

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRÍCIA MICHELE DA LUZ

BIOLOGIA REPRODUTIVA E GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *BARBACENIA
PARANAENSIS* L.B.SM. (VELLOZIACEAE), ESPÉCIE ENDÊMICA E AMEAÇADA
DE EXTINÇÃO NO PARANÁ.

CURITIBA – PR

2014

PATRÍCIA MICHELE DA LUZ

BIOLOGIA REPRODUTIVA E GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *BARBACENIA
PARANAENSIS* L.B.SM. (VELLOZIACEAE), ESPÉCIE ENDÊMICA E AMEAÇADA
DE EXTINÇÃO NO PARANÁ.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Botânica, no Programa de Pós-Graduação Botânica, Área de Concentração em Taxonomia e Diversidade (Fanerógamas e Pteridófitas), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Viviane da Silva Pereira
Co-orientador: Dr. Eric de Camargo Smidt

CURITIBA

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Botânica



**"BIOLOGIA REPRODUTIVA E GENÉTICA DE
POPULAÇÕES DE *BARBACENIA PARANAENSIS*
L.B.SM. (VELLOZIACEAE), ESPÉCIE ENDÊMICA E
AMEAÇADA DE EXTINÇÃO NO PARANÁ"**

por

PATRÍCIA MICHELE DA LUZ

Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão
formada pelos Professores

Profa. Dra. Viviane da Silva-Pereira (UFPR)- PRESIDENTE

Profa. Dra. Samantha Koehler (UNIFESP)

Profª Drª Isabela Galarda Varassin (UFPR)

Curitiba, 21 de maio de 2014.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, por todas as oportunidades e bençãos recebidas na hora certa durante esse período.

A minha família pelo apoio e compreensão nos momentos alegres e também nos mais difíceis, especialmente aos meus pais: Cleci e Ademir, minhas avós Eulália e Lourdes. Minha irmã Lidiane e minha linda sobrinha Aryane, contribuindo nos momentos de descontração.

A minha orientadora Professora Doutora Viviane da Silva Pereira, e co-orientador Dr. Eric Camargo Smidt pela paciência, ensino e compreensão das minhas dificuldades. Meu querido namorado e futuro ecólogo Lincoln José Michalski por ter me acompanhado com muita disposição, dedicação e total apoio em todos os momentos, principalmente nos perrengues. Por sua adorável companhia nas viagens (sempre com aquela trilha sonora). Pelo auxílio em todas as coletas do material genético e por toda ajuda nas saídas de campo independente das condições climáticas. Obrigada pelo companheirismo incondicional.

Ao botânico Leonardo Von Lisingen que gentilmente me guiou na Reserva Particular do Patrimônio Natural Vale do Corisco.

A todos os proprietários que permitiram minha entrada em suas propriedades particulares. Principalmente ao seu Leonardo e a senhora Joli que sempre me receberam com carinho e foram muito prestativos durante todos meus campos.

Meus amigos: Dárcio Rundvalt, Bruno Kubis, Mathias Engles, Sheguek Myamoto, Mônica Bolson, Laylla Coelho, Shirley Feuerstein, Thuane Bochorny, Eduardo Lozano, e aos meus tios Mário e Mari da Luz pela companhia e auxílio em algumas saídas de campo.

Ao guia turístico Manoel Serino pela ajuda na procura de *Barbacenia paranaensis* na região de Tibagi.

À Prefeitura Municipal de Tibagi por fornecer apoio logístico do centro da cidade até as localidades de coleta.

À Cleusa Bona e Poliana Cardoso que ajudaram muito na parte de anatomia, a contribuição de vocês foi essencial para esse trabalho.

A toda equipe do laboratório de filogenia, principalmente Mônica Bolson, Anna

Victória Maud, Duane Fernandes, Patrícia Gomes, Fabrício Meyer e Suellen Giovanni que me auxiliaram no início da rotina de laboratório. Obrigada por todos “quebras galhos” do laboratório e boas conversas entre as longas corridas dos géis. Vocês foram importantes nessa etapa.

A equipe de entomologia pela identificação dos insetos e auxílio na montagem dos insetos, principalmente ao professor Dr. Gabriel Augusto Rodrigues de Melo, Bruno Ferrari e ao Dr. Caio Graco Machado pela identificação do beija-flor.

Ao técnico Nilson pelo auxílio em toda parte prática no laboratório de botânica estrutural.

A técnica Alessandra Santos e Israel pelas fotos de microscopia de epifluorescência.

A secretária da pós-graduação Lucimara Albuquerque, sempre auxiliando em toda parte burocrática com muita eficiência e total disposição.

A todos os colegas do Laboratório de Sistemática Vegetal pelo apoio e aprendizado diário.

As minhas amigas de república, Laylla Coelho, Gabriela Domingues, Tânia Campioni, Naiara Johnsson e a rápida passagem de Kassandra Mustafé e Thaís Moreira. Aprendi muito com vocês. Obrigada pelos momentos de longas conversas e boas risadas na cozinha.

Enfim, agradeço a todos meus familiares e amigos que de alguma forma contribuíram e sempre ficaram na torcida durante esses dois anos de aprendizado pessoal e profissional.

“V A L E U, MESMO ASSIM VALEU...”

RESUMO GERAL

Barbacenia paranaensis é endêmica e a única espécie representante de Velloziaceae no Paraná. Ocorre em pequenos fragmentos disjuntos de cerrado, na região dos Campos Gerais do Paraná, limite austral de distribuição geográfica do bioma. O objetivo deste estudo foi analisar se as características biológicas e reprodutivas estão correlacionadas com o padrão de variabilidade e estrutura genética ao longo da distribuição deste táxon. Para isso foi estudado o padrão anual de floração; a biologia e anatomia floral; o comportamento dos visitantes florais; os sistemas de polinização e reprodução; o nível de variabilidade e estruturação genética atual das populações. O padrão de floração de *B. paranaensis* é considerado do tipo anual, com um curto período de floração massiva, e baixa frequência de indivíduos floridos esporadicamente ao longo do ano. As flores apresentam atributos florais compatíveis por polinização com beija-flores. O nectário septal apresenta região de secreção e estocagem do néctar, que é liberado em fendas para o interior do tubo floral, apresentado como principal recompensa. Os maiores valores de concentração e volume de néctar ocorrem pela manhã, período com maior frequência de visitas florais. Foram observados nove visitantes florais, porém apenas o beija-for *Phaethornis pretrei* foi considerado polinizador efetivo. Houve formação de frutos, crescimento do tubo polínico, fecundação de óvulos e formação de sementes viáveis em tratamentos de autopolinização espontânea, autopolinização e polinização cruzada, caracterizando *B. paranaensis* como autocompatível e apresentando um sistema misto de reprodução em condições naturais. Foram amostradas seis populações naturalmente disjuntas, pertencentes a três regiões geográficas no Paraná. Reações de amplificação de fragmentos genômicos, utilizando quatro *primers* de ISSR, foram realizadas em cerca de 20 indivíduos de cada população, totalizando 120 amostras. Foram obtidos 48 locos com 100% de polimorfismo. A AMOVA indicou 90% de variabilidade genética intrapopulacional, baixa divergência interpopulacional (3%) e entre regiões (7%), porém com estrutura genética (Φ_{ST}) significativa em todos os níveis de variação. Através da análise Bayesiana foram detectados quatro agrupamentos genéticos que não correspondem à distribuição geográfica das populações. As diferentes linhagens estão presentes nas três regiões geográficas, as quais diferem apenas quanto à frequência de ocorrência de cada uma delas. Os resultados sugerem que o comportamento do polinizador e o sistema misto de reprodução contribuem para uma ampla dispersão polínica, compatível com a alta variabilidade e coesão genética observada entre as populações próximas e baixa divergência entre regiões. As características biológicas, reprodutivas e de estrutura genética se apresentam conforme espécies mais generalistas e amplamente distribuídas, do que sugerem as populações pequenas e disjuntas de *B. paranaensis* atualmente observadas. É plausível que a vulnerabilidade da espécie não seja justificada pelo microendemismo resultante do isolamento de populações em ilhas continentais rupestres. Possivelmente, no passado, esta tenha sido uma espécie amplamente distribuída e com populações mais numerosas e interconectadas. Atualmente, os fragmentos isolados por destruição da matriz ecossistêmica original abrigam variabilidade genética antiga e compartilhada.

Palavras-chave: Campos Gerais do Paraná, estrutura genética, ISSR, *Phaethornis pretrei*, sistema misto de reprodução.

GENERAL ABSTRACT

Barbacenia paranensis is endemic and the only specie representative of the Velloziaceae in Paraná. It occurs in small disjunct “cerrado” fragments, in the region of Campos Gerais do Paraná, southern limit of geographical distribution of the biome. The aim of the study was to analyze if biological and breeding characteristics are correlated with the variability and genetic structure pattern throughout the distribution of this taxon. We studied the annual flowering pattern; the floral biology and anatomy; the behavior of floral visitors; the pollination and breeding systems; and the current level of variation and genetic structure of populations. *B. paranaensis* presents annual flowering pattern, with a short and massive flowering period, and low frequency of individual flowering throughout the year. The flower traits are compatible with pollination by hummingbird. The septal nectary presents secretory and storage regions for nectar, which is released through slits into floral tube, shown as the main reward. The highest values of concentration and volume of nectar occur in the morning, synchronized with the greatest frequency of floral visitation. Nine floral visitors were observed, but only *Phaethornis pretrei* was recorded as effective pollinator. There was fruit production, pollen tube growth, fertilization and viable seeds formation in spontaneous self-pollination, self-pollination and cross-pollination, featuring as a self-compatible species with a mixed breeding system in natural conditions. Six natural populations, belonging to three geographical areas in Parana were sampled. Amplification reactions of genomic fragments were conducted using four ISSR primers in about 20 individuals from each population, totaling 120 samples. 48 loci were obtained with 100% of polymorphism. The AMOVA revealed 90% of variability within populations, low divergence among populations (3%) and among regions (7%), but with significant structure (Φ_{ST}) at all levels of genetic variation. Through Bayesian analysis were detected four homogeneous genetic groups, that don't correspond to the geographical distribution of populations. The different lineages were presented in three geographical regions, which differ only by the frequency of occurrence of each one. The results suggest that the behavior of pollinator and the mixed reproductive system contributed to a large pollen dispersal, which is compatible with the high variability and cohesion genetic, observed among populations, and low values of divergence between regions. Biological and breeding characteristics and genetic structure are presented as more generalist and widely distributed species, than the small and disjunct populations currently observed suggest. It is plausible that the vulnerability of the specie could not be justified by micro endemism resulting from the isolation in continental rocky islands. Possibly, in the past, the species was widely distributed and presented more abundant and interconnected populations. Currently, the fragments isolated by the destruction of the original matrix, harbor ancient and shared genetic variation.

Kew words: genetic structure, ISSR, mixed breeding system, *Phaethornis pretrei*, Campos Gerais do Paraná.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	6
Referências	10
CAPÍTULO I: SISTEMAS DE POLINIZAÇÃO E REPRODUÇÃO EM <i>BARBACENIA PARANAENSIS</i> L.B.SM. (VELLOZIACEAE)	13
Resumo	14
Abstract	15
Introdução	16
Material e métodos	17
Área de estudo	17
Fenologia reprodutiva	18
Morfologia e biologia floral	19
Anatomia floral.....	20
Visitantes florais.....	21
Biologia reprodutiva	21
Resultados	23
Fenologia reprodutiva	23
Morfologia e biologia floral	25
Anatomia floral.....	29
Visitantes florais.....	35
Biologia reprodutiva	37
Discussão	39
Referências	46
CAPÍTULO II: VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE <i>BARBACENIA PARANAENSIS</i> L.B.SM. (VELLOZIACEAE), ESPÉCIE ENDÊMICA DO PARANÁ.	51
Resumo	52
Abstract	53
Introdução	54
Material e Métodos	56
Área de estudo	56
Extração e amplificação do DNA	57
Análise dos dados	58
Resultados	60
Polimorfismo e variabilidade genética	61
Estrutura genética.....	64
Discussão	65
Referências	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS	73

INTRODUÇÃO GERAL

Velloziaceae J. Agardh pertence à ordem Pandanales e apresenta cerca de 250 espécies consideradas heliófitas, com predominância na região neotropical (SMITH,1962; MELLO-SILVA, 2005). A família representa um elemento típico dos campos rupestres brasileiros (GIULIETTI; PIRANI,1988). A principal área de ocorrência e de elevados níveis de endemismo ocorre nas montanhas do leste do Brasil, especialmente na Serra do Espinhaço, localizada nos estados de Minas Gerais e Bahia (MENEZES *et al.*,1994).

A taxonomia da família é extremamente controversa, tanto nas subdivisões quanto na circunscrição dos gêneros (MELLO-SILVA, 1991; 2000; 2005; MENEZES *et al.*, 1994; BEEHNKE *et al.*, 2000; SALATINO *et al.*, 2001; STEVENS, 2001). Vários autores dividem a família tradicionalmente em duas subfamílias, Vellozioidae e Barbacenioidae, porém com diferenças na delimitação de ambas (MELLO-SILVA, 1991). Recentemente, Mello-Silva *et al.* (2011) sugeriu, através de análises moleculares e morfológicas, somente cinco gêneros: *Acanthochlamys* P.C. Kao, *Xerophyta* Juss., *Barbaceniopsis* L.B. Sm., *Vellozia* Vand. e *Barbacenia* Vand.

Acanthochlamys bracteata P.C.Kao é a única espécie encontrada na China, é considerada grupo irmão do restante da família (CHASE *et al.*, 1995). O gênero *Xerophyta*, com cerca de 20 espécies, ocorre na África e Madagascar, com uma espécie no Iêmen e sul da Arábia Saudita. *Barbaceniopsis*, com quatro espécies, ocorre nos Andes da Argentina, Bolívia e Peru (IBISH *et al.*, 2001). *Vellozia* apresenta cerca de 100 espécies e uma distribuição geográfica mais ampla comparada com os outros gêneros. Ocorre na América Central, na Bolívia e no Brasil (MELLO-SILVA, 2009). *Barbacenia*, também com cerca de 100 espécies, possui distribuição disjunta da América Central até a Venezuela e do planalto central

brasileiro atingindo até o estado do Paraná (MELLO-SILVA, 2004).

Velloziaceae possui pouca representatividade na flora brasileira, entre as espécies, há destaque para 48 espécies apontadas como raras (MELLO-SILVA, 2009). O gênero *Barbacenia* possui flores em tons claros, como branco, amarelo e lilás, e em tons mais fortes como rosa, violeta e vermelho (MELLO-SILVA, 2004). Apresenta flores com seis estames, corona presente e estigmas lineares ou elípticos (MELLO-SILVA, 2009; SAJO et al., 2010). Há espécies do gênero que apresentam flores tubulosas e produtoras de néctar, sendo polinizadas principalmente por beija-flores (SAZIMA, 1978; CONCEIÇÃO et al., 2007; MACHADO et al., 2007; 2009).

Barbacenia paranaensis L.B.Sm. é a espécie que determina o limite austral de Velloziaceae para América do Sul, além de ser endêmica do Paraná, é a única representante da família ocorrente no Estado (MELLO-SILVA, 2013). Segundo Mello-Silva (2009), está incluída na lista de plantas raras do Brasil. Ocorre em afloramentos rochosos destacados nos pequenos fragmentos disjuntos de cerrado no Paraná. A espécie apresenta hábito rupícola e saxícola, com distribuição microespacial verticalizada em paredões rochosos e jamais é encontrada em solos horizontais. Normalmente se estabelecem em paredões secos, e com baixa densidade de plantas ao seu redor. Entre os poucos trabalhos direcionados a espécie, estão à descrição feita por Smith (1962) e um estudo citológico realizado por Goldbatt e Poston (1988), constatando que o número haplóide de cromossomos é 17.

A paisagem que encontramos no território paranaense apresenta um relevo resultante de uma formação geológica marcada pela presença de planaltos escalonados separados por escarpas, denotando “degraus topográficos” verticalizados (RITTER et al., 2012). Os Campos Gerais do Paraná estão situados

na borda do Segundo Planalto Paranaense, sendo originalmente definido como uma região fitogeográfica que compreende a associação da Floresta Ombrófila Mista e campos limpos ou campos cerrados naturais (MAACK, 1948). Nessa região, o Cerrado ocupa uma área de 2780,45 ha, desse total cerca de 48% se encontra em unidades de conservação (MORO, 2012). Esses fragmentos de Cerrado representam o limite austral da distribuição geográfica do bioma no Brasil (HATSCHBACH *et al.*, 2005; RITTER *et al.*, 2010; MORO, 2012).

Segundo Moro e Carmo (2007) as fisionomias campestres nessa região são classificadas como estepe higrófila (campos úmidos), formação savânica (cerrado) e estepe *stricto sensu* (campos secos) com refúgios vegetacionais rupestres. O refúgio vegetacional rupestre, segundo Ziller e Galvão (2000), refere-se às formações compostas por afloramentos de rocha em meio ao campo, estabelecidas sobre solos pobres, onde podem acolher matéria orgânica em meio às fissuras e abrigar diversas espécies vegetais.

Estudos sobre a diversidade e estruturação genética das espécies podem contribuir para um melhor entendimento dos padrões reprodutivos de táxons. A disjunção de afloramentos rochosos forma um sistema semelhante a ilhas oceânicas, conhecidos como ilhas de habitat terrestre, onde há um isolamento espacial e restrição de fluxo gênico, fatores importantes na determinação da variabilidade genética das espécies (AVISE, 1994).

Para compreender como o processo reprodutivo pode estar relacionado à genética de populações e indicar possível conectividade biológica entre as regiões geográficas das populações de *B. paranaensis*, fazem-se necessários estudos integrados do funcionamento floral e sistemas reprodutivos, bem como determinar o

nível de variabilidade e estrutura genética atual das populações. Portanto, o presente trabalho tem o objetivo geral de caracterizar aspectos biológicos da espécie *B. paranaenses*, tais como: (i) o padrão de floração; (ii) a biologia e anatomia floral (iii) os sistemas reprodutivos; (iv) o nível de variabilidade genética atual intra e interpopulacional. Neste sentido, essa dissertação foi dividida em dois capítulos complementares:

- I) Sistemas de polinização e reprodução em *Barbacenia paranaensis* L.B.Sm. (Velloziaceae).
- II) Variabilidade e estrutura genética de *Barbacenia paranaensis* L.B. Sm. (Velloziaceae), espécie endêmica do Paraná.

