



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

DANIELE CASSIANO FELICIANO

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE
POPULAÇÕES DE *Portulaca hatschbachii* D. Legrand:
UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DOS AFLORAMENTOS ROCHOSOS
DE BASALTO DO ESTADO DO PARANÁ**

Londrina
2018

DANIELE CASSIANO FELICIANO

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE
POPULAÇÕES DE *Portulaca hatschbachii* D. Legrand:
UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DOS AFLORAMENTOS ROCHOSOS
DE BASALTO DO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do Título de Mestra.

Orientadora: Profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Feliciano, Daniele Cassiano.

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Portulaca hatschbachii* D. Legrand: UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DOS AFLORAMENTOS ROCHOSOS DE BASALTO DO ESTADO DO PARANÁ / Daniele Cassiano Feliciano. - Londrina, 2018.

95 f. : il.

Orientador: Claudete de Fátima Ruas.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Marcadores Moleculares - Tese. 2. Portulacaceae - Tese. 3. AFLP - Tese. 4. Flora em extinção - Tese. I. Ruas, Claudete de Fátima. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

DANIELE CASSIANO FELICIANO

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
***Portulaca hatschbachii* D. Legrand:**
UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DOS AFLORAMENTOS ROCHOSOS DE
BASALTO DO ESTADO DO PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do Título de Mestra.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. José Eduardo Lahoz da Silva Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Sara Mataroli de Godoy
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 31 de julho de 2018.

*“Ao brilhante homem da terra, Ulisses de Carvalho Silva,
que hoje é o anjo mais lindo do céu”, dedico...*

AGRADECIMENTOS

Deixo registrada minha gratidão à Deus, por me fazer forte, nunca me desamparar e preparar cada passo na estrada que eu ainda hei de dar!

Agradeço à Minha família de maneira geral, mas em Especial à minha irmã Danivia, à minha Mãe Ana e ao meu irmão Denis, por me apoiarem em tudo!

Ao Wesley Agostini por me mostrar que a vida ainda é “Vida”. Sou grata por levantar minha cabeça e me ajudar a seguir.

À minha orientadora Dra. Claudete Ruas e ao Dr. Paulo Ruas por muitas vezes "pegarem na minha mão", me orientando em toda essa fase de mestrado e por todo apoio que eles dão ao laboratório! São poucos os que fazem o que eles fazem para ver o lab produzindo!

À Dra. Sara Mataroli de Godoy, por minuciosamente e pacientemente me ajudar com tudo nesse trabalho, este, não seria o mesmo sem seu “dedinho gordo” aqui. Não esperava tanto apoio e tanta amizade de alguém na vida, como eu tive de você!

Aos amigos da vida cotidiana do nosso lab “Ruas”, agradeço de coração, tanto aos que ficaram quanto aos que passaram em alguma etapa do caminho, mas em muito especial as “Naiades”, Bruna e Lucas, por toda amizade e suporte que me deram e a Patyzy (Patrícia Lopes) por toda dedicação, disposição e capricho em me ajudar na formatação desse trabalho. E também ao João Fernando por todo o apoio estatístico!

À turma do " Zé duds": José Roberto, Patrícia, Élson e principalmente ao professor Dr. José Eduardo. Essa equipe sempre me auxiliou e podem ter certeza que este trabalho se concretizou pelo apoio e ensinamentos de vocês.

A todos os amigos do Lagea, agradeço imensamente os vários " tipos " de ensinamentos e por se disporem a me ajudar sempre!

Aos meus amigos/irmãos de graduação Thielly Fabian e Dhiego Gomes, grandes amigos, me deram muita força e ânimo para eu ter voltado a estudar. Sou grata por sempre me ajudarem nas “emboscadas” que vivo entrando!

Agradeço à toda Família Doneze, Marta e Clóvis, Iara e Gabi por fazer dos meus dias mais alegres e saudáveis. Obrigada pelo apoio mental e moral que me deram, considero vocês minha família também.

Agradeço ao Fidel Spagolla e à Maria do Carmo (Tina) por todo apoio de vida de 23 anos de amizade que levo comigo até hoje!

Aos verdadeiros amigos de Minas Gerais, Claudia Lira, Daniela Garcia, Daniela Vialli, Juliana, Kellen, Luciana, à Família Gouvêa e especialmente à Roberta Miranda. Obrigada por me apoiarem e me manterem nas suas orações.

À Universidade Estadual de Londrina, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e à CAPES por proverem suporte financeiro e estrutural a este trabalho.

