrutura genética espacial e dispersão realizada de pólen e sementes em uma população contínua de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no Planalto Norte de Santa Catarina**. 2011. 89f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 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, p.340-342, 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.

SHIMIZU, J.Y. Variação entre procedências de araucária em Ribeirão Branco (SP) aos vinte e três anos de idade. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.38, p.89-102, 1999.

SEBBENN, A.M.; PONTINHA, A.A.S.; GIANNOTTI, E.; KAGEYAMA, P.Y. Genetic variation in provenance-progeny test of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. in São Paulo, Brazil. **Silvae Genetica**, v.52, n.5-6, p.181-184, 2003.

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

SOUZA, M.I.F.; SALGUEIRO, F.; CARVANALE-BOTTINO, M.; FÉLIX, D.B.; ALVES-FERREIRA, M.; BITTENCOURT, J.V.M.; MARGIS, R. Patterns of genetic diversity in southern and southernwest *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze relict populations. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, n.3, p.546-556, 2009.

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

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, p.356-364, 2008a.

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

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

6 CAPÍTULO IV
EFICIÊNCIA DE POLINIZAÇÕES DIRIGIDAS E AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE
REPRODUÇÃO DE PLANTAS MONÓICAS DE *Araucaria angustifolia*

RESUMO

O conhecimento do sistema de reprodução é de fundamental importância no melhoramento genético, pois afeta os níveis de endogamia e de diversidade genética. A araucária (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze) é uma espécie comumente dióica e se reproduz por cruzamentos, mas há algumas plantas monóicas da espécie, que podem se reproduzir por autofecundação. O objetivo deste trabalho foi confirmar o parentesco esperado de irmãos-completos em progênies de polinização dirigida e determinar o sistema de reprodução de plantas monóicas de *A. angustifolia*. Para isto, foram utilizados oito locos microssatélites para genotipar os indivíduos. O parentesco nas progênies de polinização dirigida é de irmãos-completos, o que confirma as hibridações realizadas. As plantas monóicas têm modo de reprodução por xenogamia, gerando progênies com alta proporção de irmãos de cruzamentos (94-95%) e baixa proporção de irmãos de autofecundação (5-6%).

Palavras-chave: Araucária, marcadores microssatélites, monoícia, taxa de cruzamento.

**ARTIFICIAL POLLINATION EFFICIENCY AND MATING SYSTEM
EVALUATION IN MONOECIOUS TREE OF *Araucaria angustifolia***

ABSTRACT

To know the mating system is important in tree breeding because it affect the inbreeding and genetic diversity. The Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze)) is a species commonly dioecious and reproduces through outcrossing, but there are some trees that are monoecious, that can reproduce by self-fertilization. The objective of this study was to confirm the relatedness expected full-sib in artificial pollination progenies and to determine the mating system of monoecious *A. angustifolia*. For this, eight microsatellite loci were used to genotype individuals. The relatedness in artificial pollination progenies is full-sib, which confirms the crosses made. The monoecious trees are reproductive mode by xenogamy, generating progeny with high proportion of crosses sibs (94-95%) and low proportion of selfing sibs (5-6%).

Key-words: Brazilian pine, microsatellite markers, monoicy, outcrossing rate.

6.1 INTRODUÇÃO

A araucária (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae)) é uma conífera dióica polinizada pelo vento. De forma rara, são encontradas algumas plantas monóicas da espécie, que apresentam ginostrobilos e androstrobilos. Estes exemplares foram primeiramente descritos por Reitz e Klein (1966) no Estado de Santa Catarina. Estes autores indicaram que a causa da monoiccia poderia ser a infecção por patógenos ou outras injúrias na planta adulta. Porém, mais recentemente, Stefenon e Caprestano (2009) observaram que os estrobilos masculinos e femininos e os grãos de pólen das plantas monóicas de araucária tem morfologia igual aos das plantas dióicas, além de não apresentar infecções por fungos.

O sistema de reprodução determina a forma como as plantas recombina seus genes a cada geração para formar a população descendente. Como consequência, afeta os níveis de endogamia e de diversidade genética da espécie. Por isto, o conhecimento do sistema de reprodução é de fundamental importância no melhoramento genético, principalmente para a coleta e produção de sementes melhoradas de espécies florestais (Sebbenn, 2006).

Estudos do sistema de reprodução podem ser conduzidos para conhecer qual é a taxa de cruzamento, taxa de autofecundação, a proporção de cruzamentos entre indivíduos parentes (cruzamentos endogâmicos), ou que envolvem os mesmos parentais mais de uma vez (cruzamentos biparentais), o número de doadores de pólen envolvidos na reprodução de uma planta, a distância de dispersão do pólen e o fluxo gênico entre populações. Tais estudos podem ser eficientemente realizados com a utilização de marcadores moleculares codominantes e altamente polimórficos, como os microssatélites, comparando a planta matriz com sua progênie (Sebbenn, 2006). Nestas análises é necessário também utilizar modelos genéticos para descrever padrões de reprodução, como o modelo misto de cruzamentos (Ritland e Jain, 1981) e o modelo de cruzamentos correlacionados (Ritland, 1989).

O aspecto mais importante para definir o sistema de reprodução de uma espécie é seu sistema sexual. Espécies dióicas (árvores com sexos separados) se reproduzem sempre por cruzamentos. Por outro lado, as plantas monóicas podem apresentar mistura de cruzamentos e autofecundação (Sebbenn, 2006). Os cruzamentos são definidos como xenogamia, ou seja, fertilização de uma flor de uma planta por grãos de pólen de outras plantas. A autofecundação pode ser definida como autogamia, quando o pólen de mesma flor fertiliza seus óvulos, e geitonogamia quando o pólen de uma flor fertiliza outra flor da mesma planta (Finkeldey, 2005). Ressalta-se que os processos que envolvem a transferência de pólen entre diferentes

flores, independente se as flores são da mesma ou de diferentes plantas, é conhecido como alogamia. Por isso, uma planta alógama não necessariamente é de cruzamentos, pois todos os filhos podem ter sido gerados por geitonogamia (Sebbenn, 2006).

No caso das plantas monóicas de *A. angustifolia*, ainda é necessário verificar se a polinização ocorre preferencialmente por geitonogamia ou por xenogamia. A geitonogamia tem mesma consequência genética que a autogamia, pois é uma autofecundação e gera endogamia. Por sua vez, a xenogamia pode gerar maior diversidade genética na progênie, pois pode formar combinações de alelos não existentes nos genitores (Sebbenn, 2006).

O objetivo deste trabalho foi confirmar o parentesco esperado de irmãos-completos em progênies de polinização dirigida e determinar o sistema de reprodução em polinização livre de plantas monóicas de *Araucaria angustifolia*.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram coletadas acículas de 321 indivíduos adultos e juvenis de *A. angustifolia*. Os indivíduos juvenis representavam 11 progênies de polinização dirigida e seis progênies de polinização livre de três plantas dióicas e de três plantas monóicas de araucária e os indivíduos adultos representavam os genitores de cada progênie (mais detalhes descritos no capítulo II).