Referências

- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**, Chapman and Hall, New York. 1994.
- BEEHNKE, H. D.; TREUTLEIN, J.; WINK, M.; KRAMER, K.; SCHNEIDER, C.; KAO, P. C. Systematics and evolution of Velloziaceae, with special reference to sieve-element plastids and *rbcL* sequence data. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.134, p. 93-129, 2000.
- CHASE, M.W.; STEVENSON, D.W.; WILKIN, P.; RUDALL, P.J. Monocot Systematics: a combined analysis. In: RUDALL, P.J.; CRIBB, D.F.; CUTLER & C.J. HUMPHRIES (EDS) Monocotyledons: Systematics and Evolution. **Kew Royal Botanic Gardens**, p. 685-730, 1995.
- CONCEIÇÃO, A. A.; FUNCH, L. S.; PIRANI, J. R. Phenology, pollination and seed dispersal syndromes on sandstone outcrop vegetation in the "Chapada Diamantina", northeastern Brazil: population and community analyses. **Revista Brasileira de Botânica**, v.30, p. 475-485, 2007.
- GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: Vanzolini, P. E.; Heyer, W. R. (eds.), Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns. **Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, p.39-69, 1988.
- GOLDBATT, P.; POSTON, M. Observation on the chromosome cytology of Velloziaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 75, p. 192-195, 1988.
- HATSCHBACH, G.; VON LINSINGEN, L.; UHLMANN, A.; CERVI, A.C SONEHARA, J.S. Levantamento Florístico do Cerrado Paranaense e Vegetação Associada. **Boletim Museu Botânico Municipal de Curitiba**, v.67, p. 01-40, 2005.
- IBISCH, P.L.; NOWICK, C.; VÁSQUEZ, R.; KOCH, K. Taxonomy and biology of Andean Velloziaceae: *Vellozia andina* sp. nov. and notes on *Barbaceniopsis* (including *Barbaceniopsis castillonii* comb. nov.). **Systematic Botany**, v.26, n. 1, p. 5-16, 2001.
- MAACK, R. Notas preliminares sobre clima, solos e vegetação do Estado do Paraná. Curitiba: **Arquivos de Biologia e de Tecnologia**, v.2, p. 102, 1948.
- MACHADO, C. G; COELHO, A.; SANTANA, C.S; RODRIGUES, M. Beija-flores e seus recursos florais em uma área de campo rupestre da Chapada Diamantina, Bahia. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.15, n. 2, p. 267-279, 2007.
- MACHADO, C.G.; COELHO, A.G., SANTANA, C.S.; RODRIGUES, M. Beija-flores (Aves: Trochilidae) e seus recursos florais em uma área de caatinga da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Zoologia**, v. 26, n. 2, p. 255-265, 2009.
- MELLO-SILVA, R. The infra-familial taxonomic circumscription of the Velloziaceae: a historical and critical analysis. **Taxon**, v.40, p. 45-51, 1991.

MELLO-SILVA, R. Partial cladistic analysis of *Vellozia* and characters for the phylogeny of Velloziaceae. In: Wilson, K. L. & Morrison, D. A. (eds.). **Monocots: systematics and evolution**. CSIRO, Melbourne, 2000. p. 505-522.

MELLO-SILVA, R. Novitates velloziacearum florum phanerogamicarum Sancti Pauli. **Revista Brasileira Botânica**, v.27, n.3, p.453-462, 2004.

MELLO-SILVA, R. Morphological analysis, phylogenies and classification in Velloziaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.148, p. 157-173, 2005.

MELLO-SILVA, R. Flora de grão-mogol, Minas Gerais: Velloziaceae. **Boletim Botânico Universidade São Paulo**, v.27, n.1, p.109-118, 2009.

MELLO-SILVA, R. VELLOZIACEAE In: GIULIETTI, A.M.; RAPINI, A.; ANDRADE, M.J.G.; QUEIROZ, L.P.; SILVA, J.M.C. **Plantas Raras do Brasil**. Conservação Internacional, Belo Horizonte, 2009. p. 392 – 398.

MELLO-SILVA, R.; SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F.; MOTTA, L.B.; CATTAL, M.B.; SASSAKI, D.; LOVO, J.; PITA, P.B.; ROCINI, C.; RODRIGUES, C.D.N.; ZARREI, M.; CHASE, M.W. Five vicarious genera from Gondwana: the Velloziaceae as shown by molecules and morphology. **Annals of Botany**, v.108, p.87-102, 2011.

MELLO-SILVA, R. Velloziaceae In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000245>) 2013. Acesso em: 27/02/2013.

MENEZES, N.L.; MELLO-SILVA, R.; MAYO, S.J. Cladistic analysis of the Velloziaceae. **Kew Bulletin**, v.49, p. 71-92, 1994.

MORO, R. S.; CARMO, M. R. B. A vegetação campestre nos Campos Gerais. In: MELO, M. S. MORO, R. S.; GUIMARÃES, G. B. (Eds.). **Patrimônio Natural dos Campos Gerais do Paraná**. Ponta Grossa: Ed. UEPG. 2007. p. 93-99.

MORO, R. S. **Biogeografia do Cerrado nos Campos Gerais**. Ponta Grossa: Ed. UEPG, 2012.

RITTER, L. M. O.; RIBEIRO, M. C.; MORO, R. S. Composição florística e fitofisionomia de remanescentes disjuntos de Cerrado nos Campos Gerais, PR, Brasil - limite austral do bioma. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, 2010.

RITTER, L. M. O.; PITT, E.; CHAVES, C.C.; MORO, R. S. Inserção dos fragmentos de cerrado na paisagem dos campos gerais. In: MORO, R. S. (org.): **Inserção dos Fragmentos de Cerrado a Paisagem dos Campos Gerais**. **Biogeografia do Cerrado nos Campos Gerais**. Ponta Grossa: Ed. UEPG. 2012. p. 13-32.

SAJO, M.G.; MELLO-SILVA, R.; RUDALL, P.J. Homologies of floral structures in Velloziaceae with particular reference to the corona. **International Journal of Plant Sciences**, v.171, n. 6, p. 595-606, 2010.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; MELLO-SILVA, R.; VAN SLUYS, M. A.; GIANNASI, D. E.; PRICE, R. A. Phylogenetic inference in Velloziaceae using chloroplast *TrnL-F* sequences. **Systematic Botany**, v.26, p. 92-103, 2001.

SAZIMA, M. **Biologia floral de espécies de Velloziaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais**. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

SMITH, L.B. **Origins of the flora of southern Brazil – A synopsis of the American Velloziaceae**. Contributions from the United States National Herbarium, v.35, p.280, 1962.

STEVENS, P.F. Angiosperm phylogeny website, version 9, June 2008 [more or less continuously updated]. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> (accessed 7 March 2012). 2001.

ZILLER, S.; GALVÃO, F. A degradação da estepe gramíneo-lenhosa no Paraná por contaminação biológica de *Pinus elliottii* e *P. taeda*. **Floresta**, v. 32, n.1, p. 41-47, 2000.

CAPÍTULO I: SISTEMAS DE POLINIZAÇÃO E REPRODUÇÃO EM *BARBACENIA PARANAENSIS* L.B.SM. (VELLOZIACEAE)

Sistemas de polinização e reprodução em *Barbacenia paranaensis* L.B.Sm.
(Velloziaceae)

Resumo

Barbacenia paranaensis apresenta distribuição geográfica restrita à região dos Campos Gerais do Paraná. Sistemas de polinização estão relacionados à fenologia de floração, produção de recursos florais e comportamento do polinizador, interferindo no sistema reprodutivo. O objetivo deste estudo foi acompanhar os eventos fenológicos reprodutivos, descrever a morfologia, a biologia e a anatomia floral e observar visitantes florais para compreender o sistema de polinização e reprodutivo da espécie. Indivíduos floridos e frutificados foram quantificados pelo período de um ano, com intervalos quinzenais. A biologia floral foi acompanhada desde botão floral até a formação dos frutos. Estudos da microestrutura do nectário, dos visitantes florais e dos sistemas reprodutivos foram realizados. *B. paranaensis* apresenta um curto período de floração massiva e baixas frequências de indivíduos floridos ao longo do ano. A antese floral dura cerca de três dias, as flores apresentam atributos florais compatíveis com a síndrome de polinização por beija-flor. O nectário septal apresenta região de secreção e estocagem do néctar, que é liberado por fendas para o interior do tubo floral. Os maiores valores de concentração e volume de néctar ocorrem pela manhã, período com maior frequência dos visitantes florais. Foram observados nove visitantes florais, porém apenas o beija-for *Phaethornis pretrei* foi considerado polinizador efetivo. Houve formação de frutos, crescimento do tubo polínico, fecundação de óvulos e formação de sementes viáveis em tratamentos de autopolinização espontânea, autopolinização e polinização cruzada, caracterizando *B. paranaensis* como autocompatível, apresentando um sistema misto de reprodução em condições naturais. Os resultados sugerem que o comportamento do polinizador e o sistema misto de reprodução contribuem para a transferência polínica mais ampla, favorecendo a polinização cruzada entre indivíduos de *B. paranaensis* dentro de uma mesma área, mantendo o fluxo polínico entre as áreas.

Palavras-chaves: Nectário septal, *Phaethornis pretrei*, sistema misto de reprodução.

Abstract

Barbacenia paranaensis presents restrict geographic distribution in Campos Gerais from Paraná. Pollination systems are related to flowering phenology, floral resources production and pollinators behavior, interfering in the breeding system. The aim of this study was to accompany the reproductive phenology, describe the morphology, biology and floral anatomy, observing floral visitors to understand the pollination and reproductive systems of the specie. The flowering and fruiting patterns were quantified during one year, with biweekly intervals. The floral biology was evaluated from floral buds presentation to fruit formation. Studies of the nectary anatomy, floral visitors and breeding systems were performed. *B. paranaensis* presents annual flowering pattern, with a massive and short flowering period, and low frequencies of flowering individuals throughout the year. The anthesis lasts about three days, the floral traits are compatible with hummingbirds' pollination. The septal nectary presents secretory and storage region for nectar, which is released through slits into floral tube and shown as the main reward. The highest values of concentration and nectar volume occur in the morning, synchronized with greatest frequency of floral visitors. Nine floral visitors were observed, but only *Phaethornis pretrei* was recorded as effective pollinator. There were fruit production, pollen tube growth, fertilization and formation of viable seeds in spontaneous self-pollination, self-pollination and cross-pollination, featuring as self-compatible specie with a mixed breeding system in natural conditions. The results suggest that the behavior of pollinator and mixed breeding system contribute to pollen transfer, favoring outcrossing between individuals of *B. paranaensis* within the same area, keeping pollen flow between areas.

Kew words: Mixed breeding system, *Phaethornis pretrei*, Septal nectary.

Introdução

Os sistemas reprodutivos em plantas se referem a um conjunto de características genéticas e ecológicas, relacionadas ao padrão de reprodução e formação de novos indivíduos, influenciadas pela amplitude do fluxo gênico, pela sincronia de floração entre indivíduos e pelo comportamento dos polinizadores. Esses aspectos definem espécies que variam desde a autocompatibilidade polínica associada à autogamia frequente, até aos sistemas mais complexos de autoincompatibilidade total e alogamia obrigatória (GIBBS *et al.*, 1999; HOLSINGER, 2000). Como resultado destes processos, a amplitude da dispersão polínica e de sementes alteram os níveis de endogamia e da estruturação genética em espécies naturais (LOVELESS; HAMRICK, 1984; SLATKIN, 1985).

Estudos de biologia floral são importantes para compreender o sistema de polinização, determinando o comportamento dos polinizadores e eventos de mecanismo da polinização, interferindo nos sistemas de reprodução (BORBA *et al.*, 2007; PANSARIN *et al.*, 2009; CHOI *et al.*, 2011). Para ampliar o entendimento da biologia floral e reprodutiva das plantas, assim como, o comportamento do polinizador é necessário relacionar estruturas morfológicas e anatômicas a processos ecológicos, como a secreção de néctar, apresentação de recompensas florais, e ajustes nas interações planta-polinizador (COSTA *et al.*, 2007; AMORIM *et al.*, 2013).

Na família Velloziaceae verifica-se uma predominância de alogamia podendo haver autoincompatibilidade, como em *Vellozia squamata*, *V. leptopetala* e *V. epidendroides* (OLIVEIRA *et al.*, 1991; JACOBI; SARTO, 2007). No gênero *Barbacenia* as flores são tubulares e produtoras de néctar, sugerindo polinização

efetuada por beija-flores, principalmente da sub-família Phaethornitinae (SAZIMA, 1978; CONCEIÇÃO *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2007; 2009).

Barbacenia paranaensis L.B.Sm. é a espécie que determina o limite austral de distribuição geográfica de Velloziaceae na América Latina. Além de ser a única representante da família ocorrente no Paraná, é endêmica do estado (MELLO-SILVA, 2013) e está incluída na lista de plantas raras do Brasil (MELLO-SILVA, 2009). A espécie apresenta hábito rupícola ou saxícola, encontrada em paredões rochosos com distribuição microespacial verticalizada, localizados na região dos Campos Gerais do Paraná.

Neste cenário, esperamos encontrar um pico de floração, um sistema de polinização ornitófilo e um sistema reprodutivo predominantemente alogâmico, comum para a família Velloziaceae. Para testar essa hipótese, desenvolvemos esse trabalho, com objetivo de acompanhar os eventos fenológicos reprodutivos, a biologia e anatomia floral, os visitantes florais, e o funcionamento do sistema de polinização, para melhor entender o sistema reprodutivo em *B. paranaensis*.

Material e métodos

Área de estudo

O estudo foi realizado em duas localidades, Salto Santa Rosa e Salto Puxa Nervos, localizadas no município de Tibagi estado do Paraná. Essas localidades estão situadas na região dos Campos Gerais, definida como uma região fitogeográfica que compreende campos limpos e campos cerrados naturais (MAACK, 1948).

As fisionomias campestres nessa região são classificadas como campos úmidos, cerrado (norte dos Campos Gerais do Paraná) e campos secos com afloramentos rochosos. Nas áreas de afloramentos rochosos, a vegetação se desenvolve sobre uma tênue camada de solo, com flores vistosas, como por exemplo, Amaryllidaceae J. St.-Hil. , Iridaceae Juss.; permeadas por Cyperaceae Juss. e Poaceae Barnhart. As fraturas das rochas são comumente colonizadas por Ericaceae Juss., Melastomataceae Juss., Euphorbiaceae Juss., Cactaceae Barnhart e Bromeliaceae Juss. (MORO; CARMO, 2007).

Os Campos Gerais do Paraná representam o limite austral da distribuição geográfica do bioma cerrado no Brasil (HATSCHBACH *et al.*, 2005; RITTER *et al.*, 2010; MORO *et al.*, 2012), situado na borda do Segundo Planalto Paranaense, na porção centro leste do estado do Paraná (GUIMARÃES *et al.*, 2009). O município de Tibagi possui o clima da região do tipo Cfa (subtropical úmido quente), com influência indireta do clima Cfb (temperado sempre úmido), segundo a classificação de Köppen.

Fenologia reprodutiva

A avaliação fenológica foi realizada entre outubro de 2012 e setembro de 2013, com acompanhamento quinzenal dos padrões de floração e frutificação. Indivíduos adultos foram numerados para o acompanhamento em duas localidades próximas, situadas município de Tibagi, sendo 100 indivíduos no Salto Puxa Nervos e 128 indivíduos no Salto Santa Rosa, totalizando 228 indivíduos. A produção de flores e frutos foi quantificada a partir da contagem direta em cada indivíduo no dia do censo. Para verificar se há correlação entre os padrões fenológicos reprodutivos e as variações climáticas, foram realizados testes de coeficiente de correlação

parcial utilizando o programa BioEstat 5.3 (AYRES *et al.*, 2007). Os dados de temperatura e pluviosidade da região foram fornecidos pela Fundação ABC - Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário, para os meses de outubro 2012 a setembro de 2013.

Morfologia e biologia floral

Para o estudo da morfologia floral, 22 flores recém-abertas foram armazenadas em álcool 70%. Os caracteres descritos foram relacionados com o sistema de polinização, tais como: comprimento do pedicelo, hipanto, estames e tépalas; altura do estilete desde sua base até o ápice do estigma, para verificar a presença de flores brevistilas e longistilas na população.

Flores em diferentes estágios de desenvolvimento, desde botão até a formação de frutos maduros, foram observados em campo. Para a dinâmica de produção do néctar foram utilizadas quatro flores ensacadas e as mesmas foram avaliadas durante um período de 24 horas, em intervalos de três horas (GALETTO; BERNARDELLO, 1992). O volume total do néctar produzido a cada intervalo foi mensurado usando microsseringa Hamilton 702 volume 25 µl, e a concentração medida por um refratômetro de bolso 0-90% Brix, resolução 1% Brix. Para verificar a receptividade estigmática da flor foi utilizado peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 volumes (DAFNI, 1992).

Anatomia floral

Microscopia eletrônica de varredura

A região ovariana e a base do estilete foram fixados em FAA 70% por 24 horas, armazenado em álcool 70 %, e desidratado em série alcoólica ascendente. O material foi seco pelo método do ponto crítico, e metalizado com ouro coloidal (ASCENSÃO *et al.*, 1999, modificado). As observações e captura de imagens foram realizadas no microscópio Jeol JSM 6360LV a20 kV. As análises foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná.

Estrutura e histoquímica

Flores em antese foram fixadas em FAA (JOHANSEN, 1940) por 24h para preservação dos compostos hidrofílicos e em formalina neutra tamponada (FNT) (LILLIE, 1965) por 48h para os lipofílicos. A região ovariana e a base do estilete foram isoladas; o material foi desidratado em série butílica ascendente álcool butílico terciário, (JOHANSEN, 1940) e incluído em parafina. As secções transversais seriadas (10 µm) foram realizadas em micrótomo rotativo Olympus CUT 4055. As secções foram coradas com Safranina e azul de Astra (GERLACH, 1969) para as análises estruturais, e as lâminas montadas em resina sintética Permount.