FELICIANO, Daniele Cassiano. **Diversidade e estrutura genética de populações de *Portulaca hatschbachii* D. Legrand**: Uma espécie endêmica dos afloramentos rochosos de basalto do estado do Paraná. 2018. 95 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

O gênero *Portulaca* abrange um grupo de plantas popularmente conhecidas como “onze horas”, caracterizadas como ervas suculentas perenes ou anuais. Algumas espécies possuem propriedades terapêuticas e relevante importância em áreas agrícolas e paisagismo. *Portulaca hatschbachii* é uma espécie ameaçada de extinção, que não dispõe de dados genéticos descritos na literatura. A espécie se distribui pelos Campos de Altitude associados à Mata Atlântica, tendo ocorrência restrita aos afloramentos rochosos de basalto do Paraná. Esses ambientes foram erroneamente considerados como sendo detentores de pouca riqueza de espécies, o que colaborou para que esse habitat extremamente rico em biodiversidade fosse cruelmente negligenciado e desprotegido. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo acessar a diversidade genética de *P. hatschbachii* por meio de marcadores AFLP, *rps16* e ITS. Informações importantes para estimativa de parâmetros de diversidade e estrutura genética das populações de *P. hatschbachii*, puderam ser estimadas pelos marcadores AFLP. Os resultados evidenciaram baixos níveis de variação intrapopulacional, fluxo gênico limitado e níveis elevados de estruturação genética. A análise de agrupamento Bayesiano (BAPS) revelou a existência de oito *clusters* genéticos para *P. hatschbachii*. A *Neighbor-Net* construída também corroborou os mesmos *clusters* obtidos pelo BAPS. A diversidade gênica das populações de *P. hatschbachii* foi, de maneira geral, baixa, o que pode ter relação com a biologia reprodutiva da espécie e ao padrão de distribuição endêmica e restrita à afloramentos rochosos. O Teste de Mantel, bem como as análises de agrupamento *Bayesiano* e *Neighbor-Net*, mostraram que as populações se encontram isoladas pela distância. O escaneamento realizado pelo Bayescan, verificou a presença de locos sob seleção diversificadora, a qual pode ser uma importante força a moldar os padrões de distribuição da variação genética na espécie.

Palavras-chave: Portulacaceae. AFLP. Marcadores moleculares. Flora em extinção.

FELICIANO, Daniele Cassiano. **Diversity and genetic structure in *Portulaca hatschbachii* D. Legrand populations**: endemic in basalt rocky outcrops in Paraná State. 2018. 95 p. Dissertation (Master Degree in Genetic and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Genus *Portulaca* includes a group of plants popularly known as "onze horas", characterized as perennial or annual succulent herbs. Some species have therapeutic properties and relevant importance in agricultural areas and landscaping. *Portulaca hatschbachii* is an endangered species that does not have genetic data described in literature. The species is distributed in the Height Fields associated to the Atlantic Rain Forest, restricted to the basalt rocky outcrops of Paraná. These environments were erroneously considered to have low species richness, which contributed to make this extremely rich biodiversity habitat to be cruelly neglected and unprotected. Thus, the present study aimed to access the genetic diversity of *P. hatschbachii* through AFLP, rps16 and ITS markers. Important information for diversity parameters estimations and genetic structure of *P. hatschbachii* populations could be estimated by the AFLP markers. The results showed low levels of intrapopulation variation, restricted gene flow and high levels of genetic structure. Bayesian Analysis of Population Structure (BAPS) revealed the existence of eight genetic clusters for *P. hatschbachii*. The Neighbor-Net built corroborated the same clusters obtained by BAPS. Genetic diversity of *P. hatschbachii* populations was generally low, which may be related to the species reproductive biology and to the pattern of endemic and restricted distribution to rocky outcrops. The Mantel test, as well as the Bayesian and Neighbor-Net cluster analyzes of the populations, showed that *P. hatschbachii* populations are isolated by distance. The Bayescan test verified the presence of loci under diversification selection, which may be an important force shaping the distribution patterns of genetic variation in the species.