Após coleta, as acículas foram liofilizadas e armazenadas em freezer (-20°C) até o momento do isolamento do DNA. Este foi realizado seguindo protocolo descrito no capítulo I. O DNA de cada amostra foi quantificado e diluído com água milli-Q autoclavada a uma concentração final de 10 ng μl^{-1} .

Análises genéticas

Realizaram-se as PCRs do DNA das amostras, utilizando oito *primers* microssatélites em combinações biplex ou tríplex, seguido de detecção dos fragmentos por eletroforese capilar, em sequenciador automático ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). O tamanho dos fragmentos (alelos) foi determinado pela interpretação dos picos dos

eletroferogramas gerados, utilizando o software GeneMapper v.4.1 (Applied Biosystems). Os números referentes ao tamanho dos alelos foram exportados para planilhas (mais detalhes destas análises são descritos no capítulo II).

Análises estatísticas

Para as análises de sistema de reprodução foram utilizados dados de tamanho de alelos de 314 indivíduos, pois para sete indivíduos não foi possível determinar o tamanho dos alelos de forma inequívoca.

O sistema de cruzamento foi analisado de acordo com dois modelos: (a) o modelo de cruzamentos mistos, o qual assume que: (1) cada cruzamento representa um evento ao acaso de um cruzamento (t) ou de uma autofertilização (s), com probabilidade igual para t e s ($=1-t$); (2) não ocorre mutação ou seleção após a fertilização até a análise do DNA; (3) não há cruzamentos associados (a probabilidade de um cruzamento é independente do genótipo materno ou paterno) (Ritland e Jain, 1981); e o modelo de cruzamentos correlacionados, em que dois indivíduos de uma progênie podem ter um doador de pólen em comum (irmãos-completos) ou somente o genitor materno em comum (meio-irmãos) (Ritland, 1989).

Foi utilizado o programa MLTR, v.3.4 (Ritland, 2009) para estimar a taxa de cruzamento multilocus (t_m) e unilocus (t_s), taxa de cruzamentos entre indivíduos parentes ($t_m - t_s$), correlação multilocus de paternidade ($r_{p(m)}$) e correlação de autofecundação (r_s). O intervalo de confiança dos parâmetros a 95% foi calculado baseado em 1.000 *bootstraps* entre indivíduos dentro de progênies. O efetivo número de doadores de pólen foi estimado por $N_{ep} = 1/r_{p(m)}$ (Ritland, 1989). A média do coeficiente de coancestria dentro de progênies foi estimada por $\Theta = 0,125 \left(1 + F_p\right) \left[4s + \left(t_m^2 + t_m s r_s\right) \left(1 + r_{pm}\right)\right]$ (Ritland, 1989), em que F_p é o coeficiente de endogamia na geração parental. O tamanho efetivo da variância ($N_{e(v)}$) foi estimado por $N_{e(v)} = 0,5 / \left\{ \Theta \left[(n-1) / n \right] + (1 + F_s) / 2n \right\}$ (Cockerham, 1969), onde F_s é o coeficiente de endogamia das sementes e n é o tamanho da amostra.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para estimativas seguras de parâmetros do sistema de reprodução, Ritland (2002) recomenda utilizar pelo menos 200 indivíduos e vários locos codominantes. Para satisfazer esta premissa, no presente trabalho a amostra foi de 314 indivíduos genotipados para oito locos microssatélites.

Todas as progênies de polinização dirigida e todas as progênies de polinização livre de plantas dióicas de *A. angustifolia* apresentaram taxa de cruzamento multiloco alta e não significativamente ($P \leq 0,05$) diferente da unidade ($t_m = 0,99 \pm 0,01$) (Tabela 1).

Tabela 1. Estimativas do sistema de reprodução de progênies de polinização dirigida e de polinização livre de plantas dióicas e monóicas de *Araucaria angustifolia*.

Progênie	$t_m \pm DP$	$t_s \pm DP$	$t_m - t_s \pm DP$	$r_s \pm DP$	$r_{p(m)} \pm DP$	N_{ep}	Θ	$N_{e(v)}$
PF_3 x PB_1	0,99 ± 0,01	0,95 ± 0,05	0,05 ± 0,05	-	0,99 ± 0,02	1,0	0,250	1,90
PF_3 x Gua_1	0,99 ± 0,01	0,96 ± 0,08	0,04 ± 0,08	-	0,99 ± 0,06	1,0	0,250	1,89
PF_3 x Lg_Galpão	0,99 ± 0,01	0,95 ± 0,05	0,05 ± 0,05	-	0,99 ± 0,07	1,0	0,250	1,90
PF_Social x PB_1	0,99 ± 0,01	0,97 ± 0,03	0,03 ± 0,03	-	0,99 ± 0,05	1,0	0,250	1,89
PF_Solos x PB_1	0,99 ± 0,01	0,99 ± 0,01	0,01 ± 0,02	-	0,99 ± 0,05	1,0	0,250	1,89
PF_Solos x Lg_Horta	0,99 ± 0,01	0,98 ± 0,04	0,02 ± 0,04	-	0,99 ± 0,02	1,0	0,250	1,88
PF_Fazenda x Lg_5	0,99 ± 0,01	0,95 ± 0,06	0,04 ± 0,06	-	0,99 ± 0,07	1,0	0,250	1,90
PF_Fazenda x Gua_2	0,99 ± 0,01	0,98 ± 0,06	0,02 ± 0,06	-	0,99 ± 0,01	1,0	0,250	1,89
PF_1 x Lg_Horta	0,99 ± 0,01	0,99 ± 0,01	0,00 ± 0,01	-	0,99 ± 0,01	1,0	0,250	1,90
PF_3 x Lg_Horta	0,99 ± 0,01	0,99 ± 0,08	0,01 ± 0,08	-	0,99 ± 0,06	1,0	0,250	1,90
PF_3 x PF_3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,99 ± 0,01	0,99 ± 0,01	1,0	0,500	1,00
Pinha_400	0,99 ± 0,01	0,97 ± 0,03	0,02 ± 0,03	-	0,13 ± 0,05	7,9	0,142	3,09
PF_Fazenda	0,99 ± 0,01	0,97 ± 0,02	0,02 ± 0,01	-	0,20 ± 0,07	5,1	0,151	2,92
PF_Social	0,99 ± 0,01	0,95 ± 0,01	0,04 ± 0,01	-	0,14 ± 0,05	7,4	0,143	3,08
MN_Ara	0,94 ± 0,01	0,70 ± 0,08	0,24 ± 0,08	0,05 ± 0,02	0,29 ± 0,02	3,4	0,172	2,63
MN_SD	0,94 ± 0,01	0,76 ± 0,05	0,18 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,03	9,8	0,153	2,91
MN_Gua	0,95 ± 0,01	0,71 ± 0,07	0,24 ± 0,07	0,06 ± 0,02	0,12 ± 0,04	8,7	0,152	2,92

DP é o desvio padrão, baseado em 1.000 *bootstraps*.