Testes histoquímicos foram realizados em materiais frescos e fixados. Os ensaios foram procedidos nas glândulas em fase secretora para a localização *in situ* das principais classes de compostos químicos que constituem a secreção: reação PAS para detecção de polissacarídeos (MCMANUS, 1948; JENSEN, 1962), Preto de Sudão B para lipídios totais (PEARSE, 1985); vermelho neutro para identificação de regiões produtoras de compostos lipofílicos (VOGEL, 1990), reagente de Nadi para

terpenóides (DAVID;CARDE, 1964), acetato de cobre e ácido rubiânico para ácidos graxos (GANTER;JOLLES, 1970), e cloreto férrico para localização de compostos fenólicos totais, lipo e hidrossolúveis (JOHANSEN, 1940). O controle foi realizado de acordo com as respectivas técnicas. As secções foram observadas em luz branca e submetidas ao vermelho neutro também visualizadas na banda do ultravioleta (lâmpada de mercúrio HBO 100 w, filtro bloqueador BA420, filtro de excitação BP330-385 e espelho dicromático DM400), e digitalmente adquiridas com o *software* Image Pro Express 6.3 a partir do microscópio composto Olympus BX53 com uma câmera digital Olympus Q-Color 5.

Visitantes florais

As observações focais periódicas foram realizadas entre 05:00h e 20:00h, durante 12 dias não consecutivos, nos meses de dezembro de 2012 a fevereiro de 2013. A cada 04:00h de observações houve intervalos de 01:00h, totalizando 60 horas. A identificação dos insetos visitantes florais foi realizada pela equipe do Dr. Gabriel Augusto Rodrigues de Melo e o material testemunho foi depositado na Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure na Universidade Federal do Paraná. A identificação das aves foi feita a partir de registros fotográficos pelo especialista Dr. Caio Graco Machado (Universidade Estadual de Feira de Santana).

Biologia reprodutiva

Os testes reprodutivos foram realizados em campo, durante o pico de floração por dois anos consecutivos, em 2013 e 2014. Botões florais foram ensacados com tecido *voile* para exclusão de visitantes florais, e manipulados durante a antese da

flor. O tamanho e a forma dos sacos permitiram a abertura normal das tépalas, evitando que permaneçam aderidas aos estigmas. O sistema reprodutivo foi analisado a partir de cinco tratamentos: (i) controle, com flores apenas marcadas e mantidas sob condições naturais, sem manipulação; (ii) autopolinização espontânea, onde as flores isoladas permaneceram sem manipulação. Nos experimentos correspondentes ao ano de 2014, esse tratamento foi realizado em flores brevistilas e longistilas; (iii) autopolinização manual, em que flores foram polinizadas com o próprio pólen; (iv) polinização cruzada, em que flores foram emasculadas e polinizadas com pólen de outros indivíduos dentro da mesma população; (v) apomixia, removendo os estames e o ápice do gineceu das flores.

A formação de frutos maduros foi considerada como sucesso reprodutivo. Os frutos secos que apresentaram sementes foram coletados, e as sementes foram quantificadas com auxílio de lupa. Para verificar se há significância entre os tratamentos de polinização cruzada e autopolinização foi realizado o teste de Anova um critério com o teste de Tukey através do programa BioEstat 5.3 (AYRES *et al.*, 2007).

Estiletos de duas flores de cada tratamento foram fixados em FAA 70% (JOHANSEN, 1940) para o acompanhamento e descrição do crescimento do tubo polínico, com intervalos de 24, 48, 72, 196 e 272 horas após os testes de polinização. As lâminas foram confeccionadas seguindo as técnicas de Dafni (1992) modificadas. Os estiletos foram imersos em NaOH 8N durante 120 minutos e posteriormente na água sanitária por 30 minutos e lavadas em água destilada, coradas com azul de anilina (solução aquosa 1%). As imagens foram obtidas no microscópio de varredura a laser confocal multifóton, modelo A1 MP+, Nikon (NIKON Instruments Inc., Tokyo, Japan), utilizando objetivas de imersão 20 X.

Resultados

Barbacenia paranaensis apresenta uma floração massiva em um curto período e baixa frequência de indivíduos floridos ao longo do ano. A antese floral possui duração com cerca de três dias, as flores apresentam atributos florais compatíveis com a síndrome de polinização por beija-flor. O nectário septal apresenta região de secreção e estocagem do néctar, apresentado como principal recompensa. *Barbacenia paranaensis* apresentou no período matutino os maiores valores de concentração e volume de néctar, assim como a maior frequência dos visitantes florais. Foram observados nove visitantes florais, porém apenas o beija-for *Phaetornis pretrei* foi considerado polinizador efetivo. Houve formação de frutos, crescimento normal do tubo polínico, fecundação de óvulos e formação de sementes viáveis em tratamentos de autopolinização espontânea, autopolinização manual e polinização cruzada manual, caracterizando *B. paranaensis* como autocompatível, apresentando um sistema misto de reprodução em condições naturais.

Fenologia reprodutiva

O período de floração de *B. paranaensis* apresentou uma distribuição unimodal, ocorrendo grandes variações na frequência ao longo do ano. A maior produção de flores ocorreu no verão, durante a segunda quinzena de fevereiro. Esse pico representou 50% dos indivíduos marcados floridos, com média de duas flores por indivíduo. No mês de junho, somente 2% de indivíduos floridos, correspondendo a menor porcentagem de floração no ano.

O pico de frutificação ocorreu no começo de abril com 30% de indivíduos frutificados. Em setembro foi registrado apenas 2% de frutificação, sendo a menor porcentagem em todo o período avaliado (Figura 1).

No mês de fevereiro de 2013 ocorreu a maior precipitação durante o ano de estudo e uma elevada temperatura, considerando o período do verão. A menor precipitação ocorreu no mês de agosto, com uma temperatura mais amena (Figura 2). Houve maior número de indivíduos na fase reprodutiva no período de maior temperatura ($r= 2,52$; $p=0,03$) e pluviosidade ($r=2,50$; $p=0,03$).

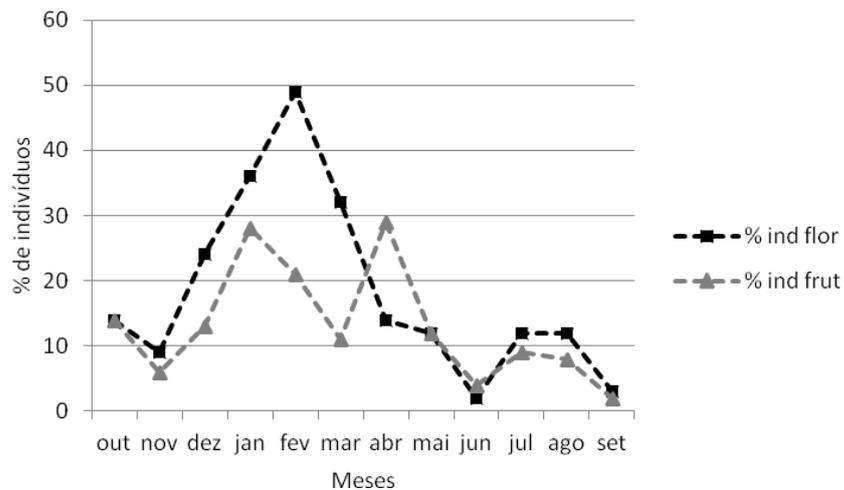


Figura 1. Fenologia reprodutiva de *B. paranaensis* durante outubro de 2012 a setembro de 2013 realizada no município de Tibagi, PR.

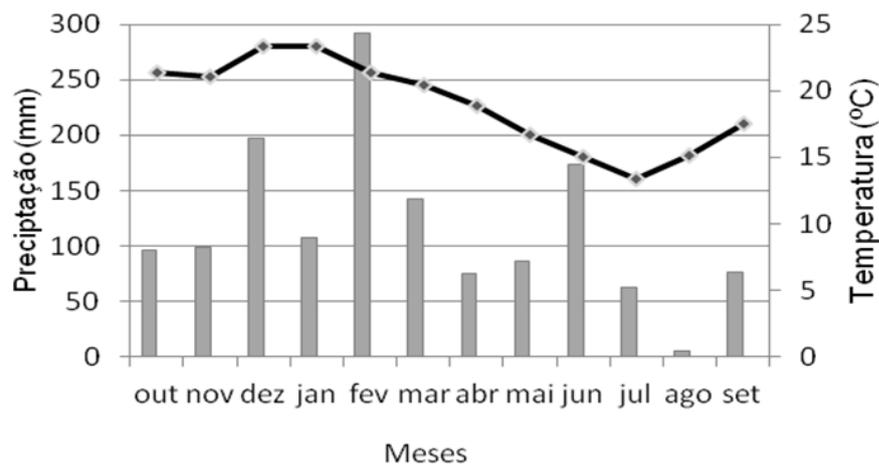


Figura 2. Média dos registros de temperatura (linha contínua) e de precipitação (barras) de outubro de 2012 a setembro de 2013 no município de Tibagi, PR.
Fonte: Fundação ABC (2013).

Morfologia e biologia floral

Barbacenia paranaensis foi encontrada com o hábito rupícola ou saxícola com crescimento cespitoso (Figura 3 A). Possui inflorescência uniflora, com flores tubulares e pedunculadas e comprimento médio de 8,80 ($\pm 1,30$) cm. As flores são compostas por hipanto, seis tépalas estreitamente oblanceoladas e glabras, apresentando coloração arroxeadada e possuem seis coronas adnatas em cada estame. O androceu apresentou seis estames isostêmones epipétalos, anteras dorsifixas, rimosas, com deiscência longitudinal, intorsa e pólen com coloração arroxeadada. Estiletos possuem uma coloração arroxeadada e o estigma é único com formato oval acuminado. Ovário elipsóide, ínfero, tricarpelar, trilocular e apresentou placentação axial. Os frutos foram recobertos com o próprio cálice da flor alcançando em média 6,40 ($\pm 0,60$) cm de comprimento.

A população de *B. paranaensis* apresentou heterostilia dimórfica, com a maior frequência de indivíduos em flores longistilas e menor frequência em flores brevistilas (Tabela 1).

Tabela 1. Características florais (dimensões em cm) de flores longistilas e brevistilas de *B. paranaensis*, no município de Tibagi, PR.

Peças florais	Flores Longistilas (n= 15)	Flores Brevistilas (n=7)
Hipanto	4,73 ($\pm 0,52$)	4,91 ($\pm 0,54$)
Tépalas	2,05 ($\pm 0,24$)	1,98 ($\pm 0,19$)
Estames	1,30 ($\pm 0,10$)	1,32 ($\pm 0,13$)
Estiletos	4,60 ($\pm 0,53$)	3,75 ($\pm 0,70$)

As flores exibiram-se vistosas e pedunculadas (Figura 3 A), não exalando odor perceptível ao sentido humano e permanecem abertas durante a noite. O estigma apresentou receptivo, néctar e pólen são profusos em período de pré-antese. A abertura das tépalas (Figura 3 B) ocorreu no início da manhã e as flores permanecem abertas até o final da antese, com duração em cerca de três dias. A forte coloração arroxeadada das tépalas durante a antese (Figura 3 B e Figura 3 D) se perde após a senescência dos estames, período final da antese (Figura 3 C). O perigônio passa a apresentar uma coloração esverdeada, as tépalas começam a se fechar, concomitante ao início da formação dos frutos. O processo de frutificação foi evidenciado pelo intumescimento inicial do ovário, perceptível após 20 dias posteriores a polinização (Figura 3 E). Após a maturação, os frutos cápsulas deiscentes adquiriram uma coloração acastanhada, esse processo dura cerca de 50 dias após a polinização (Figura 3 F). As sementes são pequenas, com cerca de três cm de comprimento e consideradas barocóricas, devido à posição pendente do fruto.

O maior volume de néctar e concentração de açúcares foi identificado na flor recém-aberta, no primeiro horário de retirada. A partir desse horário, o volume de néctar apresentou produção gradativa. A concentração de néctar teve um declínio a partir das 13:00 h até o período noturno, quando a menor concentração foi registrada, $16,5 \pm 1,5\%$ Brix às 22:00 h (Tabela 2).

Tabela 2. Dinâmica de produção de néctar em flores de *B. paranensis* ao longo de 24h, com valores médios e desvio padrão de volume e concentração de açúcar em horários sequenciais.

Horário	Volume (μL)	Concentração (%Brix)
07:00	22,25 \pm 8,43	22,75 \pm 2,06
10:00	12,5 \pm 2,5	20 \pm 1,0
13:00	6,5 \pm 0,5	18,5 \pm 0,5
16:00	3,5 \pm 0,5	--
19:00	--	--
22:00	9 \pm 1	16,5 \pm 1,5
01:00	--	--
04:00	9,5 \pm 0,5	19,5 \pm 0,5



Figura 3. Fases da biologia floral de *B. paranaensis*. A. crescimento cespitoso com flores pendentes e vistosas. B. flor em antese. C. senescência dos estames. D-F aspectos laterais da flor. D. coloração arroxeada na parte externa do hipanto e nas tépalas. E. flor passa a apresentar coloração esverdeada; início do desenvolvimento do fruto. F. fruto maduro com coloração acastanhada nota-se a permanência das tépalas. Escala = 1 cm.

Anatomia floral

Na visão macroscópica de *B. paranaensis* foi percebido a presença de fenda nectarífera localizada entre a parte basal do estilete e a parte superior dos lóculos do ovário (Figura 4.1 A). As três fendas nectaríferas estão localizadas entre os três lóculos do ovário (Figura 4.1 B).

Microscopia eletrônica de varredura

A análise no microscópio eletrônico de varredura foi realizada a partir dessa região (Figura 4.2).

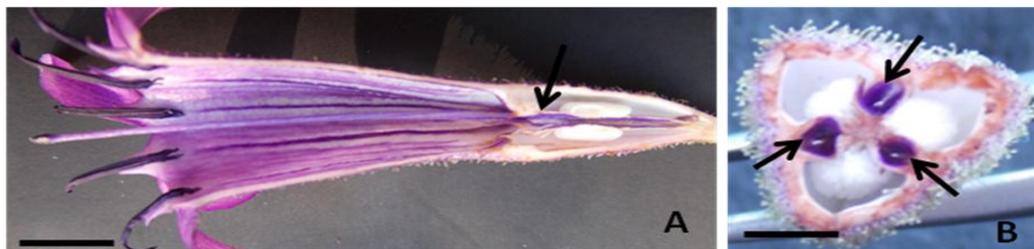


Figura 4.1. Cortes da flor de *B. paranaensis*. A. corte longitudinal na flor localizando uma fenda nectarífera (seta). B. corte transversal localizando as três câmaras nectaríferas existentes (setas) entre os lóculos do ovário nas flores de *B. paranaensis*. Escala = 1 cm.

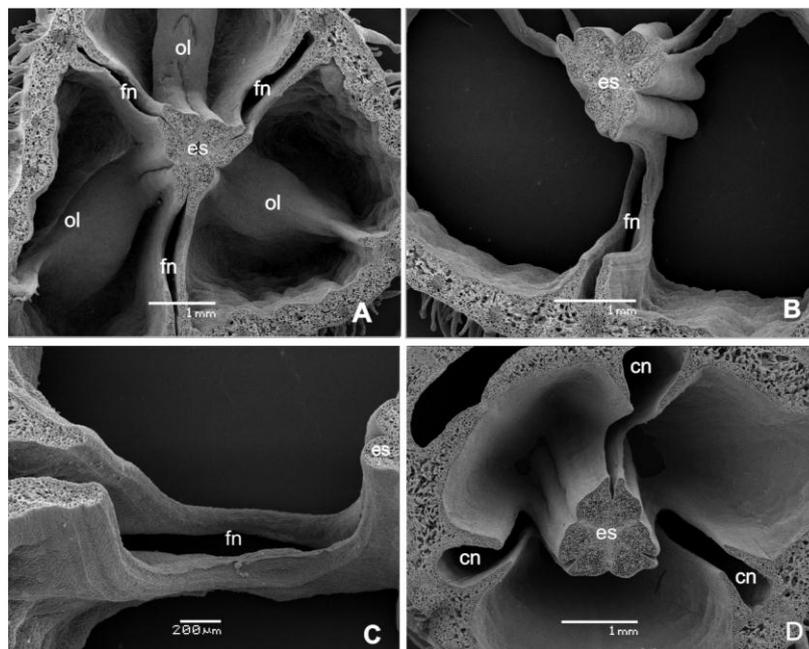


Figura 4.2. Eletromicrografia do nectário septal de *Barbacenia paranaensis*; secções transversais da região mediana (A) e apical (B) do ovário. A. Fendas nectaríferas (fn) paralelas aos lóculos do ovário (ol) e base do estilete (es) ao centro. B. Detalhe da fenda nectarífera com visão frontal. C. Detalhe da fenda nectarífera com visão lateral frontal. D. Região de armazenamento do néctar, denominada de região contentora de néctar (cn).

Estrutura e histoquímica

Localização das glândulas no ovário

Os três lóculos do ovário foram observados na secção da região proximal, localizada abaixo da inserção dos verticilos (Figura 5 A). No centro desta secção, há o início da formação das células que constituem os nectários septais (NS; Figura 5 A, inset). Logo abaixo a esta região, três NS apresentaram-se como três fendas no centro do ovário (Figura 5 B). Estas glândulas são formadas por um tecido secretor (Figura 6 A, B) e uma região dilatada em que o néctar é acumulado, denominada região contentora de néctar (cn, Figura 6 A,C). As células epiteliais secretoras encontram-se restritas à parte mais interna dos nectários septais. As partes mais externas desses nectários constituíram a região contentora de néctar. Na região mais central do ovário, onde os óvulos foram visualizados, observou maior extensão dos nectários e dilatação da região contentora (Figura 5 C). Apenas os lóculos e uma grande ramificação de traços vasculares foram encontrados na região basal do ovário (Figura 5 D).

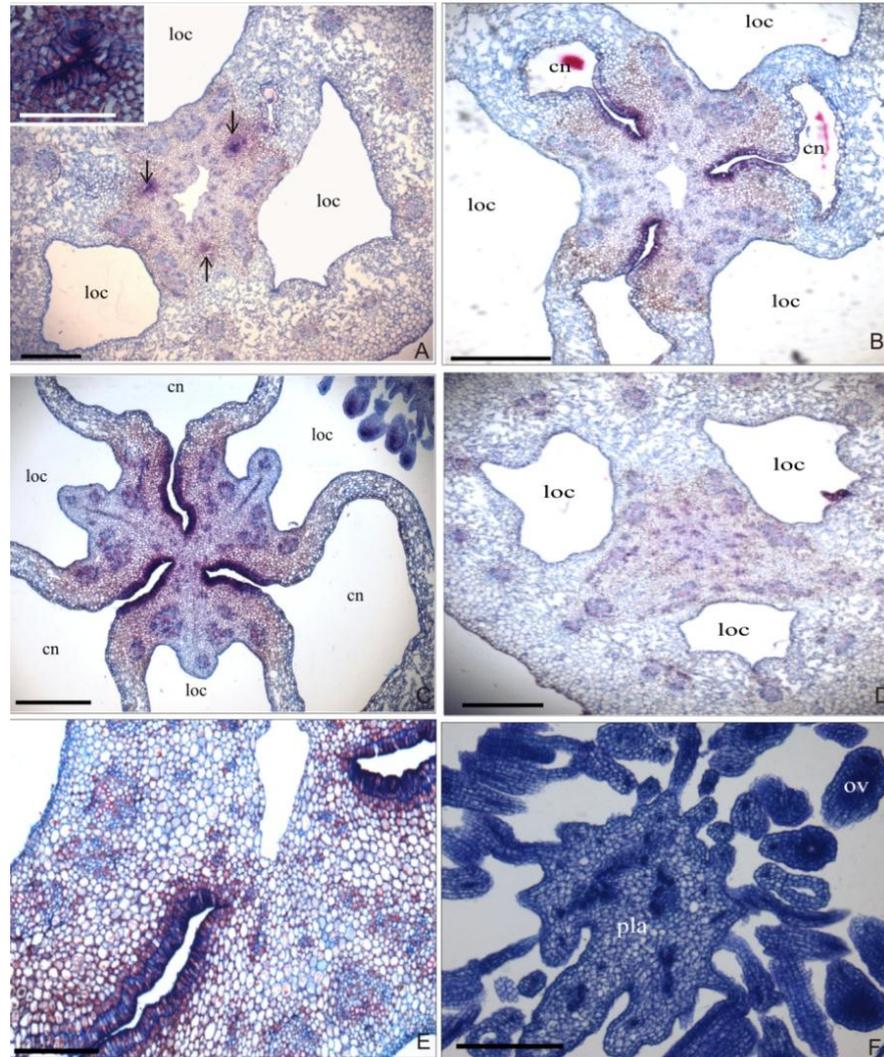


Figura 5. Secções transversais do ovário de *B. paranaensis*. A. Secção proximal do ovário. Início do aparecimento de células nectaríferas (setas) e lóculos (loc) do ovário. B. Os nectários septais (NS) foram observados na região central do ovário, paralelos aos lóculos. C. Secção apical do ovário. Nectários septais (NS) observados na região central do ovário, enquanto os óvulos ainda não são visualizados. A região contentora (cn) de néctar apresenta sua maior área. D. Secção basal do ovário. Ausência de tecido secretor e presença de um grande número de ramificações de traços vasculares na região central. E. Vascularização do NS: abundância de traços vasculares e de células do floema. F. Os óvulos (ov) estão diretamente vascularizados por traços provenientes da placenta (pla). Barras: 75µm (*inset* A), 150µm (E,F), 250µm (A,D), 300µm (B,C).

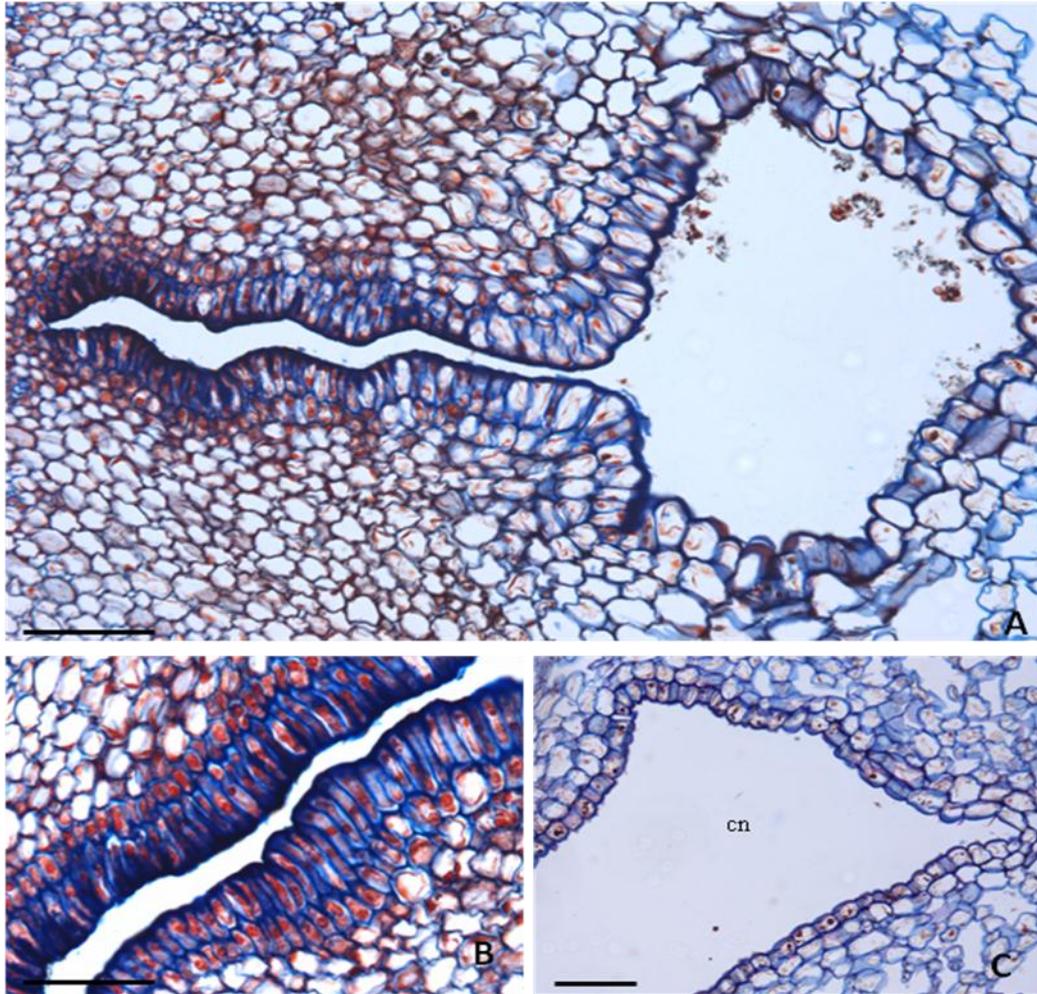


Figura 6. Nectário septal de *Barbacenia paranaensis*. A. NS possuem duas regiões: a região produtora/secretora (A-B) e a região contentora de néctar (cn; A-C) em que o néctar foi produzido e armazenado. B. A epiderme nectarífera apresenta células em paliçada com núcleo basal ou central e protoplasto denso. O parênquima nectarífero apresentou células compactas e com conteúdo denso (seta). C. Papilas presentes ao longo de toda a extensão da região contentora de néctar. Barras: 50 μ m (C), 75 μ m (B), 150 μ m (A).

Estrutura dos NF em fase secretora

Os três NS apresentaram mesmas características estruturais, todos diferenciados na flor em antese. A epiderme nectarífera possui uma fina cutícula pouco perceptível com o reagente Preto de Sudão B (Figura 7 D). Estômatos ou distensão da cutícula não foram observados. As células apresentam-se paliçadas e possuem núcleo em posição central ou basal. O protoplasto destas células apresentou conteúdo denso e possui leve retração, característico de células em fase secretora. A região contentora de néctar foi contínua à epiderme nectarífera, e

apresentou papilas ao longo de toda a sua extensão. O parênquima nectarífero, de acordo com a região do ovário, possui de uma a três camadas de células arredondadas, mais compactas e com conteúdo denso em relação ao parênquima adjacente. A vascularização do ovário tem origem no feixe que provém do eixo central da flor, cujos traços se ramificaram em sua base (Figura 5 D). Estes traços divergem originando aqueles que irão vascularizar a placenta e os NS (Figura 5 E, F). Os óvulos foram diretamente vascularizados pelos traços oriundos da placenta (Figura 5 F). Todos os traços que vascularizaram os NS apresentaram muitas células do floema (Figura 5 E).

Testes histoquímicos

A reação PAS evidenciou conteúdo polissacarídeo nas células da epiderme e parênquima nectaríferos, cujos protoplastos apresentaram intensa coloração (Figura 7 A, B). A cutícula apresentou-se muito espessa nas papilas que constituem a região contentora de néctar (Figura 7 C, E, G). O conteúdo destas células apresentou resultado positivo para ácidos graxos (Figura 7 F) e compostos fenólicos totais (Figura 7 H).

Osmóforos

Emergências não vascularizadas foram encontradas ao longo de toda a superfície externa do ovário. Estas glândulas são constituídas por uma epiderme secretora cujo conteúdo apresenta-se intensamente corado, não foi observado distensão ou rompimento de cutícula. As células parenquimáticas adjacentes apresentaram formato menor e mais compacto do que aquelas que constituem toda a extensão da glândula (Figura 8 A–C). O teste com reagente de Nadi indicou que

todo o ápice da glândula esta envolvido na produção de terpenos (Figura 8 E). A base destas glândulas apresentou parede espessa impregnada por um composto com afinidade pela safranina, e não brilha sob luz polarizada (Figura 8 A, B). Testes histoquímicos com o reagente vermelho neutro indicou a natureza lipofílica destas impregnações, sugerindo a ocorrência de suberina nesta região.

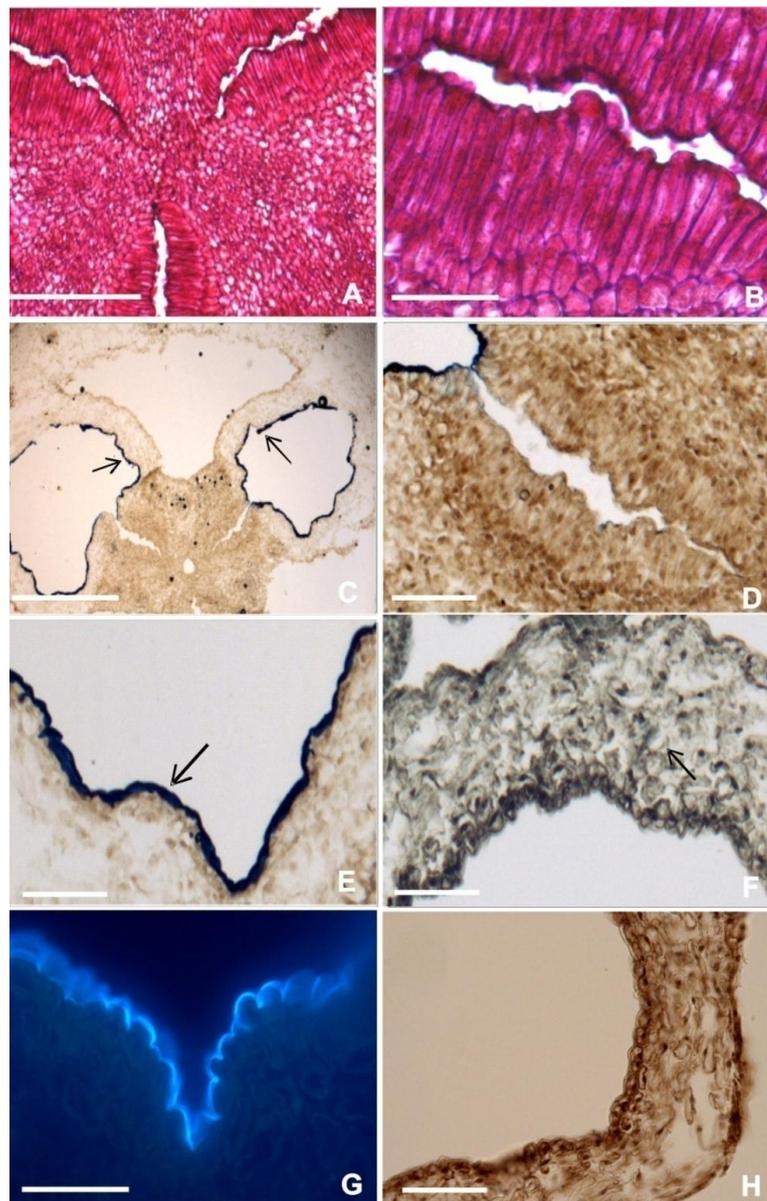


Figura 7. Localização *in situ* das principais classes de metabólitos presentes nos nectários septais de *B. paranaensis*. A,B. Reação PAS; resultado positivo intenso no protoplasto da epiderme e parênquima nectarífero. C–E. Preto de Sudão B. G. Vermelho neutro, cutícula espessa na região contentora de néctar (setas em C, E). D. note que a cutícula é quase imperceptível sobre as células da epiderme secretora. F. Acetato de cobre e ácido rubiânico. H. Cloreto férrico. O protoplasto das papilas que constituem a região contentora de néctar apresenta resultado positivo para ácidos graxos (F) e compostos fenólicos (H). Barras: 75µm (B,D–H), 150µm (A,C).

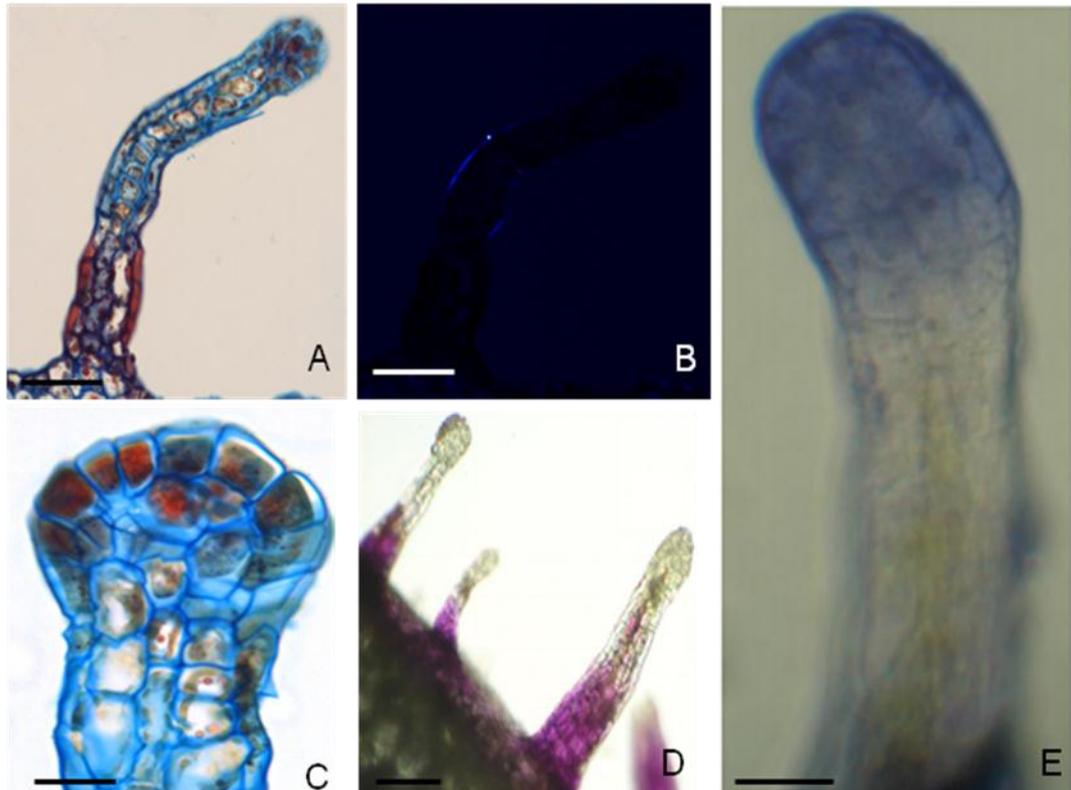


Figura 8. Emergências não-vascularizadas de *Barbacenia paranaensis*. A–C. Estrutura das emergências; A. células da epiderme no ápice da glândula com conteúdo denso, e células da base da glândula com parede espessa e corada com safranina. B. A parede espessa não brilha sob luz polarizada. C. ápice da epiderme. D. Teste com vermelho neutro evidenciando a impregnação de compostos lipofílicos na parede, provavelmente suberina. E. Teste com reagente de Nadi indicando ocorrência de terpenos no interior das células apicais da emergência. Barras: 30 μ m (C,E), 50 μ m (A,B), 75 μ m (D).

Visitantes florais

O recurso floral mais procurado em *B. paranaensis* pelos visitantes florais foi o néctar. Foram registrados nove visitantes florais (Figura 9). O único polinizador efetivo foi *Phaethornis pretrei* (Lesson; Delattre, 1839), pertencente a sub-família Phaethornitinae, responsável por 28% do total de visitas observadas. A visita do beija-flor foi registrada durante o pico de floração, com uma frequência de duas trajetórias de visitas na área de observação por hora, entre 06:00h e 18:00h. Cada visita dura de três a cinco segundos por flor e são visitadas em média seis flores por indivíduo (n=25) em um mesmo agrupamento floral. Em alguns casos, o polinizador

alterou a rota de visita dentro da mancha visitando muitas flores em uma mesma sessão de flores. *Phaethornis pretrei* apresenta um comportamento em rotas-de-visitas e percorrendo rotas fixas de forrageamento, visitando as flores de maneira sistemática, podendo cobrir longas distâncias e ajustar seu tempo de retorno às flores conforme o néctar é repostado (FEINSINGER; COLWELL,1978). O retorno aos pontos de observação ocorreu em torno de 30 a 60 minutos, comumente alterando as plantas e conjunto de flores visitadas.

O polinizador se aproximou da flor em vôo direto e permaneceu em vôo durante a visita. A porção frontal da cabeça é inserida na entrada da corola, posicionando o bico na parte mais profunda da base da corola. Durante a visita, o beija-flor sugou o néctar extravasado da região contentora de néctar, em torno das fendas. Não foi possível observar se o polinizador forçou a abertura das fendas, inserindo a língua no interior dessa região, esgotando o conteúdo armazenado ou se é capaz apenas de coletar o conteúdo extravasado. Durante estes movimentos o polinizador conectou a porção frontal da cabeça com o conjunto de anteras e estigma promovendo a transferência dos grãos de pólen entre flores.