Este padrão é esperado para progênies de polinização livre de espécies dióicas e foi observado por vários autores em populações naturais e plantadas de *A. angustifolia* (Sousa et al., 2005; Bittencourt e Sebbenn, 2008; Ferreira et al., 2012). Porém, Mantovani et al. (2006) detectaram taxa de cruzamentos alta ($t_m = 0,956$), mas significativamente menor que a unidade, em uma população natural de *A. angustifolia* de Campos do Jordão-SP. Estes autores atribuíram a observada endogamia à ocorrência de cruzamentos entre indivíduos parentes.

A progênie de polinização dirigida de PF_3 x PF_3 apresentou t_m não diferente de zero ($0,00 \pm 0,00$), o que era esperado, uma vez que foi realizada uma autofecundação dirigida desta planta monóica. Por sua vez, as progênies de polinização livre de três plantas monóicas de *A. angustifolia* apresentaram t_m de $0,94 \pm 0,01$ e $0,95 \pm 0,01$, sendo significativamente diferente da unidade. Isto significa que estas plantas tem um sistema de reprodução combinando autofecundações e cruzamentos, porém com alta predominância de cruzamentos, ou seja, modo de reprodução por xenogamia (Tabela 1).

A taxa de cruzamento uniloco (t_s) foi significativamente menor do que a taxa de cruzamento multiloco apenas nas progênies de polinização livre da planta dióica PF_Social e das três plantas monóicas. Em concordância, a diferença entre a taxa de cruzamento multiloco e uniloco ($t_m - t_s$) para estas plantas foi significativamente diferente de zero ($P \leq 0,05$), o que indica cruzamento entre parentes (Ritland, 2002). Portanto, a presente estimativa indica que $4 \pm 1\%$, $24 \pm 8\%$, $18 \pm 5\%$ e $24 \pm 7\%$ dos cruzamentos que formaram as progênies de polinização livre das plantas PF_Social, MN_Ara, MN_SD e MN_Gua, respectivamente, ocorreram com doadores de pólen parentes destas plantas.

Desvios de cruzamentos ao acaso, devido a cruzamentos entre parentes e cruzamentos biparentais têm sido reportados em populações naturais e plantadas de *A. angustifolia* (Sousa et al., 2005; Mantovani et al., 2006; Bittencourt e Sebbenn, 2007, 2008; Sant'Anna, 2011; Ferreira et al., 2012). Estes acasalamentos entre parentes se devem a ocorrência de estrutura genética espacial (EGE), a qual foi detectada em populações naturais de *A. angustifolia* em diferentes distâncias: até 70 m (Mantovani et al., 2006), até 50 m (Bittencourt e Sebbenn, 2007), até 75 m (Bittencourt e Sebbenn, 2008), até 25 m (Patreze e Tsai, 2010) e até 20 m (Sant'Anna, 2011). A EGE de *A. angustifolia* ocorre porque a autocoria (dispersão por mecanismos próprios da planta) é a principal forma de dispersão de sementes da espécie, e devido seu grande tamanho e peso as sementes caem próximo da planta materna (Carvalho, 2003). Como a araucária é uma espécie longeva (pode atingir mais de 200 anos) ela apresenta sobreposição de gerações possibilitando o cruzamento de indivíduos com seus genitores, por exemplo, o que é favorecido em pequenos fragmentos florestais pelo reduzido tamanho populacional. Além disso, o grão de pólen de *A. angustifolia* é de tamanho grande ($61,5 \mu\text{m}$), não apresenta saco aerífero e tem baixa taxa de flutuação ($12,02$ a $18,98 \text{ cm s}^{-1}$), atingindo rapidamente o solo. Estas características aliadas à alta densidade típica das florestas com araucária podem comprometer a dispersão do pólen a grandes distâncias, favorecendo os cruzamentos entre parentes (Sousa e Hattemer, 2003). Porém, Bittencourt e Sebbenn (2007) detectaram que, apesar da dispersão do pólen ser concentrada a curtas distâncias (75-80% da

efetiva polinização ocorre até 150 m), houve fluxo de pólen entre árvores distantes 2006 m entre si.

A correlação de autofecundação (r_s) foi estimada apenas para as árvores monóicas de *A. angustifolia*, as quais tem possibilidade de fazer autofecundação por geitonogamia. Todas apresentaram r_s significativamente diferente de zero. A progênie de PF_3 x PF_3 apresentou r_s não diferente da unidade ($r_s = 0,99 \pm 0,01$), como era esperado, uma vez que todos os indivíduos foram gerados por autofecundação dirigida. Valor alto de r_s indica que em progênies onde se encontra um indivíduo de autofecundação é alta a probabilidade de encontrar outro também de autofecundação (Ritland, 1989). Para as progênies das plantas MN_Ara, MN_SD e MN_Gua estas estimativas são de $5 \pm 2\%$, $6 \pm 1\%$ e $6 \pm 2\%$, respectivamente.

A correlação multilocos de paternidade ($r_{p(m)}$) foi significativamente diferente de zero ($P \leq 0,05$) para todas as progênies. Para todas as progênies de polinização dirigida $r_{p(m)}$ não diferiu significativamente da unidade, o que era esperado, uma vez que foi utilizado apenas um genitor masculino. No caso das progênies de polinização livre, tanto de plantas dióicas como das monóicas, este valor variou de 0,10 a 0,29, não diferindo significativamente entre si, exceto no caso da progênie de MN_Ara que apresentou valor significativamente maior que as demais progênies de polinização livre ($r_{p(m)} = 0,29 \pm 0,02$), representando que 29% dos indivíduos desta progênie são irmãos-completos.

A correlação de paternidade resulta de cruzamentos biparentais ou correlacionados (não aleatórios), devido ao restrito número de doadores de pólen contribuindo efetivamente na polinização. Isto gera uma proporção de irmãos completos dentro das progênies e, conseqüentemente, gera endogamia (Ritland, 1989). A causa dos cruzamentos biparentais em *A. angustifolia* pode ser atribuída a fatores como a falta de sincronia no florescimento, variação na fecundidade masculina e pequeno número de indivíduos masculinos próximos às matrizes (Mantovani et al., 2004; Anselmini et al., 2006). Além disso, Sousa et al. (2005) verificaram que quanto maior era a densidade de árvores na população, maior era a taxa de cruzamentos correlacionados, provavelmente devido à limitação na dispersão do pólen. Outros autores verificaram correlação de paternidade significativa em populações naturais e plantadas de *A. angustifolia* variando de 0,03 a 0,602 (Sousa et al., 2005; Mantovani et al., 2006; Bittencourt e Sebbenn, 2007, 2008; Ferreira et al., 2012).