Os demais visitantes florais (Figura 9) embora mais abundantes, como *Apis mellifera* (Linnaeus,1758), raramente entraram em contato com as estruturas reprodutivas da flor. Ao entrar no tubo floral direcionavam-se diretamente ao nectário, sem tocar o estigma. Em algumas ocasiões foi observado *A. mellifera* consumindo pólen e eventualmente tocando o estigma da mesma flor, podendo atuar como um polinizador ocasional e/ou pilhador. Essas visitas foram mais frequentes durante o período matutino, iniciando às 05:00h e intensificou ao longo da manhã, em que o período de maior atividade ocorre das 09:00h até 13:00h. A

partir desse horário as visitas começam a diminuir. Não houve registros de visitantes crepusculares ou noturnos.

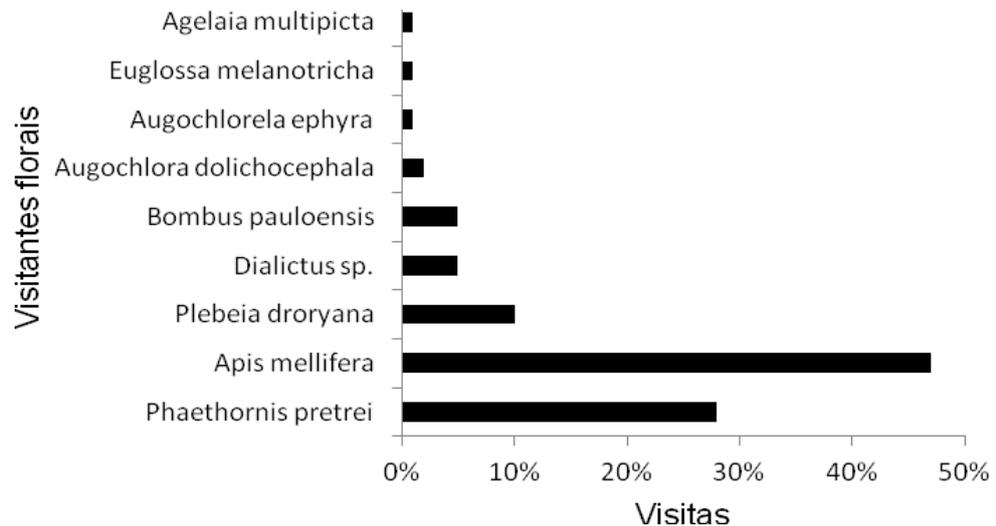


Figura 9. Visitantes florais das flores de *B. paranaensis*, no município de Tibagi-PR.

Biologia reprodutiva

A maior porcentagem de formação de frutos maduros em *B. paranaensis* ocorreu em condições naturais nos dois anos de estudo. Entre as polinizações experimentais a maior formação de frutos ocorreu no tratamento de polinização cruzada, sendo maior em 2013, obtendo o maior número de sementes de todos os tratamentos. No tratamento de autopolinização, a formação de frutos foi maior no ano de 2014 comparado com ano de 2013, porém com baixa média de sementes formadas. Há diferença significativa entre a formação de sementes nos tratamentos de polinização cruzada e autopolinização ($Q= 5,6$; $p= 0,01$). Em ambos os anos houve formação de frutos em autopolinização espontânea. O tratamento de apomixia foi o único que não resultou em frutos (Tabela 3).

Tabela 3. Testes reprodutivos realizados nos anos de 2013 e 2014 em populações de *Barbacenia paranaensis* localizadas no município de Tibagi, PR. % Frutificação e número de flores utilizadas para cada tratamento (*n*). Média de sementes e número de frutos produzidos (*n*).

Tratamentos	2013		2014	
	frutificação (<i>n</i>)	Nº Médio de sementes (<i>n</i>)	frutificação (<i>n</i>)	Nº Médio de sementes (<i>n</i>)
Polinização cruzada	24% (25)	877 (6)	48% (23)	986 (11)
Autopolinização	21% (25)	104 (5)	17% (23)	66 (4)
Autopolinização espontânea	12,5% (24)	95 (3)	9% (23)	150 (2)
Apomixia	0% (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Controle	40% (25)	452 (10)	65 % (23)	567(15)

Com exceção das amostras do teste de apomixia, em todos os tratamentos foi observado o crescimento do tubo polínico após uma semana de polinização (Figura 10). As amostras de todos os tratamentos demonstraram que os grãos de pólen germinados até 72 horas de polinização não atingiram a base do estilete, demonstrando tempo insuficiente para alcançar os óvulos. Somente após 196 horas foi possível observar a penetração dos tubos polínicos nos óvulos.

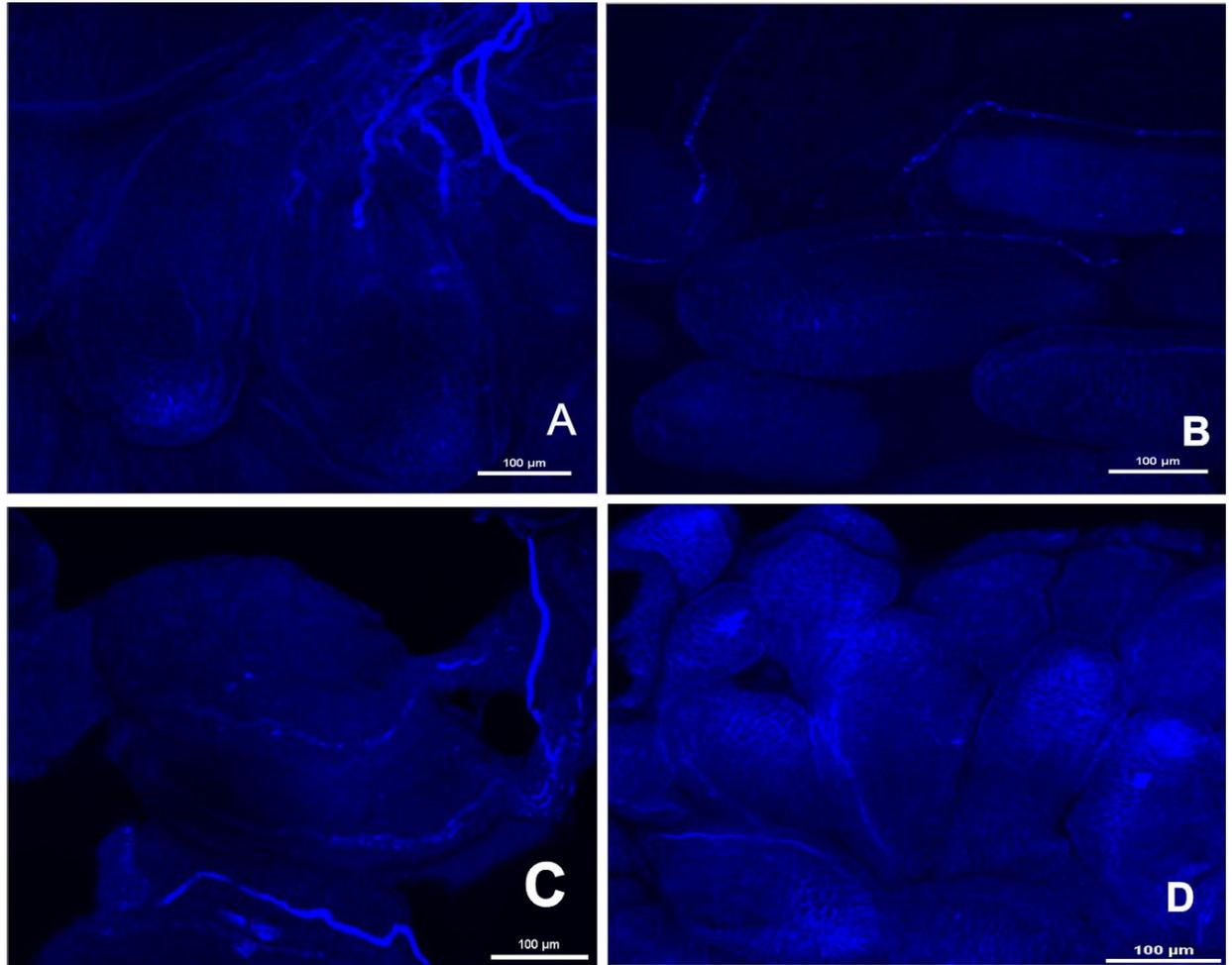


Figura 10. Análise de crescimento *in situ* dos tubos polínicos das amostras de polinizações experimentais em *B. paranaensis* realizados em microscopia de epifluorescência. A-D. Note o crescimento do tubo polínico nos óvulos, indicando que não há restrição química evitando a formação de frutos. A. Tratamento de polinização cruzada após 272 horas de polinização. B. Autopolinização, com grãos de pólen proveniente da mesma flor, após 196 horas de polinização. C. Autopolinização, com grãos de pólen proveniente do mesmo indivíduo, após 272 horas de polinização. D. Autopolinização espontânea após 196 horas de polinização.

Discussão

O padrão de floração de *B. paranaensis* pode ser considerado do tipo “big bang” e padrão irregular com frequência anual, de acordo com os padrões propostos por Gentry (1974) e Newstrom *et al.* (1994), respectivamente. Os indivíduos apresentam pico de floração uma vez ao ano, em um curto período, porém há eventos esporádicos de produção de algumas flores ao longo do ano. O pico de floração é uma característica típica da família (SAZIMA, 1978).

Barbacenia paranensis apresenta sobreposições de fenofases reprodutivas em uma mesma época, sendo observados flores e frutos em diferentes estádios de desenvolvimento em um mesmo indivíduo. Esse comportamento foi registrado por algumas espécies do gênero *Vellozia* (NEVES, 2009). Outros indivíduos mantêm a produção de novas flores por meses consecutivos, podendo durar de um a quatro meses, ao contrário de alguns indivíduos que passam por intervalos de ausência total de produção de flores durante todo o período avaliado.

Os estudos fenológicos relacionam os ciclos de vida dos vegetais com fatores climáticos, e as variáveis de temperatura e pluviosidade influenciam a fase reprodutiva das plantas (OPLER *et al.*, 1980; ARROYO *et al.*, 1981). A maior produção de flores está relacionada com o mês mais quente e chuvoso (fevereiro), compondo um cenário de produção floral em massa, com cerca de 50% dos indivíduos analisados em flor por um curto período. Esse resultado corrobora as espécies de *Vellozia* que sincronizam a produção de flores com precipitações, considerada uma adaptação em ambientes rupestres (JACOBI; SARTO 2007). A frutificação não apresentou correlação com os fatores climáticos, ocorrendo após dois meses à floração.

Os atributos florais, tais como, formato tubular da flor, coloração forte e arroxeadas das tépalas, antese diurna, separação espacial da câmara nectarífera em relação aos estigmas e anteras e o néctar apresentado como principal recompensa floral corroboram com a polinização ornitófila (FAEGRI; VAN der PIJL, 1980), como foi observado em *B. paranensis*. A recompensa floral mais consumida pelos visitantes florais foi o néctar, presente em grandes volumes e com alta concentração de açúcar, reforçando adaptações relacionadas à polinização por beija-flores.

Barbacenia paranaensis apresenta nectário septal, assim como a maioria das flores monocotiledôneas. As câmaras nectaríferas são encontradas na região da porção supraovariana. As células da epiderme e do parênquima nectarífero apresentam conteúdo polissacarídeo, visualizado pela reação PAS, condizente com a composição química típica do néctar (SMETS *et al.*, 2000).

Na região contentora do néctar foi detectada uma espessa cutícula nas papilas, sendo um possível indicador de que não há reabsorção de néctar. Esse resultado corrobora as observações realizadas em campo, em que flores ensacadas e sem interferência de visitantes florais, apresentaram um volume abundante de néctar, formando gotículas pelo tubo floral. A coloração arroxeada no nectário é justificada pela presença de compostos fenólicos totais apresentando propriedades antioxidantes.

Os osmóforos, glândulas produtoras de fragância, possuem parte basal lignificada. O ápice dos osmóforos, encontrados na superfície externa do ovário, indica produção de terpenos. A parede dos osmóforos indica que há impregnação de suberina, reagindo com safranina e vermelho neutro, e não reagindo sob a luz polarizada.

A maior frequência de visitas do polinizador efetivo, *P. pretrei* ocorreu no pico da floração, essa espécie também foi registrada como polinizador de *Barbacenia blanchetii* na Chapada da Diamantina (MACHADO *et al.*, 2009). Esses beija-flores realizam visitas rápidas em cada indivíduo e podem voar por longas distâncias em pouco tempo (GILL, 1988), visitando mais plantas do que os visitantes que passam muito tempo em cada indivíduo. A posição pendente da flor é mais atrativa do que flores eretas ou próximas do chão, e também um facilitador da liberação de pólen enquanto o beija-flor se alimenta, encostando a porção frontal da cabeça nos

estames e carregando o pólen até o estigma de outras flores (SAZIMA, 1978). O bico longo, arqueado e com língua longa é vantajoso para exploração de néctar devido ao formato tubular de *B. paranaensis*.

Os demais visitantes florais foram considerados polinizadores ocasionais ou pilhadores, devido às dimensões de seu corpo não atingirem a altura do estigma durante o consumo do néctar. As visitas florais ocorreram principalmente no período da manhã, período que ocorreu maiores volumes e concentrações de açúcar no néctar, principalmente em flores recém-abertas. O acompanhamento da dinâmica de produção do néctar em flores ensacadas ao longo do período de antese permitiu determinar o efeito de remoção na produção de néctar. Com isso, podemos considerar que há reposição do néctar durante todo o período analisado, com redução progressiva do volume repostado à medida que a flor fenece. A concentração do néctar encontrada em *B. paranaensis* apresenta valores aproximados com *Manettia cordifolia* Mart. (Rubiaceae), a qual produz $23,2 \pm 0,97\%$ Brix e também é polinizada por *P. pretrei* (CONSOLARO, 2004).

Os tratamentos reprodutivos realizados nos anos de 2013 e 2014 resultaram em maior porcentagem de frutificação nas flores do grupo controle (sem manipulação), acompanhadas em polinização aberta. Há diferença significativa entre o número de sementes dos tratamentos de polinização cruzada e autopolinização, evidenciando que uma provável depressão endogâmica. No primeiro ano de estudo foi constatada a ocorrência de autopolinização espontânea, os experimentos de reprodução cruzada no segundo ano foram repetidos em flores emasculadas, de modo a evitar a mistura de pólen oriundo da mesma flor com pólen de indivíduos diferentes. É provável que essa injúria às flores, a emasculação, tenha interferido na

capacidade de formação e desenvolvimento de frutos, fato também registrado em *Palicourea rigida* (Rubiaceae) por Silva (1995).

Possivelmente a autopolinização espontânea ocorra no período pré-antese, pois os estigmas estão receptivos e o pólen está disponível mesmo antes da flor completar a abertura total da corola. O equilíbrio entre flores longistilas e brevistilas, ou seja, uma razão de 1:1 entre os morfos florais dentro de uma população é denominada de isoplelia. A isoplelia é esperada para uma população distílica (GANDERS, 1979; DULBERGER, 1992; CASTRO; OLIVEIRA, 2002; ENDELS *et al.*, 2002). Esse equilíbrio não foi encontrado em *B. paranensis*, apresentando maior proporção de flores longistilas. A ausência de isoplelia na população possa ser explicada pela reprodução vegetativa predominante ou autocompatibilidade parcial em algumas espécies (ORNDUFF, 1986). Segundo Barringer (2007), as espécies autógamias podem apresentar vantagens ecológicas, como a fixação de genes favoráveis na população e segurança reprodutiva em ambientes com populações pequenas (LLOYD, 1992) ou em populações fragmentadas (CONSOLARO, 2004).

Barbacenia paranensis também apresenta propagação clonal, formando agrupamentos vegetativos de diferentes tamanhos e variados números de frentes com ramos florais por moita. Estratégias de crescimento assexuado combinadas com reprodução sexuada têm vantagens seletivas em ambientes perturbados, aumentando as chances de sobrevivência de indivíduos. Possivelmente, esse mecanismo não altera a diversidade genética existente, reduzindo os efeitos da deriva genética ao longo das gerações na população.

Em *B. paranaensis*, não foi encontrado impedimento do crescimento dos tubos polínicos no interior dos estigmas e penetração das micrópilas nos óvulos em nenhum dos tratamentos, exceto em apomixia. Este padrão reprodutivo indica não

haver um controle genético que restrinja a fecundação de óvulos por grãos pólen oriundos da mesma flor. Embora estudos de reprodução experimental sugiram a ocorrência de sistemas de autoincompatibilidade parcial para a família Velloziaceae, com base nas frequências de frutificação (SAZIMA, 1978; JACOBI; SARTO, 2007), apenas em *V. squamata* foi observada o crescimento do tubo polínico e a fecundação de óvulos com pólen da mesma flor (OLIVEIRA *et al.*, 1991). A quebra da autoincompatibilidade tem ocorrido de forma repetida ao longo da evolução em angiospermas, influenciando a estrutura genética das populações (STONE, 2002). Esse mecanismo pode ser considerado um dos pontos estáveis e alternativos na evolução dos sistemas reprodutivos, demonstrando que tanto a autofecundação como a polinização cruzada, caracterizam um sistema misto de reprodução. Tal sistema é considerado evolutivamente estável, pois possui vantagens de recombinação gênica e assegura à manutenção do genótipo parental, que geralmente está bem adaptado as condições ecológicas do ambiente (SCHEMSKE; LANDE, 1985; BARRETT; ECKERT, 1990; GARCÍA; VILLALOBOS, 2007).

Como observado em campo, indivíduos produzem muitas flores simultaneamente no pico de floração, estimulando o polinizador a visitar várias flores de um mesmo indivíduo, possivelmente contribuindo para o aumento de autofecundação. Porém, o comportamento de rotas de visitas do beija-flor *P. pretrei* em rotas definidas cobrindo toda a população, contribui em um segundo momento, para a transferência polínica entre manchas de indivíduos distantes na mesma área e para a conexão entre áreas distantes ao abandonar o ponto de exploração e retornar após 30-60 minutos. A presença dos demais visitantes florais pode também resultar em menor disponibilidade de néctar para o beija-flor, fazendo com que o polinizador procure fontes de recurso alimentar em de manchas populacionais

distantes (MALOOF, 2001; MCDADE; WEEKS, 2004). Esse comportamento pode favorecer a polinização cruzada dentro de uma população e conseqüentemente aumentar a amplitude de dispersão polínica e gênica, garantindo a coesão genética entre subpopulações.