Da correlação de paternidade estimou-se o número de doadores de pólen (N_{ep}). Como era esperado, as progênies de polinização dirigida apresentaram $N_{ep} = 1$, pois foi utilizado pólen de apenas um genitor. As progênies de polinização livre de plantas dióicas

apresentaram N_{ep} de 5,1 a 7,9. As progênies das plantas Pinha_400 e PF_Social apresentaram maior número de doadores de pólen, demonstrando o elevado fluxo de pólen que ocorreu na área urbana de Caçador-SC e Curitiba-PR, na qual estas plantas estão localizadas, respectivamente. Provavelmente, isto ocorre porque as araucárias ficam dispersas em baixa densidade na área urbana, facilitando o fluxo de pólen, inclusive de grandes distâncias. Para as progênies de polinização livre de plantas monóicas o N_{ep} foi menor para a progênie de MN_Ara ($N_{ep} = 3,4$), de Aratiba-RS, a qual está localizada em uma área com baixa ocorrência da espécie, em que há poucos indivíduos masculinos próximos, em uma altitude de 546 m. As progênies das outras duas plantas monóicas apresentaram os maiores valores de N_{ep} dentre as progênies de polinização livre, sendo de 9,8 e 8,7 para MN_SD e MN_Gua, respectivamente. O número de doadores de pólen por árvore materna detectados por outros autores em populações naturais e/ou plantadas de *A. angustifolia* foi altamente variável, sendo de 2,2 a 31,2 (Sousa et al., 2005; Mantovani et al., 2006; Bittencourt e Sebbenn, 2007, 2008; Ferreira et al., 2012).

O coeficiente médio de coancestria entre indivíduos dentro de progênies (Θ) foi de 0,25 em todas as progênies de polinização dirigida, demonstrando o nível de parentesco de irmãos completos dentro das progênies. Isto demonstra que o procedimento descrito por Anselmini e Zanette (2012), do isolamento do ginostrobilo de *A. angustifolia* com saco plástico, antes da sua abertura (no mês de agosto), foi eficiente para evitar a contaminação de pólen externo à polinização dirigida. A progênie de PF_3 x PF_3 apresentou $\Theta = 0,5$, comprovando a efetividade da autofecundação dirigida desta planta monóica. As progênies de polinização livre apresentaram coancestria variando de 0,142 a 0,151 e de 0,152 a 0,172, para progênies de plantas dióicas e monóicas, respectivamente. Estes valores são superiores ao esperado em progênies de populações panmíticas, com nível de parentesco de meio-irmãos ($\Theta = 0,125$), demonstrando que as progênies são formadas pela mistura de meio-irmãos e irmãos completos. Isto se deve aos cruzamentos entre parentes e cruzamentos biparentais que ocorreram para formação das progênies das plantas dióicas e aos cruzamentos entre parentes, cruzamentos biparentais e autofecundações que ocorreram para a formação das progênies de plantas monóicas de *A. angustifolia*, o que aumentou o grau de parentesco entre os indivíduos das progênies. Outros autores detectaram coeficientes de coancestria positivos e significativamente diferentes de zero, para progênies e adultos de populações naturais e plantadas de *A. angustifolia*, variando de 0,076 a 0,20 (Sousa et al., 2005; Bittencourt e Sebbenn, 2007, 2008; Patreze e Tsai, 2010; Ferreira et al., 2012).

Portanto, verificou-se que nas progênies de polinização livre de plantas monóicas de *A. angustifolia* foi gerada endogamia por cruzamentos entre parentes (em maior grau) e por autofecundação. A autofecundação gera 50% de endogamia a cada geração e o cruzamento entre parentes gera endogamia igual ao coeficiente de coancestria entre os indivíduos cruzados. Como pode ser inferido, coancestria e endogamia são parâmetros intimamente relacionados, pois só haverá alelos idênticos por descendência em um indivíduo da progênie (endogamia) se houver identidade por descendência entre os alelos presentes nos dois parentais (coancestria) (Sebbenn, 2006). Apesar de não haver estudos sobre depressão endogâmica em *A. angustifolia* acredita-se que ela ocorre e produz o mesmo efeito que aqueles detectados em outras coníferas, como a deterioração geral do vigor e a mortalidade dos indivíduos endogâmicos nas fases iniciais de desenvolvimento. A grande maioria dos indivíduos endogâmicos não chega a idade reprodutiva, pois as coníferas apresentam alelos recessivos letais, que eliminam os embriões de autofecundação (Savolainen et al., 1992; Sorensen et al., 1999; Williams et al., 2001).

Em função do valor de coancestria, o tamanho efetivo de variância também foi menor do que o esperado em progênies de meios-irmãos ($N_{e(v)} = 4$). Os maiores valores de $N_{e(v)}$ foram obtidos nas progênies de polinização livre, sendo o maior $N_{e(v)} = 3,09$ na progênie de Pinha_400. Estes valores são semelhantes aos encontrados por outros autores em populações naturais e plantadas de *A. angustifolia*, variando de 2,50 a 3,77 (Sousa et al., 2005; Bittencourt e Sebbenn, 2007, 2008; Ferreira et al., 2012).

Os resultados do presente trabalho têm implicações para as estratégias de coleta de sementes para a conservação *ex situ* e melhoramento genético de *A. angustifolia*. Considerando que as progênies de polinização livre de plantas dióicas apresentaram a maioria dos indivíduos com parentesco de meio-irmãos, recomenda-se colher sementes para uso em reflorestamentos, contribuindo para a conservação genética *ex situ* de *A. angustifolia*. Pelos resultados observados de tamanho efetivo da variância é necessário coletar sementes de 32 a 34 árvores ($m = 100/N_{e(v)}$) de polinização livre de plantas dióicas, para reter um tamanho efetivo de 100, que é o objetivo de programas de conservação genética *ex situ* e melhoramento genético de espécies florestais (Sebbenn, 2003). Resultados semelhantes foram encontrados por Bittencourt e Sebbenn (2008), que verificaram que para reter o tamanho efetivo de 100 é necessário coletar sementes de 31 árvores de *A. angustifolia* na população estudada. Os resultados deste trabalho também demonstraram que as árvores isoladas na área urbana são importantes para a conservação e diversidade genética da espécie. Bittencourt e Sebbenn (2007, 2009) também detectaram a importância de conservar pequenos grupos e

araucárias isoladas na paisagem para promover o fluxo de pólen, reduzir a coancestria e endogamia, e aumentar o tamanho efetivo da variância.