A distribuição geográfica de *P. pretrei* ocorre na Bolívia, Paraguai, norte da Argentina e no Brasil, abrangendo os estados do Maranhão até Rio Grande do Sul (GRANTSAU, 1989), ocupando habitats de matas secas, savanas e cerrado. Essa ampla distribuição do polinizador juntamente com o sistema misto de reprodução não são plausíveis para explicar a distribuição geográfica restrita atual de *B. paranaensis*.

O estudo da biologia reprodutiva revelou a ocorrência de autocompatibilidade em um sistema misto de reprodução, que combina a ocorrência de autopolinização espontânea eventual e propagação vegetativa, com alta frequência de reprodução cruzada mediada por *P. pretrei*. O comportamento de polinização com rotas de visitas definidas e ampla área de forrageamento deve contribuir para ampla dispersão polínica, favorecendo a polinização cruzada entre indivíduos de *B. paranaensis* dentro de uma mesma área e mantendo o fluxo polínico entre as áreas.

Referências

- AYRES, M.; AYRES, J.M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Ong Mamirauá: MCT-CNPq, Belém, PA
- AMORIM, F.W.; GALETTO, L.; SAZIMA M. Beyond the pollination syndrome: nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). **Plant Biology**, v. 15, n. 2, p. 317-327, 2013.
- ARROYO, M.T.K.; ARMESTO, J.J.; VILLAGRIN, C. Plant phenological patterns in the high Andean Cordillera of central Chile. **Journal of Ecology**, v.69, p. 205-223, 1981.
- ASCENSÃO, L.; MOTA, L.; CASTRO, M. M. Glandular Trichomes on the Leaves and Flowers of *Plectranthus ornatus*: Morphology, Distribution and Histochemistry. *Annual Botanic*, v.84, p. 437-447, 1999.
- BARRETT, S. C. H.; ECKERT, C. G. Variation and evolution of mating systems in seed plants. In: Kawano, S. **Biological approaches and evolutionary trends in plants**, Academic Press, London, p.229-254.1990.
- BARRINGER, B.C. Polyploidy and self-fertilization in flowering plants. **American Journal Botanic**, v.94, p.1527-1533, 2007.
- BORBA, E.L.; FUNCH R.R.; RIBEIRO, P.L.; SMIDT, E.C.; SILVA-PEREIRA, V. Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophranitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. **Plant Systematic Evolution**. v.267, p. 129-146, 2007.
- CASTRO, C.C.; OLIVEIRA, P.E. Pollination biology of distylous Rubiaceae in the Atlantic Rain Forest, SE Brazil. **Plant Biology**, v.4 p. 640-646, 2002.
- CHOI, H.J.; DAVIS, A.R.; COTA-SANCHÉZ, H. Comparative floral structure of four new world *Allium* (Amaryllidaceae) species. **Systematic Botanic**, v.36, n.4, p. 870-882, 2011.
- CONCEIÇÃO, A. A.; FUNCH, L.S.; PIRANI, J.R. Reproductive phenology, pollination and seed dispersal syndromes on sandstone outcrop vegetation in the “Chapada Diamantina”, northeastern Brazil: population and community analyses. **Revista Brasileira Botânica**,v. 30, n.3, p. 475-485, 2007.
- CONSOLARO, H.N. **Biologia reprodutiva de espécies de Rubiaceae de Matas do Triângulo Mineiro**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2004.
- COSTA, C. B. N.; LAMBERT, S. M.; BORBA, E. L.; QUEIROZ, L. P. Post-zygotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* Complex (Leguminosae –Caesalpinioideae). **Annals of Botany**. v.99, p. 625-635. 2007.

DAFNI, A. **Pollination ecology**: - a practical approach. New York: Oxford University Press, p.250, 1992.

DAVID, R. ;CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles Du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Paris**,v.258, p.1338-1340, 1964.

DULBERGER, R. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In: Barret, S. C. H. (ed.). **Evolution and function of heterostyly**. Monographs on theoretical and applied genetics. Springer-Verlag. p.279. 1992.

ENDELS, P.; JACQUEMYN, H.; BRYNS, R.;HERMY, M. Changes in pin-thrum ratios in populations of the heterostyle *Primula vulgaris* Huds: Does imbalance affect populations persistence? **Flora**, v.197, p. 326-331, 2002.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **The principles of pollination ecology**. Pergamon Press, New York, 1980.

FEINSINGER, P.; COLWELL, R.K. Community organization among Neotropical nectar-feeding birds. **American Zoologist**, v. 18, p. 779-795, 1978.

GALETTO, L.; BERNARDELLO, L. Nectar secretion pattern and removal effects in six Argentinean Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Botanica Acta**, v.105, p. 292-299, 1992.

GANDERS, F. R.The biology of heterostyly. New Zealand. **Journal of Botany**, v. 17, p. 607-635, 1979.

GANTER, P.; JOLLES, G. **Histologie normale et pathologique**. Vols I e II. Paris, Gauthier - Villars. 1970.

GARCÍA, C. A. A.; VILLALOBOS, A. L. La estimación de la endogamia y la relación entre la tasa de fecundación cruzada y los sistemas reproductivos en plantas con flores: una interpretación de su significado evolutivo. In: EGUIARTE, L. E.; SOUZA, V.; Aguirre, X. (org.). **Ecología Molecular**, México. p. 183-213, 2007.

GENTRY, A. H. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. **Biotropica**, v.6, p.64-68, 1974.

GERLACH, G. **Botanische Mikrotechnik**. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 1969.

GIBBS, P.E.; OLIVEIRA, P.E.; BIANCHI. Postzygotic control of selfing in *Hymenaea stionocarpa* (Leguminosae – Caesalpinoidae), a bat-pollinated tree of the Brazilian cerrados. **International Journal of Plant Sciences**, v.160, p.12-18, 1999.

GILL, F.B. Trapline foraging by hermit hummingbirds: competition for an undefended, renewable resource. **Ecology**, v.69, p. 1933-1942, 1988.

GRANTSAU, R. **Os beija-flores do Brasil**. Ed. Expressão e Cultura. Rio de Janeiro, 1989. p. 233.

GUIMARÃES, G.B.; MELO, M.S.; MOCHIUTTI, N.M. 2009. Desafios da conservação nos Campos Gerais do Paraná. **Revista Geologia**, v. 5, p. 47-61, 2009.

HATSCHBACH, G.; VON LINSINGEN, L.; UHLMANN, A.; CERVI, A.C SONEHARA, J.S. Levantamento Florístico do Cerrado Paranaense e Vegetação Associada. **Boletim Museu Botânico Municipal de Curitiba**, v.67, p. 01-40, 2005.

HOLSINGER, K.E. Reproductive systems and evolution in vascular plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n.13, p. 7037–7042, 2000.

JACOBI, C.M.; SARTO, M.C.L. Pollination of two species of *Vellozia* (Velloziaceae) from high-altitude quartzitic grasslands, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v.21, n.2, p. 325-333, 2007.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco, 1962.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill, New York, 1940.

LILLIE, R.D. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 3rd ed. McGraw-Hill Co., New York, 1965.

LLOYD, D.G. Self and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. **International Journal Of Plant Sciences**, v.151, p. 370-380, 1992.

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

MAACK, R. Notas preliminares sobre clima, solos e vegetação do Estado do Paraná. Curitiba: **Arquivos de Biologia e de Tecnologia**, v.2, p. 102, 1948.

MACHADO, C. G; COELHO, A.; SANTANA, C.S; RODRIGUES, M. Beija-flores e seus recursos florais em uma área de campo rupestre da Chapada Diamantina, Bahia. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.15, n. 2, p. 267-279, 2007.

MACHADO, C.G.; Coelho, A.G., Santana, C.S.; Rodrigues, M. Beija-flores (Aves: Trochilidae) e seus recursos florais em uma área de caatinga da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Zoologia**, v. 26, n. 2, p. 255-265, 2009.

MALLOF, J.E. The effects of a bumble bee nectar robber on plant reproductive success and pollinator behavior. **American Journal of Botany**, v.88, n. 11, p. 1960-1965, 2001.

MCDADE, L.A.; WEEKS, J.A. Nectar in hummingbird-pollinated neotropical plants I: Patterns of production and variability in 12 species. **Biotropica**, v. 36, n.2, p. 196-215, 2004.

MCMANUS, J.F.A. **Histological and histochemical uses of periodic acid**. Stain Technology.v.23, p.99-10, 1948.

MELLO-SILVA, R. VELLOZIACEAE In: GIULETT, A.M.; RAPINI, A.; ANDRADE, M.J.G.;QUEIROZ, L.P.; SILVA, J.M.C. **Plantas Raras do Brasil**. Conservação Internacional, Belo Horizonte, MG. 2009. p. 392 – 398.

MELLO-SILVA, R. Velloziaceae. In **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000245>) 2013. Acesso em: 27/02/2013.

MORO, R. S.; CARMO, M. R. B. A vegetação campestre nos Campos Gerais. In: MELO, M. S. MORO, R. S.; GUIMARÃES, G. B. (Eds.). **Patrimônio Natural dos Campos Gerais do Paraná**, Ponta Grossa: Ed. UEPG. 2007. p. 93-99.

MORO, R. S. **Biogeografia do Cerrado nos Campos Gerais**. Ponta Grossa: Ed. UEPG, 2012.

NEVES, S.P.S. **Fenologia, biologia floral e polinização de espécies de Velloziaceae Endl. Em área de campo rupestre na Chapada da Diamantina, Bahia, Brasil**. Dissertação (mestrado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana. Bahia. 2009.

NEWSTROM, L.E., FRANKIE, G.W., BAKER, H.G. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva. **Biotropica**, St. Louis, v.26, n. 2, p.141-159,1994.

OLIVEIRA, P.E.; GIBBS, P.E.; BIANCHI, M. Pollination and breeding system of *Vellozia squamata* (Liliales, Velloziaceae) – a species of the Brazilian cerrados. **Botanica Acta**, v. 104 p. 392-398, 1991.

OPLER, P.A.; FRANKIE, G.W.;BAKER, H.G. Comparative phenological studies of treelet and shrub species in tropical wet and dry forests in the lowlands of Costa Rica. **Journal of Ecology**, v. 6, p.167-188,1980.

ORNDUFF, R. Comparative fecundity and population composition of heterostylous and non-heterostylous species of *Villarsia* (Menyanthaceae) in western Australia. **American Journal of Botany**, v. 73, n.2, p. 282-286, 1986.

PANSARIN, L.M.; CASTRO, M.M.; SAZIMA, M. Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catasetinae, Orchidaceae) and their relation to pollination. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 159, p. 408-415, 2009.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: theoretical and applied**. Churchill Livingstone, Edinburgh. 1985.

RITTER, L.M.O.; RIBEIRO, M.C.; MORO, R.S. Composição florística e fitofisionomia de remanescente de cerrado nos Campos Gerais, PR, Brasil – limite austral do bioma. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 379-414, 2010.

SAZIMA, M. Biologia floral de espécies de Velloziaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo. 1978

SCHEMSKE, D.W.; LANDE, R. The evolution of self fertilization and inbreeding depression in plants. II Empirical observations. **Evolution**, v. 39 p, 41-52, 1985.

SILVA, A.P. **Biologia reprodutiva e polinização de *Paulicourea rigida* H.B.K. (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade de Brasília, 1995.

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

SMETS, E. F.; RONSE, De CRAENE. L. P.; CARIS, P.; RUDALL, P. J. Floral nectaries in monocotyledons: distribution and evolution. [In:] K. L. Wilson D. A., Morrison (eds), **Monocots: Systematics and evolution**, CRIRO, Melbourne. 2000.

STONE, J.L. Molecular mechanisms underlying the breakdown of gametophytic self-incompatibility. **The Quarterly Review of Biology**, v. 77, n.1, p. 17-32, 2002.

VOGEL, S. **The Role of Scent Glands in Pollination**, 1st Ed. Smithsonian Institution, Washington, D.C, USA, 1990.

CAPÍTULO II: VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *BARBACENIA PARANAENSIS* L.B.SM. (VELLOZIACEAE), ESPÉCIE ENDÊMICA DO PARANÁ.

(Artigo a ser submetido à revista *Plant Systematic and Evolution*)

Variabilidade e estrutura genética de *Barbacenia paranaensis* L.B.Sm. (Velloziaceae), espécie endêmica do Paraná.

Resumo

Barbacenia paranaensis (Velloziaceae) é endêmica e a única representante da família Velloziaceae no Paraná. Ocorre em fragmentos disjuntos de cerrado, na região dos Campos Gerais do Paraná, apresentando distribuição geográfica restrita. O objetivo deste estudo foi avaliar o nível atual de variabilidade intra e interpopulacional e estrutura genética das populações, verificando se os padrões de distribuição genética estão relacionados com o processo ecológico dos sistemas de polinização e reprodução da espécie. Foram amostradas seis populações naturalmente disjuntas, pertencentes a três regiões geográficas no Paraná. Reações de amplificação de fragmentos genômicos, utilizando quatro *primers* de ISSR, foram realizadas em cerca de 20 indivíduos de cada população, totalizando 120 amostras. Foram obtidos 48 locos com 100% de polimorfismo. A AMOVA indicou 90% de variabilidade genética intrapopulacional, baixa divergência interpopulacional (3%) e entre regiões (7%), porém com estrutura genética (Φ_{ST}) significativa em todos os níveis de variação. O teste de Mantel indicou correlação significativa entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas das populações ($r= 0,72$ $p= 0,002$). Através da análise Bayesiana foram detectados quatro agrupamentos genéticos que não correspondem à distribuição geográfica das populações. As diferentes linhagens estão presentes nas três regiões geográficas, as quais diferem apenas quanto à frequência de ocorrência em cada uma delas. As características biológicas, reprodutivas e de estrutura genética se apresentam conforme espécies mais generalistas e amplamente distribuídas, do que sugerem as populações pequenas e disjuntas de *B. paranaensis* atualmente observadas. Possivelmente, no passado, esta tenha sido uma espécie amplamente distribuída e com populações mais numerosas e interconectadas. Atualmente, os fragmentos isolados por destruição da matriz ecossistêmica original, abrigam variabilidade genética antiga e compartilhada.

Palavras – chaves: coesão genética, distribuição geográfica restrita, ISSR.

Abstract

Barbacenia paranensis (Velloziaceae) is endemic and the only family representative of Velloziaceae in Paraná. It occurs in small disjunct cerrado fragments, in Campos Gerais from Paraná, with restricted geographical distribution. The aim of this study was to evaluate the current level of intra and interpopulational variability and the genetic structure of populations, and verify if the genetics distribution patterns are related with ecological processes of the pollination and breeding systems. Six natural populations, belonging to three geographical areas in Parana were sampled. Amplification reactions of genomic fragments using four ISSR primers were conducted in about 20 individuals from each population, totaling 120 samples. 48 loci were obtained with 100% of polymorphism. The AMOVA revealed 90% of variability within populations, low divergence among populations (3%) and among regions (7%), but with significant structure (Φ_{ST}) at all levels of genetic variation. The Mantel test indicated a significant correlation between genetic and geographical distances of populations ($r= 0,72$ $p= 0,0020$). Through Bayesian analysis were detected four homogeneous genetic groups, which do not correspond to the geographical distribution of populations. The different lineages are presented in three geographical regions, which differ only by the frequency of each lineage. Biological and breeding characteristics, and genetic structure are presented as more generalist and widely distributed species, than the small and disjunct populations currently observed and suggest. Possibly, in the past, the species was widely distributed and presented more abundant and interconnected populations. Currently, the fragments isolated by the destruction of the original matrix, harbor ancient and shared genetic variability.

Kew words: genetic cohesion, ISSR, restricted geographical distribution.

Introdução

As populações naturalmente disjuntas de *Barbacenia paranaensis* possuem distribuição geográfica restrita no estado do Paraná. São consideradas endêmicas do estado e representam o limite austral de distribuição da família Velloziaceae para a América Latina, além de ser a única representante da família ocorrente no estado (Mello-Silva 2013). Segundo Mello-Silva (2009), está incluída na lista de plantas raras do Brasil. Apesar dessa importância, há poucos estudos com essa espécie (Smith 1962; Goldbatt e Poston 1988).

A disjunção de afloramentos rochosos forma um sistema semelhante a ilhas oceânicas, denominados ilhas de habitat terrestre, onde há um isolamento espacial e restrição de fluxo gênico, fatores importantes na determinação do padrão de distribuição da variabilidade genética das espécies (Avice 1994). O nível de variabilidade genética e distribuição espacial de espécies podem estar relacionados com tamanho e densidade da população, distribuição geográfica, forma de vida, além da dinâmica de polinização e dispersão de sementes (Hamrick e Godt 1996; Nybom e Bartish 2000).

Estudos de genética de populações têm sido conduzidos nos campos rupestres brasileiros indicando alta variabilidade genética para diversos grupos de plantas com distribuição geográfica disjunta e usando diferentes marcadores moleculares (Borba et al. 2001; Barbará et al. 2007; Borba et al. 2007; Ribeiro et al. 2008; Cruz et al. 2011).

Espécies endêmicas com distribuição restrita tem demonstrado baixo nível de diversidade genética dentro das populações de diversos grupos estudados (Jesus et al. 2001; Lambert et al. 2006; Luan et al. 2006; Jesus et al. 2009). Porém outros

trabalhos demonstram maior diversidade genética intrapopulacional quando comparadas com variabilidade interpopulacional, utilizando o marcador molecular ISSR (Modareskia et al. 2012; Apte et al. 2006).

Na família Velloziaceae, alguns estudos sobre variabilidade genética foram realizados (Franceschinelli et al. 2006; Lousada et al. 2011; 2013) apresentando moderada a alta diversidade genética em *Vellozia epidendroides*, *Vellozia gigantea* e *Vellozia compacta*, sugerindo haver relação do nível de variabilidade genética com a amplitude de distribuição destes táxons ao longo da Serra do Espinhaço. Para outras espécies a alta variação genética intrapopulacional e baixa divergência entre as populações, como no complexo *Vellozia hirsuta*, podem estar relacionadas à divergência incipiente entre táxons que compartilham um pool gênico comum (Barbosa 2011).