O vigor híbrido gerado nas progênes de polinizações dirigidas poderá permitir a seleção de indivíduos superiores na produção de pinhão e/ou madeira, representando elevado potencial para o melhoramento genético. Por sua vez, as progênes de polinização livre de plantas monóicas de *A. angustifolia* apresentam a predominância de indivíduos de cruzamentos, em relação aos indivíduos de autofecundação, indicando que podem ser usadas para coleta de sementes para implantação de reflorestamentos de conservação genética e melhoramento.

O maior número de plantas de cruzamentos encontradas na progênie de plantas monóicas pode ser devido à eliminação dos embriões de autofecundação na seleção embrionária que ocorre nos estágios iniciais de desenvolvimento da semente da araucária, em que há vários embriões e apenas um sobrevive e dá origem à planta (Agapito-Tenfen et al., 2011). Na maioria dos casos, pode ter ocorrido de embriões oriundos de cruzamentos serem escolhidos como dominantes, em detrimento dos embriões oriundos de autofecundação. Outro fator que pode ter causado a baixa taxa de plantas oriundas de autofecundação é a menor quantidade de androstróbilos das plantas monóicas em relação às plantas dióicas (masculinas). Isto acarreta em menor quantidade de pólen produzido nas araucárias monóicas e, conseqüentemente, menor chance de ocorrer a autopolinização dos ginostrobilos.

6.4 CONCLUSÕES

O parentesco nas progênes de polinização dirigida é de irmãos completos, o que confirma as hibridações realizadas em *Araucaria angustifolia*. Isto comprova a eficiência da metodologia de isolamento com saco plástico dos ginostrobilos, antes de sua abertura, para evitar a contaminação de pólen não desejado.

Em polinização livre, as araucárias monóicas estudadas apresentaram modo de reprodução por xenogamia, gerando progênes com alta proporção de irmãos de cruzamentos (94-95%) e baixa proporção de irmãos de autofecundação (5-6%). Assim, estas progênes tem baixa endogamia e podem ser utilizadas em testes de progênes em programas de melhoramento genético.

6.5 REFERÊNCIAS

AGAPITO-TENFEN, S.Z.; STEINER, N.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Patterns of polyembryony and frequency of surviving multiple embryos of the Brazilian pine *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**, v.59, p.749-755, 2011.

ANSELMINI, J.I.; ZANETTE, F.; BONA, C. Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, na região de Curitiba – PR. **Floresta e Ambiente**, v.13, n.1, p.44-52, 2006.

ANSELMINI, J.I.; ZANETTE, F. Polinização controlada em *Araucaria angustifolia*. **Cerne**, v.18, n.2, p.247-255, 2012.

BITTENCOURT, J.V.M.; SEBBENN, A.M. Patterns of pollen and seeds dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, v.99, 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. **Conservations Genetics**, v.9, p.855-868, 2008.

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

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1039p.

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

FERREIRA, D.K.; NAZARENO, A.G.; MANTOVANI, A.; BITTENCOURT, R.; SEBBENN, A.M.; 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, 2012.

FINKELDEY, R. **An introduction to tropical forest genetics**. Göttingen: Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, 2005. 241p.

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

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.

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

REITZ, R.; KLEIN, R.M. **Araucariáceas**. Itajaí: Tipografia e Livraria Blumenauense, 1966. 37p.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Heredity**, v.47, p.35-52, 1981.

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

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using independent loci. **Heredity**, v.72, p.86-94, 2002.

RITLAND, K. **MLTR for Windows** - Version 3.4 (November 2009). Disponível em: <<http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>> Acesso em: 12 mar. 2011.

SANT'ANNA, C.S. **Diversidade genética, estrutura genética espacial e dispersão realizada de pólen e sementes em uma população contínua de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no Planalto Norte de Santa Catarina**. 2011. 89f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SAVOLAINEN, O.; KARKKAINEN, K.; KUITTINEN, H. Estimating numbers of embryonic lethals in Conifers. **Heredity**, v.69, p.308-314, 1992.

SEBBENN, A.M. Tamanho amostral para conservação *ex situ* de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Revista do Instituto Florestal**, v.15, p.109-124, 2003.

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

SORENSEN, F.C. Relationship between self-fertility, allocation of growth, and inbreeding depression in three coniferous species. **Evolution**, v.53, n.2, p.417-425, 1999.

SOUSA, V.A.; HATTEMER, H.H. Pollen dispensal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**, v.51, p.309-317, 2003.

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

STEFENON, V.M.; CAPRESTANO, C.A. Monoicy in *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae): I. Morphological aspects of the reproductive structures. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.81, n.4, p.701-704, 2009.

WILLIAMS, C.G.; ZHOU, Y.; HALL, S.E. Chromosomal region promoting outcrossing in a conifer. **Genetics**, v.159, p.1283-1289, 2001.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente trabalho permitiram apontar as seguintes conclusões:

1. O protocolo estabelecido foi eficiente no isolamento de DNA de *Araucaria angustifolia* de boa qualidade e é uma opção mais rápida e mais barata que os protocolos descritos na literatura para a espécie. Com isso, o protocolo pode se tornar uma ferramenta eficiente nas análises de DNA, que são necessárias para estudos visando definir estratégias de conservação e melhoramento genético da araucária.

2. Os oito locos microssatélites (Ag20, Ag23, Ag45, Aang01, Aang14, Aang28, As90 e CRCAC1) apresentaram segregação Mendeliana em todas as progênies testadas de *Araucaria angustifolia*. Por isso, estes locos podem ser usados como marcadores genéticos em estudos de diversidade genética, análise de parentesco e fluxo gênico da espécie.

3. As progênies obtidas por polinização dirigida e por polinização livre de plantas monóicas de *Araucaria angustifolia* têm alta diversidade genética, demonstrando elevado potencial para o melhoramento. Isto pode ser aproveitado para testes de progênies e/ou procedências em programas de melhoramento genético da espécie, de forma a aumentar os ganhos genéticos na produção pinhão e/ou de madeira, ou ainda para fins de conservação genética *ex situ* em reflorestamentos ambientais e bancos de germoplasma.

4. O parentesco nas progênies de polinização dirigida é de irmãos completos, o que confirma as hibridações realizadas em *Araucaria angustifolia*. Isto comprova a eficiência da metodologia de isolamento com saco plástico dos ginostrobilos, antes de sua abertura, para evitar a contaminação de pólen não desejado.

5. Em polinização livre, as araucárias monóicas estudadas apresentaram modo de reprodução por xenogamia, gerando progênies com alta proporção de irmãos de cruzamentos (94-95%) e baixa proporção de irmãos de autofecundação (5-6%). Assim, estas progênies tem baixa endogamia e podem ser utilizadas para testes de progênies em programas de melhoramento genético.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A araucária (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.) é uma espécie de importância ecológica, cultural e econômica, principalmente no Sul do Brasil. Esta espécie foi a base do ciclo econômico da madeira nesta região, durante o século XX, mas sem o planejamento de cortes seletivos e sem a necessária reposição através de plantios, este ciclo terminou aproximadamente em 1970, e a espécie foi substituída na indústria madeireira por espécies exóticas, principalmente dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*. Atualmente a araucária é considerada ameaçada de extinção, em função da drástica redução populacional ocorrida e da baixa taxa de regeneração natural, aliada ao envelhecimento e morte de árvores em ambiente florestal. Por isso, a legislação brasileira atual proíbe o corte de araucárias nativas.

Os plantios de araucária com fins econômicos são escassos, o que se deve principalmente à indisponibilidade de sementes e/ou mudas de genótipos selecionados. Por isso, são necessários trabalhos de seleção e melhoramento genético na espécie, visando obter genótipos com alta produtividade de pinhões e/ou madeira e visando a produção de sementes e mudas de alta qualidade genética. Duas situações fortalecem a afirmativa acima: (1) são observadas muitas araucárias nativas ou plantadas que apresentam alta produção de pinhões ou de madeira; (2) as espécies dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus* apresentam mais de cem anos de melhoramento genético no mundo, sendo que isto foi preponderante para atingir altos níveis de produtividade e, conseqüentemente, aumentar os plantios destas espécies, que hoje são base da indústria madeireira no Brasil.

A produção de pinhões em plantios de araucária pode gerar maior renda que a produção de madeira, pois a produção de pinhões ocorre anualmente, enquanto o corte da madeira pode ser realizado uma vez só. Para os plantios devem ser escolhidos genótipos de alta produção, fazer a propagação por enxertia e utilizar espaçamento de plantio de 10 x 10 m, para dar maior espaço de desenvolvimento às plantas. Estes plantios da araucária para produção de pinhões podem se tornar uma ferramenta para o uso e a conservação da espécie, pois atualmente os pinhões comercializados no Sul do Brasil são oriundos do extrativismo em matas nativas, o que pode prejudicar a regeneração natural da araucária. Ao mesmo tempo a renda gerada com a comercialização de pinhões de plantios de araucária pode se tornar importante para fortalecer o desenvolvimento territorial de uma região.

Visando gerar conhecimento para o desenvolvimento do cultivo da araucária, realizam-se vários estudos no Setor de Ciências Agrárias da UFPR (Universidade Federal do

Paraná). Dentre eles destaca-se o estabelecimento de protocolos de micropropagação (microenxertia) e macropropagação (enxertia e estaquia), a investigação do tropismo no crescimento dos ramos (plagiotropismo e ortotropismo), estudos de fenologia reprodutiva e o estabelecimento de um protocolo de polinizações dirigidas.

Apesar de vários estudos realizados, o desenvolvimento do melhoramento genético da araucária ainda é incipiente. Os resultados apresentados na presente tese de doutorado podem auxiliar no desenvolvimento de programas de melhoramento genético de *A. angustifolia*.

No capítulo I, o trabalho realizado permitiu gerar um protocolo eficiente no isolamento de DNA de *A. angustifolia*, pois foi obtido DNA livre de substâncias de interferência e amplificável através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). O custo por amostra foi menor em relação aos protocolos descritos na literatura e o maior avanço deste trabalho foi a redução do tempo gasto no isolamento do DNA da espécie, pois foi possível suprimir o uso de reagentes que demandam maior tempo para utilização durante o processo de isolamento, reduzindo o número de etapas no processo. Isto é importante, pois permite aumentar o número de amostras a serem analisadas, dando maior confiabilidade aos resultados de pesquisas. Com isso, o protocolo pode se tornar uma ferramenta eficiente nas análises de DNA, que são necessárias para estudos visando definir estratégias de conservação e melhoramento genético da araucária.

No capítulo II foi testada a segregação genética de oito locos microssatélites (Ag20, Ag23, Ag45, Aang01, Aang14, Aang28, As90 e CRCAC1) em progênies de *A. angustifolia*. Como resultado observou-se que todos os oito locos apresentaram segregação Mendeliana em todas as progênies testadas. Por isso, estes oito marcadores moleculares podem ser usados como marcadores genéticos em estudos de genética de populações de araucária, como análises de diversidade genética, análise de parentesco e fluxo gênico.

No capítulo III foi comparada a diversidade genética gerada em progênies de polinização dirigida e em progênies de polinização livre de araucárias monóicas com a diversidade genética gerada em progênies de polinização livre de araucárias dióicas. Para isso foram utilizados os oito marcadores microssatélites testados no capítulo II. Como resultados observou-se que as progênies de polinização dirigida tiveram índices de diversidade genética semelhante às progênies de polinização livre de plantas dióicas. Isto demonstra o elevado potencial da utilização da polinização dirigida no melhoramento genético da araucária, uma vez que gera progênies com ampla variabilidade genética, capaz de permitir a efetividade de seleção de genótipos superiores e o avanço de grande número de gerações de melhoramento. As progênies obtidas por polinização livre de plantas monóicas de *A. angustifolia* também

tiveram alta diversidade genética, embora em menor nível que a diversidade genética de progênies de polinização livre de araucárias dióicas. Isto demonstra que as sementes de plantas monóicas de araucária podem ser coletadas para formar progênies para serem testadas no melhoramento genético da espécie. Uma restrição à sua utilização é o pequeno número de plantas monóicas existentes, uma vez que a ocorrência destas araucárias é rara.

O potencial de diversidade genética de progênies de polinização livre de plantas dióicas de araucária já havia sido demonstrado na literatura, porém não havia informações sobre a diversidade genética de progênies de polinização dirigida e nem de progênies de polinização livre de plantas monóicas de araucária. Assim, os resultados encontrados nesta tese podem ser aplicados em programas de melhoramento genético de *A. angustifolia*, pois demonstraram que progênies de polinização dirigida e progênies de polinização livre de araucárias monóicas podem ser utilizadas em testes de progênies. Estas progênies podem contribuir para aumentar os ganhos genéticos em características de interesse, os quais tem sido baixos em características de crescimento das plantas quando foram realizados com progênies de polinização livre de plantas dióicas, como foi verificado em alguns trabalhos descritos na literatura. Estas progênies também podem ser utilizadas para fins de conservação genética *ex situ* em reflorestamentos ambientais e bancos de germoplasma.

No capítulo IV foi verificado o grau de parentesco em progênies de polinização dirigida e em progênies de polinização livre de araucárias monóicas, utilizando os marcadores microsatélites citados acima. Os resultados indicaram que o grau de parentesco em todas as progênies de polinização dirigida é de irmãos completos (coeficiente de coancestria de 0,25), o que confirma as hibridações realizadas em *A. angustifolia*. A confirmação dos híbridos é muito importante para o melhoramento genético da espécie, pois comprova a efetividade da metodologia de isolamento dos ginostrobilos para evitar a contaminação de pólen não desejado durante o processo de polinização dirigida. Para isso, os ginostrobilos foram cobertos com saco plástico do período anterior à sua abertura (no mês de agosto) até ter passado o período de polinização (no mês de novembro).