Algumas espécies do gênero *Barbacenia* apresentam flores tubulosas e produtoras de néctar, sendo polinizadas principalmente por beija-flores (SAZIMA, 1978; CONCEIÇÃO et al., 2007; MACHADO et al., 2007; 2009). *Phaethornis pretrei* (Lesson e Delattre 1893), foi considerado o polinizador efetivo de *B. paranaensis* (Luz et al. não publicado). A sua distribuição geográfica é ampla, ocorrendo nos estados do Maranhão até Rio Grande do Sul, e também na Bolívia, Paraguai e norte da Argentina (Grantsau 1989). Apresenta comportamento de rotas de visitas (Feinsinger e Colwell 1978), favorecendo o sistema de polinização cruzada entre indivíduos de uma população. As sementes são pequenas e podem ser dispersas pela gravidade, devido à posição pendente do fruto no paredão rochoso vertical. *B. paranaensis* apresenta autocompatibilidade, caracterizando um sistema reprodutivo misto (Luz et al. não publicado).

Nesse contexto, esperamos encontrar um baixo nível de diversidade genética dentro das populações, devido à distribuição geográfica restrita da espécie e sistema misto de reprodução. Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar se o nível atual de variabilidade e de estrutura genética intra e interpopulacional das populações de *B. parananensis* são compatíveis com o sistema misto de reprodução e com a amplitude de dispersão polínica mediada por beija-flores apresentando comportamento de rotas de visitas.

Material e Métodos

Área de estudo

O relevo do território paranaense é resultante de uma formação geológica marcada pela presença de planaltos escalonados, separados por escarpas que denotam “degraus topográficos” verticalizados (Ritter et al. 2012). No Segundo Planalto Paranaense é localizada a região dos Campos Gerais do Paraná. Segundo a classificação de Koeppen, o clima da região é do tipo Cfb, ou seja, clima subtropical de altitude, mesotérmico e úmido, sem estiagem, com inverno rigoroso, geadas severas e freqüentes. As fisionomias campestres dos Campos Gerais do Paraná são classificadas como estepe higrófila (campos úmidos), formação savânica (cerrado) e estepe *stricto sensu* (campos secos) com refúgios vegetacionais rupestres (Moro e Carmo 2007).

O refúgio vegetacional rupestre refere-se às formações compostas por afloramentos de rocha em meio ao campo (Ziller e Galvão 2000), sendo esse ambiente ocupado por populações de *B. paranaensis*. A espécie possui hábito rupícola ou saxícola, com distribuição microespacial verticalizada em afloramentos rochosos destacados em remanescentes disjuntos de cerrado. Foram amostradas

seis populações disjuntas de *B. paranaensis* distribuídas em apenas três municípios no Paraná (Tibagi, Ortigueira e Sengés) cobrindo toda a amplitude de distribuição geográfica da espécie (Figura 1).

Extração e amplificação do DNA

A extração do DNA total foi realizada a partir de folhas frescas, conservadas em gelo, seguindo o protocolo de CTAB 2X de Doyle e Doyle (1987). O DNA total foi armazenado em ultrafreezers (-80°C) e todas as amostras foram tombadas no banco de DNA total de Plantas da Universidade Federal do Paraná (DNAUPCB). Reações de amplificação foram realizadas utilizando quatro *primers* ISSR de sequências aleatórias, totalizando de 120 indivíduos das seis populações distribuídas em três regiões geográficas (Tabela 1).

As reações de amplificação possuem um volume final de 20 µl, sendo constituídas por: tampão 1X, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM de *primer*, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e cerca de 30 a 50 ng de DNA genômico. A amplificação foi realizada em programa de extensão inicial a 94°C por 1,5 min, seguido de 37 ciclos de amplificação, sendo 94°C por 40 segundos a desnaturação; intervalos de 47° a 50°C por 45 segundos para o anelamento (Tabela 2); 72°C por 1,5 minutos para a extensão e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TAE 0,5X, correndo em voltagem de 120 V por aproximadamente 2 horas. Os géis foram corados em solução 0,5 mg/ml de brometo de etídio e fotodocumentados. O tamanho molecular dos fragmentos foi estimado utilizando Ladder de 100 pb (Ludwig Biotechnology).

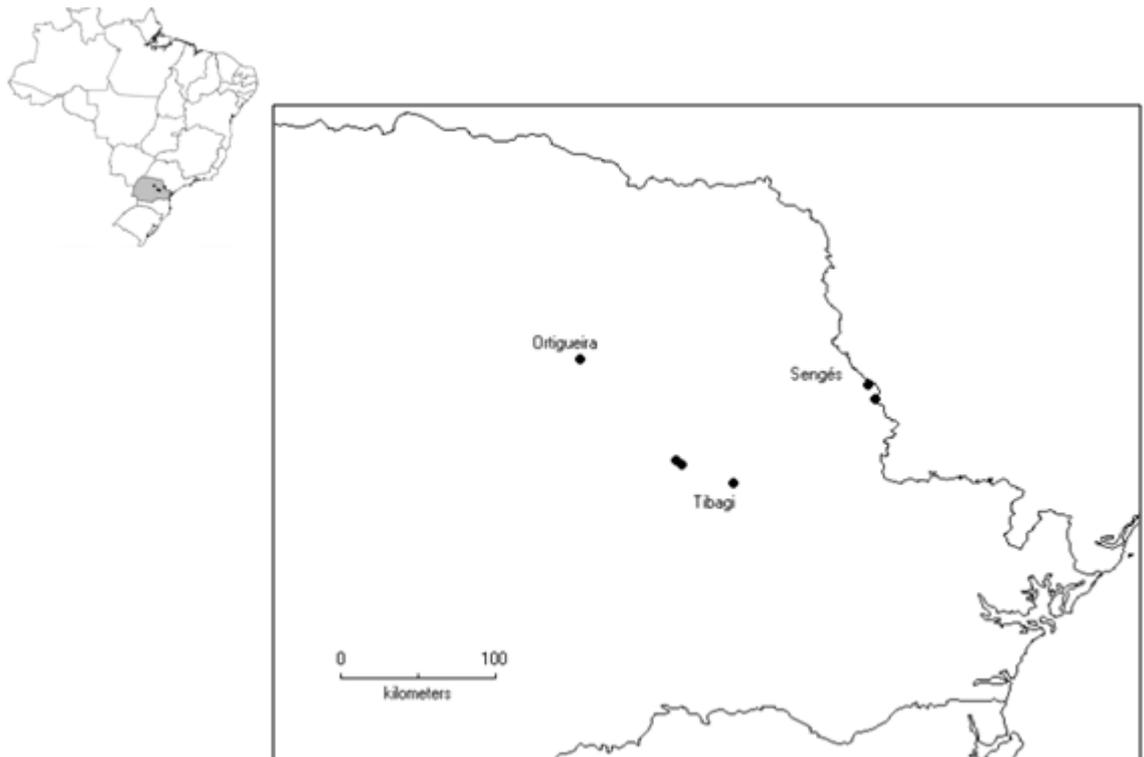


Figura 1. Distribuição espacial das populações de *Barbacenia paranaensis*.

Análise dos dados

Os perfis eletroforéticos foram codificados como presença (1) ou ausência (0) de uma banda, as bandas de tamanho molecular em um mesmo *primer* foram consideradas homólogas, os locos que apresentaram baixa resolução foram excluídos da análise (Williams et al. 1993; Thormann et al. 1994; Rieseberg 1996). Construiu-se uma matriz de fenótipos ISSR, a qual foi submetida a uma análise de variância molecular (AMOVA), utilizando o programa GenAlEx 6.3 do Excel® (Peakall e Smouse 2006). Através da AMOVA foi quantificada a variabilidade entre as três regiões geográficas, a proporção da diversidade genética intraespecífica atribuída à diferença interpopulacional. A análise da estrutura genética (Φ_{ST}) foi produzida entre os pares de populações. A porcentagem de locos polimórficos (P), índice de diversidade de Shannon (I), heterozigosidade média esperada para as populações (H_e) e distância genética média entre as populações (Unbiased Genetic

Distance Nei) também foram demonstrados pelo programa GenAlEx 6.3.

Para avaliar se há correlação entre as matrizes de valores com distâncias genéticas de Nei e distâncias geográficas em quilômetros de todas as populações, foi realizado o teste de Mantel através do programa BioEstat 5.3 (Ayres et al 2007). Para verificar a ordenação entre os indivíduos das populações foi realizada uma Análise de Coordenadas Principais (PCO), a partir da matriz binária com base no coeficiente de Jaccard, através do programa Past (Hammer e Ryan 2001). Para detectar o número de agrupamentos genéticos homogêneos (K), foi realizada uma análise Bayesiana através do programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al. 2000). O número de agrupamentos testados foi de K= 1 até K=7 e foram realizadas oito corridas independentes para cada simulação. Cada corrida conteve 1.000.000 de iterações de Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), com um *burn-in* inicial de 100.000 iterações, utilizando *admixture model* com alelos correlacionados entre populações. Para inferir o número de agrupamentos genéticos, foi calculado o ΔK a partir das diferenças sequenciais das médias do log da probabilidade de K [$\ln P(K)$], através de todas as corridas, como descrito por Evanno et al. (2005).

Tabela 1. Distribuição geográfica das populações de *Barbacenia paranaensis* encontradas no estado do Paraná com indicação de município (Mun.); População e código (Pop.- cod.); Número de indivíduos para confecção da matriz de PCR-ISSR (Nº ind.); Coordenadas geográficas; Altitude (Alt.); Extensão do afloramento rochoso (Ext), Altura do afloramento (Alt.).

Mun.	Pop.- cod.	Nº ind.	Coordenadas geográficas	Altit.(m)	Ext.(m)	Alt.(m)
Tibagi	Salto Puxa Nervos - SPN	30	24°33'50"S;50°31'5"W	766	300	25
Tibagi	Morro do Jacaré – MJ	15	24°35'16"S;50°28'37"W	1045	200	10
Tibagi	Rincão dos Assis – RA	17	24°42'12"S;50°10'32"W	1086	300	20
Ortigueira	Morro da Pedra Branca – MPB	25	23°58'1"S;51°4'31"W	1280	300	60
Sengés	Vale do Corisco – VC	16	24°12'19"S;49°21'7"W	890	500	40
Sengés	Rio Funil – RF	17	24°7'16"S;49°23'35W	661	400	60

Resultados

Foram utilizados quatro *primers* resultando em 48 locos e 100% de polimorfismo. Através da AMOVA foi detectado 90% de variabilidade genética intrapopulacional, baixa divergência interpopulacional (3%) e entre regiões (7%), porém todos esses valores apresentando estrutura genética (Φ_{ST}) significativa. Há correlação significativa entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas das populações. Através da análise Bayesiana foram detectados quatro agrupamentos genéticos que não correspondem à distribuição geográfica das populações. As diferentes linhagens estão presentes nas três regiões geográficas, as quais diferem apenas quanto à frequência de ocorrência em cada uma delas.

Polimorfismo e variabilidade genética

Sete *primers* de ISSR foram testados, porém apenas quatro amplificaram as regiões específicas e apresentaram boa resolução de leitura nos géis de agarose para as amostras de *B. paranaensis*, totalizando 48 locos e 100% de polimorfismo. O *primer* UBC 840 apresentou o maior número de fragmentos, seguido por UBC 827, Manny e por último UBC 899, variando de 8 a 16 fragmentos polimórficos. (Tabela 2).

Tabela 2. *Primers* de ISSR, sequências, temperatura de anelamento (T °C), número de fragmentos polimórficos (NF) e porcentagem de fragmentos polimórficos (FP) em *Barbacenia paranaensis*.

<i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i>	Temp. anelamento (°C)	NF (FP%)
UBC 840*	5'-(GA)8YT-3'	50	16 (100)
UBC 827*	5'-(AC)8G-3'	50	12 (100)
UBC 899*	5'-(CA)6RG-3'	47	8 (100)
MANNY*	5'-(CA)4RC-3'	50	12 (100)
UBC 808	5'-(AC)8C-3'	53	--
OMAR	5'-(GA)4RC-3'	50	--
MAO	5'-(CT)4RC -3'	50	--

* *Primers* usados na construção de uma matriz de fenótipos ISSR.

A média de polimorfismo foi 89,58%, o nível de diversidade resultou em 5,13 e a heterozigidade média esperada foi de 0,361. A população MPB apresentou o maior polimorfismo (97,92%), assim como o maior nível de diversidade, 0,589 (\pm 0,021) e heterozigidade esperada, 0,416 (\pm 0,017). As populações MJ e VC apresentaram o menor polimorfismo, indicando 83,33%, e o menor nível de diversidade e heterozigidade esperada foram encontrados na população VC, 0,477(\pm 0,035) e 0,335 (\pm 0,026), respectivamente (Tabela 3).

A variabilidade genética estimada a partir de análise de variância molecular (AMOVA) para a espécie indicou baixa divergência entre as três regiões geográficas (7%), mas apresentou nível de significância 0,067 ($P < 0,001$). Alta variação intrapopulacional foi encontrada (90%), com o valor significativo de estruturação 0,037 ($P < 0,001$). Há baixa variação interpopulacional (3%), com significância, apresentando $\Phi_{ST} = 0,102$ ($P < 0,001$) (Tabela 4).

Há correlação positiva e significativa entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas realizadas a partir do teste de Mantel ($r = 0,72$ $p = 0,002$). A maior distância genética (0,103) ocorreu entre RF e SPN, localizadas no município de Sengés e Tibagi, respectivamente. Seguidas por RF e MPB (0,097) localizadas em Sengés e Ortigueira, respectivamente. As distâncias geográficas entre esses pares de populações são valores superiores a 100 Km. A menor distância genética foi entre as populações MJ e SPN (0,008), ambas localizadas no município de Tibagi e com menor distância geográfica (5 km) encontrada entre todas as populações (Tabela 5).

Tabela 3. Diversidade genética das seis populações de *Barbacenia paranaensis*, baseada em 48 locos polimórficos de ISSR. P = porcentagem de locos polimórficos; I = Índice de diversidade de Shannon; uHe = heterozigosidade esperada. Erro padrão em parênteses. Para nomes das populações veja tabela 1.

Região	População	P %	I (\pm DP)	uHe (\pm DP)
	SPN	93,75	0,503 (\pm 0,029)	0,345 (\pm 0,023)
Tibagi	MJ	83,33	0,478 (\pm 0,037)	0,340 (\pm 0,028)
	RA	91,67	0,538 (\pm 0,028)	0,382 (\pm 0,022)
Ortigueira	MPB	97,92	0,589 (\pm 0,021)	0,416 (\pm 0,017)
Sengés	VC	83,33	0,477 (\pm 0,035)	0,335 (\pm 0,026)
	RF	87,50	0,493 (\pm 0,033)	0,347 (\pm 0,025)
	Média	89,58 (\pm 2,41)	0,513 (\pm 0,013)	0,361 (\pm 0,010)

Tabela 4. Análise de Variância Molecular (AMOVA) nas seis populações de *Barbacenia paranaensis* ocorrentes no Paraná.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componente de variação	% variação total	Φ_{st} (P)
Interregional	2	95,354	47,677	7	0,067(0.001)
Interpopulacional	3	53,359	17,786	3	0,037 (0.002)
Intrapopulacional	114	1186,071	10,404	90	0,102 (0.001)
Total	119	1334,783		100	

Tabela 5. Matriz de distância genética média ("Unbiased Genetic Distance", Nei 1978) (diagonal abaixo) e de distância geográfica (diagonal acima) em quilômetros entre as populações de *Barbacenia paranaensis* ocorrentes no estado do Paraná. Para nomes das populações veja tabela 1.

População	SPN	MJ	RA	MPB	VC	RF
SPN	-	5	42	90	125	130
MJ	0,008	-	37	92	120	118
RA	0,056	0,072	-	125	102	110
MPB	0,078	0,087	0,068	-	180	173
VC	0,082	0,081	0,079	0,078	-	10
RF	0,103	0,090	0,082	0,097	0,061	-

Estrutura genética

Houve uma estruturação discreta entre os indivíduos que pertencem à mesma região geográfica. Houve algumas sobreposições entre indivíduos que apresentaram menor distância genética, como é o caso das populações SPN e MJ. Notam-se indivíduos da população MPB com distribuição mais heterogênea quando comparados aos indivíduos das outras populações (Figura 2).