Outro resultado encontrado foi de que as progênies de polinização livre das araucárias monóicas estudadas apresentaram modo de reprodução por xenogamia, pois houve alta proporção de irmãos de cruzamentos (94-95%) e baixa proporção de irmãos de autofecundação (5-6%). Por outro lado, foi obtida uma progênie da planta monóica PF_3, originada da polinização com pólen da própria planta, sendo confirmado o grau de parentesco esperado de irmãos de autofecundação (coeficiente de coancestria de 0,5). Isto confirma a viabilidade de geração de sementes férteis através da autofecundação de plantas monóicas,

mas o que se observou em polinização livre é que ocorre alta taxa de cruzamentos na formação de sementes destas araucárias. Isto pode ser devido à baixa quantidade de androstróbilos e, conseqüentemente, baixa quantidade de pólen produzido nas araucárias monóicas, em relação às dióicas. Ou ainda pode ser por seleção natural em favor de embriões de cruzamentos, em detrimento dos embriões de autofecundação, na seleção embrionária que ocorre nos estágios iniciais de desenvolvimento da semente, na qual até quatro embriões são formados, mas apenas um sobrevive até a maturação da semente. Dessa forma, pelo baixo índice de autofecundação observado, as progênies de polinização livre de plantas monóicas apresentam baixa taxa de endogamia e podem ser utilizadas no melhoramento genético. Salienta-se que ainda não havia informações na literatura sobre o sistema de reprodução de plantas monóicas de *A. angustifolia* e que os resultados demonstrados na presente tese trazem importante contribuição no entendimento da forma de polinização das araucárias monóicas e seu potencial para o melhoramento genético.

Os resultados desta tese também demonstraram que as araucárias localizadas na área urbana geraram progênies de polinização livre com alta diversidade genética, o que as torna importantes para a conservação genética da espécie e podem ser alvo de coleta de sementes para testes no melhoramento genético. Os marcadores microssatélites utilizados para confirmar as polinizações dirigidas realizadas em *A. angustifolia* foram eficientes, permitindo distinguir de forma eficaz os híbridos. Denota também que a metodologia de polinizações dirigidas, desenvolvida anteriormente em outra tese de doutorado do Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal da UFPR, foi uma ferramenta eficiente e pode ser utilizada em programas de melhoramento genético da araucária.

A obtenção da progênie de autopolinização dirigida da planta monóica PF_3 foi realizada para testar se haveria produção de sementes viáveis. Porém, não se recomenda sua utilização no melhoramento genético, em função da endogamia gerada, a qual pode inviabilizar a sobrevivência de indivíduos. No entanto, das sementes obtidas desta autopolinização dirigida foi possível a geração de mudas, as quais apresentaram desenvolvimento inicial normal. Deve-se seguir com as avaliações destas mudas no campo, para verificar a taxa de sobrevivência e crescimento das mesmas em relação às demais progênies obtidas, pois pode haver depressão endogâmica nos indivíduos desta progênie.

Todas as progênies obtidas e avaliadas nesta tese foram plantadas na Fazenda Experimental da UFPR, sob supervisão do professor Dr. Flávio Zanette, e serão avaliadas periodicamente quanto ao comportamento de crescimento em altura e diâmetro, e futuramente quanto à produção de pinhões. Este teste de progênies será efetuado para verificar o

desempenho dos indivíduos para características de interesse até a idade adulta. Os indivíduos que se mostrarem superiores serão selecionados e propagados por enxertia para utilização em plantios comerciais.

Um programa de melhoramento genético de espécies florestais compreende fundamentalmente as seguintes etapas: formação da população base do melhoramento; seleção de árvores superiores para formar uma nova população, com base em testes de progênie e procedência; formação de novos testes de progênies (avanço de gerações) e instalação de pomares clonais para produção de sementes melhoradas. Abaixo é descrita uma proposta de melhoramento genético para *A. angustifolia*, baseada nos resultados desta tese e em programas de melhoramento genético realizados no Brasil para espécies florestais, descritos na literatura.

Primeiramente deve-se formar a população base para o programa de melhoramento, através da seleção massal (fenotípica). Para isso, deve ser efetuada a coleta de sementes de polinização livre de araucárias em ambientes florestais naturais ou florestas plantadas e também de araucárias isoladas na paisagem ou em pequenos grupos de árvores. A coleta de sementes deve ser realizada de pelo menos 10 árvores de bom desenvolvimento ou produção de pinhões em cada povoamento escolhido, os quais devem representar toda a área de distribuição natural da araucária nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. O número de árvores selecionadas deve ser expressivo (superior a 100) para propiciar ampla base genética. Duas árvores coletadas na mesma localidade devem estar distantes mais de cem metros entre si, para evitar o parentesco. A população base do melhoramento pode ser instalada em 3 a 5 instituições de pesquisa.

Das sementes coletadas devem ser produzidas as mudas em viveiro, as quais serão utilizadas para os testes de progênies e procedências (geração F_1), com plantio de milhares de mudas no campo e instalados em 5 a 10 locais (representando diferentes regiões ecológicas da ocorrência da araucária). Nestes testes será avaliado o potencial da população base para o melhoramento, com a obtenção de parâmetros genéticos, como variabilidade genética, herdabilidade de características e interação genótipo/ambiente, os quais interferem nas estratégias de seleção. Também será efetuada a seleção individual entre e dentro de progênies, com a escolha de árvores superiores em alguma característica de interesse. As árvores não selecionadas devem ser eliminadas e as árvores que permanecerem terão maior espaço para se desenvolver, gerando uma área de produção de sementes melhoradas.

Das árvores selecionadas serão coletadas sementes para a formação de um novo teste de progênie (geração F_2) e também as árvores serão clonadas por enxertia para formação de

pomares clonais. Para formar estes pomares é importante a seleção de árvores masculinas e femininas, de forma a possibilitar a produção de sementes. Os pomares clonais devem ser instalados em cada Estado de ocorrência da araucária, se transformando em bancos de germoplasma para conservação genética, mas servindo também para testes de clones (os que se destacarem podem ser utilizados em plantios comerciais) e para produção de sementes melhoradas (para dar origem a novos testes de progênies ou para serem utilizadas em plantios comerciais de araucária). Nestes pomares clonais também devem ser efetuadas polinizações dirigidas entre os diferentes clones para obter progênies para serem testadas. Assim, em cada geração, as árvores selecionadas poderão ser usadas para produção de sementes melhoradas. Esta estratégia de melhoramento, intercalando vias sexuadas e assexuadas, possibilita ganhos substanciais e contínuos, mantém a variabilidade da população em seleção e evita o estreitamento da base genética. Estes fatores possibilitam avançar um maior número de gerações de melhoramento através de seleções recorrentes e utilizar a variabilidade existente para selecionar um grande número de características de interesse. As áreas de produção de sementes devem ser certificadas (para garantir a origem genética) e originar as sementes a serem utilizadas para plantios comerciais.

Alternativamente, também poderão ser clonados por enxertia aqueles genótipos selecionados inicialmente, incluindo genótipos masculinos para doação de pólen, de forma a acelerar a formação de pomares clonais para produção de sementes melhoradas. Também devem ser realizadas polinizações dirigidas entre genótipos masculinos e femininos selecionados e as sementes obtidas devem dar origem às progênies que serão submetidas à testes de progênies. Neste sentido, o número de progênies de diferentes polinizações dirigidas testadas pode ser de 50 a 100, das quais os indivíduos serão alvo de seleção, assim como nas progênies de polinização livre. Podem ser utilizadas também polinizações dirigidas interespecíficas entre *A. angustifolia* e *A. araucana* para testes de suas progênies. Acredita-se que as polinizações dirigidas deverão ter um papel preponderante no melhoramento genético da araucária, para ampliar os ganhos genéticos em características de interesse, uma vez que as progênies de polinização livre têm apresentado baixos ganhos genéticos em características de crescimento, como observado em trabalhos da literatura.

As características fenotípicas selecionáveis em todas as etapas podem ser: sobrevivência, altura, diâmetro, volume de madeira, qualidade da madeira, quantidade de pinhões produzida, número de pinhas produzidas, idade do primeiro florescimento, época de maturação dos pinhões, resistência às doenças e pragas, resistência a fatores abióticos (geada e déficit hídrico), adaptabilidade ao local de plantio, etc. As características de crescimento

podem ser avaliadas desde os primeiros anos, mas as características de produção de pinhão podem ser avaliadas apenas após o primeiro florescimento (que ocorre após o 10° a 15° ano do plantio da araucária). Se for testada a resistência dos genótipos às doenças, é necessário efetuar estes testes através da inoculação do patógeno em condições controladas.

Para a obtenção de pomares clonais para produção de sementes melhoradas da araucária, a técnica de propagação vegetativa por enxertia será de primordial importância. Atualmente, ainda há algumas dificuldades para utilizar a técnica de enxertia em araucária, devido às suas características de tropismo. A espécie apresenta ramos plagiotrópicos (de crescimento lateral) e ortotrópicos (de crescimento vertical). Pelos testes já realizados no Setor de Ciências Agrárias da UFPR e por outros trabalhos disponíveis na literatura, observou-se que quando é enxertado um ramo plagiotrópico (de mais fácil acesso na planta), o crescimento da muda enxertada permanecerá plagiotrópico e não será formada uma planta normal de araucária. Além disso, os ramos plagiotrópicos enxertados apresentam tempo de vida limitado, com senescência após o terceiro ou quarto ano de crescimento. Já os ramos ortotrópicos enxertados apresentam um crescimento normal verticalizado e, por isso, devem ser utilizados nas enxertias. Porém, a obtenção de ramos ortotrópicos de plantas adultas é dificultada, pois deve ser obtida de brotações ao longo do tronco, as quais apenas algumas plantas apresentam, ou do ponteiro da planta adulta, o qual é de difícil acesso. Além disso, o crescimento ativo do meristema apical (do ponteiro) é limitado até os 70 anos da araucária, ou seja, araucárias de idade superior a esta, não apresentam meristema disponível para coleta de ramos ortotrópicos. A obtenção de ramos ortotrópicos pode ser induzida através da poda do ponteiro, sendo que as brotações originadas podem ser utilizadas para enxertia após 12 meses da poda, como verificado na literatura. Mais testes devem ser desenvolvidos para tentar superar este problema e facilitar a obtenção de grande número de mudas de araucária pela técnica de enxertia.

Para auxiliar no programa de melhoramento, também devem ser alvo de pesquisas a conservação de sementes, a coleta e conservação de pólen, a herdabilidade das características de interesse, a produção de mudas *in vitro* e o desenvolvimento de marcadores moleculares para serem utilizados em seleção assistida de características de importância. Também as técnicas silviculturais devem ser mais bem estudadas, incluindo fatores como adubação, desrama, espaçamento de plantio, desbaste, etc. Além disso, devem ser desenvolvidos programas de incentivos fiscais para quem plantar a araucária, com doação de mudas de boa qualidade genética e assistência técnica gratuita, além de criação de legislação ambiental que dê segurança jurídica para os agricultores efetuarem plantios comerciais da araucária, por ser

uma espécie nativa. O interesse das indústrias da madeira na araucária também deve ser fomentado, uma vez que o interesse no uso da madeira será o propulsor no desenvolvimento do melhoramento genético da espécie.

Deve-se salientar que os ciclos de melhoramento para a araucária são longos, uma vez que a produção de sementes pode demorar de 10 a 15 anos do plantio de mudas oriundas de sementes, embora nas araucárias clonadas por enxertia este período pode ser menor (6 a 10 anos). Outro fator que pode dificultar é a grande área necessária para plantios da espécie, uma vez que o espaçamento a ser utilizado é grande (7 x 7 m ou 8 x 8 m).

Embora deva haver uma instituição atuante e que impulse o programa de melhoramento genético da araucária proposto acima, devem atuar em conjunto vários órgãos de pesquisa governamentais e empresas privadas do setor florestal. Também devem atuar em conjunto melhoristas, fitotecnistas e fitopatologistas, de forma a efetuar a seleção de genótipos superiores através de ferramentas adequadas. Uma proposta semelhante para desenvolver o melhoramento genético de *A. angustifolia* foi debatida e descrita nos anais do “Encontro da IUFRO sobre problemas florestais do gênero Araucaria”, realizado de 21 a 28 de outubro de 1979, em Curitiba-PR. Embora sejam encontrados na literatura alguns resultados de testes de progênies de *A. angustifolia*, a proposta de melhoramento genético não foi desenvolvida integralmente e poucos foram os avanços, mesmo após mais de 30 anos da realização do encontro citado acima. Certamente isto comprova que os esforços para desenvolver este programa de melhoramento de araucária deverão ser grandes e com amplos investimentos, pois certamente grandes dificuldades deverão ser superadas.

Os resultados da presente tese geraram informações importantes para fomentar o melhoramento genético da *A. angustifolia*, conforme discutido acima. Porém, mais estudos devem ser feitos de forma a desenvolver maior número de polinizações dirigidas em *A. angustifolia*, e continuar a avaliação das progênies em campo. Deve-se dar prioridade para a formação de bancos de germoplasma clonais e de testes de progênies de polinizações dirigidas e de polinização livre, instalados em universidades e outras instituições públicas e privadas. Com isso, espera-se desenvolver o melhoramento genético, selecionar indivíduos superiores e aumentar os plantios de araucária. Como resultado indireto espera-se gerar a conservação genética da *A. angustifolia*, uma espécie florestal brasileira de alto potencial econômico e importância ambiental para a Floresta com Araucária.