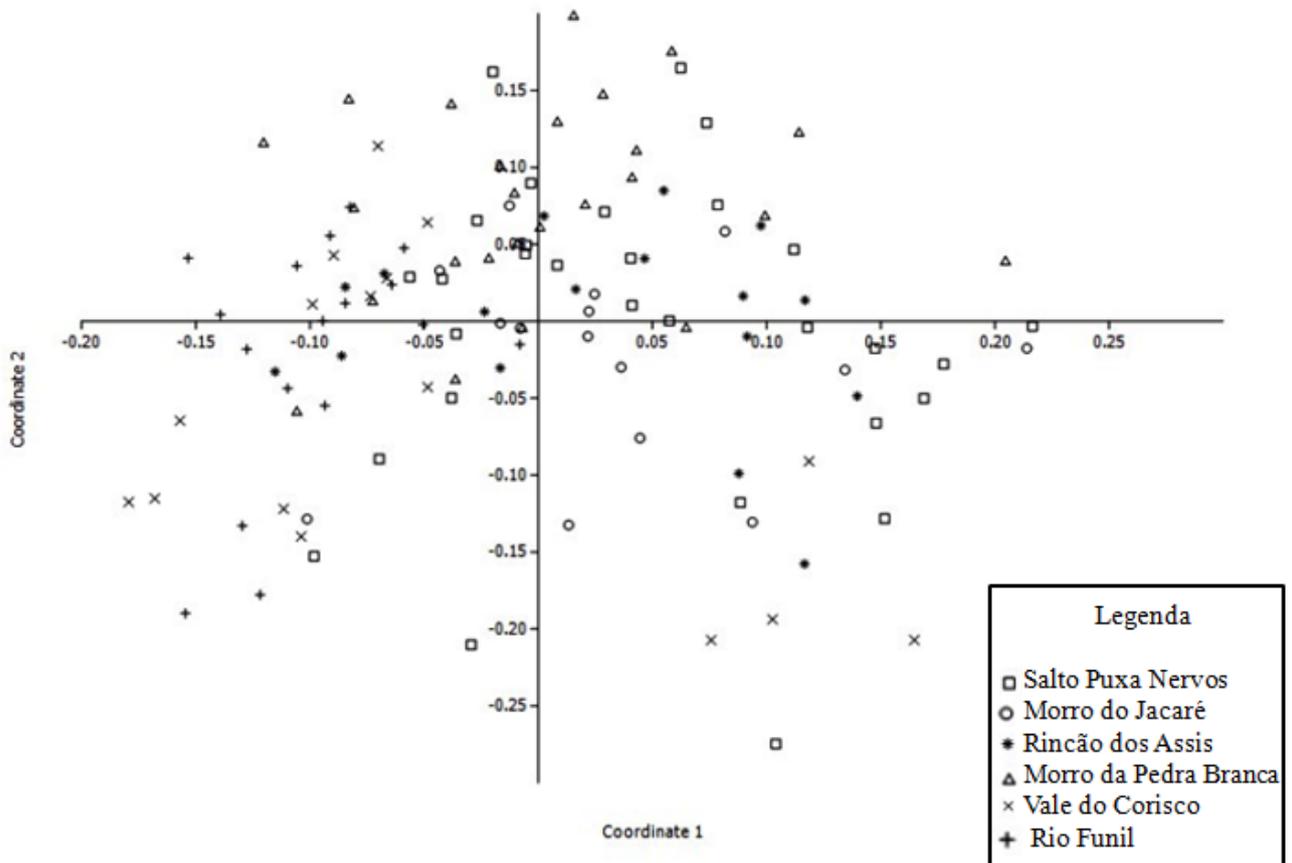


Figura 2 - Análise de coordenadas principais (PCO) baseada em 48 locos de ISSR em seis populações de *Barbacenia paranaensis* ocorrentes no estado do Paraná.

Na análise Bayesiana, os valores de ΔK indicam a presença de quatro agrupamentos genéticos homogêneos (*clusters*). Todas as populações apresentam os quatro *clusters*. Porém as populações SPN, MJ e RA, localizadas no município de Tibagi, são representadas principalmente pelos clusters 2 e 4. A única população

localizada em Ortigueira, MPB, é formada com predomínio do *cluster* 1. As populações VC e RF, localizadas em Sengés, estão estruturadas principalmente pelos *clusters* 2 e 3. Nota-se uma maior predominância do *cluster* 2 em todas as populações, exceto em MPB (Figura 3).

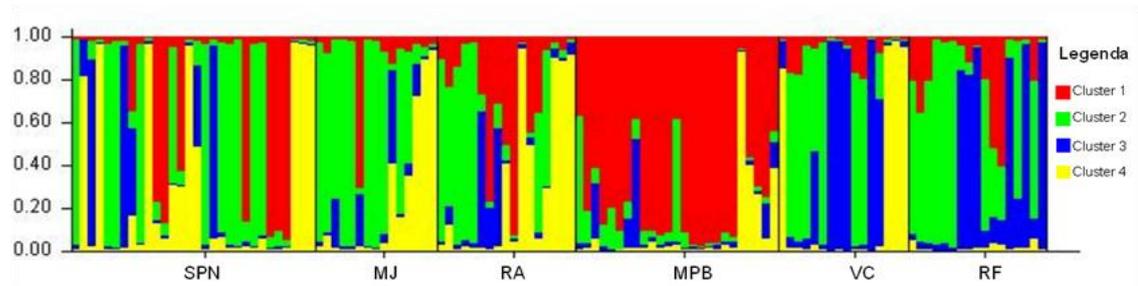


Figura 3 - Representação da estrutura genética inferida por análise Bayesiana de seis populações de *Barbacenia paranaensis*, com base em 48 loci de ISSR. Cada coluna representa um indivíduo e cores representam diferentes clusters genéticos. Para nomes das populações veja tabela 1.

Discussão

Os resultados de AMOVA indicam alta variabilidade intrapopulacional e baixa estruturação interpopulacional e interregional caracterizando as populações de *B. paranaensis*. Há estrutura genética ao longo da distribuição geográfica da espécie, fato que pode estar relacionado com a manutenção de fluxo gênico entre as subpopulações, possivelmente efetivada pelo *P. pretrei*, apresentando o comportamento por rotas de visitas (Luz et al. não publicado). Esse comportamento favorece a polinização cruzada, fato que pode explicar os altos níveis de variabilidade genética dentro das populações (Loveless e Hamrick 1984). Os resultados de AMOVA são similares ao encontrado por Lousada 2011, em populações endêmicas e restritas de *V. gigantea*, porém ainda não há um polinizador conhecido, sugerindo polinização por abelhas.

Os *primers* usados apresentaram número de fragmentos polimórficos variando de 8 a 16. Em trabalhos similares com a mesma família e mesmo marcador

molecular, encontramos valores mais baixos, como em *Vellozia gigantea* variando de 6 a 14 locos (Lousada et al. 2011) e valores superiores foram encontrados em *Vellozia compacta*, variando de 13 a 24 locos (Lousada et al. 2013). Os maiores valores de locos por *primer* foram encontrados em *Vellozia hirsuta* com 19 a 28 locos (Barbosa 2011). Todos esses trabalhos apresentam boas resoluções de leitura nos géis de agarose. Com isso sugerimos que o alto número de fragmentos amplificados, usando ISSR, talvez seja uma característica das espécies de Velloziaceae.

A média de polimorfismo e os índices de Shannon e diversidade genética são considerados altos, sendo superior a 88%, 0,500 e 0,300, respectivamente. Entre as seis populações de *B. paranaensis*, a população MPB apresentou os maiores valores e a população VC obteve os menores valores para essas variáveis analisadas. Esses valores são similares aos encontrados por Lousada et al. 2011 em populações com distribuição disjunta de *Vellozia gigantea*.

As distâncias geográficas entre as populações de *B. paranaensis* podem influenciar na estruturação genética. As seis populações naturalmente disjuntas foram agrupadas em quatro *clusters*. É possível observar predominância de agrupamentos genéticos dentro de um mesmo município. As populações SPN, MJ e RA estão localizadas no município de Tibagi e possuem distância geográfica inferior a 50 km de distância. Os indivíduos dessas populações foram agrupados por dois *clusters* predominantes. A única população em Ortigueira, MPB é composta por um *cluster* predominante. As populações VC e RF estão localizadas no município de Sengés e distam 10 km entre si. Os indivíduos dessas populações estão agrupados por dois *clusters* predominantes. Os resultados encontrados pela estruturação

genética corroboram a distribuição de PCO, na qual apresenta uma ordenação discreta e descontínua entre as populações.

Hamrick e Goldt (1996) sugere que a maioria das espécies endêmicas possui pequeno tamanho populacional, apresentando menor fluxo gênico. Essas condições levariam à menor variação genética entre indivíduos quando comparadas com espécies mais amplamente distribuídas. De acordo com isso, o estudo de Franceschinelli (2006) no gênero *Vellozia*, utilizando isoenzimas, indicou que espécies geograficamente mais amplas com populações maiores e habitats menos restritos, possuem níveis mais elevados de diversidade genética do que espécies com ambientes disjuntos e área geográfica restrita.

Espécies amplamente distribuídas geograficamente são mais propensas a ter moderada taxa de fluxo gênico e menos divergência interpopulacional. Isso pode ser influenciado por fatores históricos de cada táxon e heterogeneidade de habitats (Loveless e Hamrick, 1984). Porém foi encontrada alta diversidade genética mantida em espécies endêmicas com distribuições mais restritas em vários grupos (Luan et al. 2006; Smith e Pham, 1966; Kang et al. 2000; Lousada et al., 2011), corroborando os resultados de *B. paranaensis*. Esta variabilidade pode ser mantida preponderantemente por estratégias reprodutivas com tendência a aumentar as taxas de fecundação cruzada (Borba et al. 2001; Gomes et al. 2004).

Os resultados apresentados de variabilidade e estrutura genética de *B. paranaensis* podem ser explicados pelo sistema misto de reprodução e pelo comportamento do polinizador. Considerando que há correlação entre distância genética e distância geográfica, sugerimos que, o beija-flor contribui com a

polinização cruzada dentro população e subpopulações, influenciando o aumento da variabilidade e na mistura de agrupamentos genéticos.

Atualmente as características biológicas e reprodutivas, juntamente com o padrão de estrutura genética não corroboram a atual distribuição restrita de *B. paranaensis*. É possível que no passado a espécie tenha sido amplamente mais distribuída e interconectada. A coesão genética encontrada entre as populações, provavelmente é devido à variação genética compartilhada entre os atuais fragmentos relictuais isolados e pode estar mantida por fluxo polínico recente através do comportamento do polinizador.

Referências

Apte GS, Bahulikar RA, Kulkarni RS, Lagu MD, Kulkarni BG, Suresh HS, Rao PSN, Gupta VS (2006) Genetic diversity analysis in *Gaultheria fragrantissima* Wall. (Ericaceae) from the two biodiversity hotspots in India using ISSR markers. *Curr. Scien* 91(12): 1634-1640

Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York

Ayres M, Ayres JM, Ayres DL, Santos, AA (2007). *BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Ong Mamirauá: MCT- CNPq, Belém, PA

Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C (2007) Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude 'inselbergs', *Alcantarea imperialis* and *A. geniculata*. *Mol Ecol* 16 (10):1981–1992

Barbosa AR (2011) *Biosistemática do complexo Vellozia hirsuta (Velloziaceae) baseada em análise filogeográfica e genética de populações*. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais

Borba EL, Felix JM, Solferini VN, Semir J (2001) Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *Am J Bot* 88: 419-428

Borba EL, Funch RR, Ribeiro PL, Smidt EC, Silva-Pereira V. (2007) Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophronitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. *Plant Syst Evol* 267: 129-146

Conceição AA, Funch LS, Pirani JR (2007) Phenology, pollination and seed dispersal syndromes on sandstone outcrop vegetation in the "Chapada Diamantina", northeastern Brazil: population and community analyses. *Rev Bras Bot* 30: 475-485

Cruz DT, Selbach-Schnadelbach A, Lambert SM, Ribeiro PL, Borba, EL (2011) Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. *Plant Syst and Evol* 294: 87-98

Doyle JJ, Doyle JS (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620

Feinsinger P, Colwell RK (1978) Community organization among Neotropical nectar-feeding birds. *Am Zool* 18: 779-795

Franceschinelli EV, Jacobi CM, Drummond MG, Resende MFS (2006) The genetic diversity of two Brazilian *Vellozia* (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. *Ann Bot* 97: 585–592

Goldbatt, P; Poston, M (1988) Observation on the chromosome cytology of Velloziaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* v. 75: 192-195.

Gomes V, Collevatti RG, Silveira FAO, Fernandes GW (2004) The distribution of genetic variability in *Baccharis concinna* (Asteraceae), an endemic, dioecious and threatened shrub of rupestrian fields of Brazil. *Conserv Genet* 5: 157-165

Grantsau R (1989) Os beija-flores do Brasil. Ed. Expressão e Cultura. Rio de Janeiro, 233.

Hammer O, Harper DAT, Ryan PDA (2001) PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. *Palaentologia Eletrônica* 4: (1):1-9

Hamrick JL, Goldt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philos T R Soc B* 351: 1291–1298

Jesus FF, Solferini VN, Semir J, Prado PI (2001) Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. *Plant Syst Evol* 226: 59-68

Jesus FF, Abreu AG, Semir J, Solferini VN (2009) Low genetic diversity but local genetic differentiation in endemic *Minasia* (Asteraceae) species from Brazil. *Plant Syst Evol* 277: 187-196

Kang U, Chang CS, Kim YS (2000) Genetic structure and conservation of the rare endemic *Abeliophyllum distichum* Nakai (Oleaceae) in Korea. *J Plant Res* 113: 127–138

Lambert SM, Borba EL, Machado MC (2006). Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus* × *albicephalus* (*Melocactus ernestii* × *M. glaucescens*) in north-eastern Brazil. *Plant Spec Biol* 21: 93-108

Lousada JM, Lovato MB, Borba EL (2011) Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica* 139(4):431-40. doi: 10.1007/s10709-011-9561-5

Lousada JM, Lovato MB, Borba EL (2013) High genetic and low genetic variability in disjunct populations of the endemic *Vellozia compacta* (Velloziaceae) occurring in two edaphic environments of Brazilian campos rupestres. *Rev Bras Bot.* doi: 10.1007/s40415-013-0001-x

Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetics structure in plant populations. *Annu Rev Ecol Syst* 15:65-95

- Luan S, Chiang TY, Gong X (2006) High genetic diversity vs. low genetic differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, revealed by ISSR fingerprinting. *Ann Bot* 98: 583-589
- Machado C G, Coelho A G, Santana C S, Rodrigues, M (2007) Beija-flores e seus recursos florais em uma área de campo rupestre da Chapada Diamantina, Bahia. *Rev Bras de Ornitologia* 15 (2): 267-279
- Machado C G, Coelho A G, Santana C S, Rodrigues, M (2009) Beija-flores (Aves: Trochilidae) e seus recursos florais em uma área de caatinga da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Zoo* 26 (2): 255-265
- Mello-Silva R Velloziaceae (2009) In: Giullietti AM, Rapini A, Andrade MJG, Queiroz LP, Silva JMC Plantas Raras do Brasil. Conservação Internacional, Belo Horizonte, MG
- Mello-Silva R Velloziaceae (2013) In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000245>) Acesso em: 27/02/2013
- Modareskia M, Darvishzadeh R, Hassani A, Kholghi M (2012) Molecular diversity within and between Ajowan (*Carum copticum* L.) populations based on inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *JPMB* 1 (1): 51-62
- Moro RS, Carmo MRB (2007) A vegetação campestre nos Campos Gerais. In: Melo, M. S. Moro, R. S.; Guimarães, G. B. Ed. UEPG Patrimônio Natural dos Campos Gerais do Paraná
- Nybom H, Bartish IV (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspect Plant Ecol* 3: 93-144
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Note* 6: 288-295
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959
- Ribeiro PL, Borba EL, Smidt EC, Lambert S. M, Schnadelbach, AS, Van den Berg C (2008) Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. *Plant Syst and Evol* 270: 109-137
- Rieseberg LH (1996) Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Mol Ecol* 5 (1): 99-105
- Ritter LMO, Pitt E, Chaves CC, Moro RS (2012) Inserção dos fragmentos de Cerrado na paisagem dos Campos Gerais. In: Moro RS. Biogeografia do Cerrado nos Campos Gerais (Ed) UEPG, Ponta Grossa pp 13
- Sazima, M (1978) Biologia floral de espécies de Velloziaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais. Tese, Universidade de São Paulo

Smith, L B (1962) Origins of the flora of southern Brazil – A synopsis of the American Velloziaceae. Contributions from the United States National Herbarium 35:280

Smith JF, Pham TV (1966) Genetic diversity of narrow endemic *Allium aseae* (Alliaceae). Am J Bot 83: 717–726

Thormann W, Molteni S, Caslavská J, Schumtz A. 1994. Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis. Eletrophoresis 15(1): 3–12

Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey SV (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods on Enzymol 218: 704–740

Ziller S, Galvão F (2000) A degradação da estepe gramíneo-lenhosa no Paraná por contaminação biológica de *Pinus elliottii* e *P. taeda*. Floresta 32(1): 41-47

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta dissertação foram investigados aspectos florais e genéticos em *Barbacenia paranensis*. Através do estudo combinado de fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral, anatomia floral, visitantes florais, biologia reprodutiva e marcador molecular dominante (ISSR) foi possível compreender como o sistema reprodutivo e sistema de polinização influenciam na variabilidade e estrutura genética atual das populações de *B. paranaensis*. A observação dos visitantes florais pautado em estudos anatômicos permitiu compreender como ocorre o sistema de polinização e supor possíveis efeitos na amplitude do fluxo polínico. O estudo da biologia reprodutiva revelou a ocorrência de autocompatibilidade em um sistema misto de reprodução, que combina a ocorrência de autopolinização espontânea eventual e propagação vegetativa, com alta frequência de reprodução cruzada mediada pelo beija flor *Phaetornis pretrei*. O comportamento de rotas de visitas desse polinizador contribui para ampla dispersão polínica dentro e entre subpopulações. Os aspectos biológicos e ecológicos descritos corroboram os resultados apresentados de variabilidade e estruturação genética. Os resultados sugerem que o comportamento do polinizador e o sistema misto de reprodução contribuem para uma ampla dispersão polínica, compatível com a alta variabilidade e coesão genética observada entre as populações próximas e baixa divergência entre regiões.

Embora *B. paranaensis* seja considerada o limite de distribuição austral da família para América do Sul, além de ser uma espécie rara, endêmica e apresenta distribuição restrita dentro do Paraná, não foi registrada nenhuma população dentro de Unidades de conservação. No município de Tibagi, todas as populações ocorrem em propriedades particulares com atividades em ecoturismo. A população do

município de Ortigueira está localizada em uma área particular de empresa de torres de telecomunicação. No município de Sengés uma população encontra-se na Reserva do Particular do Patrimônio Natural Vale do Corisco. Há outro afloramento rochoso, localizado próximo ao Rio Funil com indivíduos de *B. paranaensis*. Portanto, recomendamos medidas de conservação para espécie, uma vez que a estrutura genética apresenta mais de um agrupamento genético em cada população, não constituindo de um único *pool* gênico. Segundo MMA, o município de Sengés é uma área prioritária para conservação da biodiversidade, pois agrupa os remanescentes de cerrado no Paraná.

A ampla distribuição geográfica de *P. pretrei* juntamente com o sistema misto de reprodução não corrobora a distribuição restrita de *B. paranaensis*. É possível que no passado a espécie tenha sido interconectada e amplamente distribuída. Atualmente os fragmentos relictuais isolados abrigam variabilidade genética antiga e compartilhada. Portanto sugerimos estudos futuros, como estudos filogeográficos, que poderão investigar o contexto dos efeitos dos processos históricos, e diversificação das atuais populações naturalmente disjuntas. Assim como, uso de marcadores codominantes para estimar o nível de fluxo gênico e possível depressão endogâmica nas populações de *B. paranaensis*.