Keywords: Portulacaceae. AFLP. Molecular Markers. Flora in extinction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Fruto e cápsula com opérculo (a); Sementes na base da cápsula (b); Sementes (c). **Fonte:** SANTOS, dados não publicados..... 15
- Figura 2** - Mapa do Estado do Paraná mostrando a ocorrência da espécie. **Fonte:** Banco de dados da CNCFlora, 2012..... 18
- Figura 3** - *Portulaca hatschbachii*. **Fonte:** Próprio autor..... 19
- Figura 4** - Flor de *Portulaca hatschbachii*. Forma homostílica (a); Forma longistílica (b). **Fonte:** Santos, dados não publicados..... 19
- ARTIGO**
- Figura 5** - Áreas de coleta das espécies: *P. hatschbachii* (círculos vermelhos) e *P. grandiflora* (círculos amarelos). **Fonte:** Adaptado do mapa ITCG (2009) de Formações fitogeográficas do Paraná – PR..... 42
- Figura 6** - Inferência Bayesiana de agrupamento realizada pelo BAPS para 12 populações de *P. hatschbachii* (a) e três populações de *P. grandiflora* (b). A análise encontrou o melhor resultado para $K = 8$ agrupamentos, a partir de 1660 fragmentos de AFLP para *P. hatschbachii* e o $K = 2$ agrupamentos para os 883 fragmentos de AFLP de *P. grandiflora*, provenientes de quatro combinações de *primers*. Cada população se encontra abaixo de cada grupo..... 54
- Figura 7** - *Neighbor-Net* baseada na distância de Nei-Li e inferida pelo *SplitsTree*. Relações filogenéticas de 12 populações de *P. hatschbachii* (a) e três populações de *P. grandiflora* (b), estimadas a partir dos dados de AFLP provenientes da combinação de quatro *primers*. Indivíduos das populações coloridos de acordo com os agrupamentos genéticos encontrados pelo BAPS..... 55
- Figura 8** - Propagação vegetativa a partir da folha dos ramos vegetativos de *P. hatschbachii*. As letras condizem com o tempo de surgimento das raízes, sendo: (a) 25 dias (b) 30 dias (c) 35 dias (d) 45 dias (e) 50 dias (f) 60 dias. **Fonte:** Santos, dados não publicados..... 58

- Figura 9** - Correlação entre a distância genética (F_{st}) e distância geográfica (Km) de 12 populações de *P. hatschbachii* ($r = 0,63$, $P = 0,0001$). Análise realizada pelo teste de Mantel por meio do método “*Pearson*” no R. Distâncias geográficas no eixo (x); Distâncias genética no eixo (y). 60
- Figura 10** - Autocorrelograma espacial para 12 populações de *P. hatschbachii* a partir de sete classes de distâncias geográficas (classe 1= 0 - 45,6 Km; classe 2= 45,7 – 90,6 Km; classe 3= 90,6 – 135,7 Km; classe 4= 135,7 – 180,8 Km; classe 5= 180,8 – 225,8 Km; classe 6= 225,8 – 270,9 Km; classe 7= 270,9 – 306,0 Km) a partir do teste de Mantel. Média das classes no eixo x, correlação de Mantel no eixo y. Pontos fechados (pretos) são significativos a um alfa de 0,05. Pontos abertos (brancos) não são significativos a um alfa de 0,05. 60
- Figura 11** - Análise de identificação de loci outliers realizada pelo *software* Bayescan. Escaneamento de 1660 fragmentos de AFLP a partir de 12 populações de *P. hatschbachii*. Pontos à direita da linha azul estão sob possível processo de seleção diversificadora com um intervalo de confiança de 99 % ($FDR = 0,01$). 64
- Figura 12** - Rede de haplótipos de *P. hatschbachii* baseada em sequências de ITS (a) e *rps 16* (b) e Rede de haplótipos de *P. grandiflora* de ITS (c). Todas as redes foram construídas pelo método de parcimônia estatística no *software* TCS 1.21..... 66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Localização e coordenadas geográficas das populações de *P. hatschbachii* e *P. grandiflora*, coletadas no Estado do Paraná – PR..... 41
- Tabela 2** - Número total de fragmentos (NF) gerados e percentual de fragmentos polimórficos (% FP) para cada combinação de *primers* das 12 populações de *P. hatschbachii* e três populações de *P. grandiflora*..... 49
- Tabela 3** - Estimativas de diversidade genética para 12 populações de *P. hatschbachii* e três populações de *P. grandiflora*, obtidas a partir de dados de AFLP e sequências ITS e *rps 16*..... 51
- Tabela 4** - Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada aos marcadores AFLP, ITS e *rps16* para 12 populações de *P. hatschbachii* e três populações de *P. grandiflora*. g.l. = graus de liberdade; s.q. = soma dos quadrados; c.v. = componentes da variação; % de variação = Porcentagem da variação; *Fst* = índice de fixação..... 57
- Tabela 5** - Valores estimado de número de migrantes por geração conforme fórmula proposta por Nielsen e Slatkin (2013), para 12 populações de *P. hatschbachii*..... 59
- Tabela 6** - Valores de distância genética (*Fst*) par a par entre as 12 populações de *P. hatschbachii* acima da diagonal e valores de distância geográfica (km), abaixo da diagonal..... 61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	GÊNERO <i>PORTULACA</i>	14
2.2	<i>PORTULACA HATSCHBACHII</i>	17
2.3	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE OCORRÊNCIA DE <i>P. HATSCHBACHII</i> : ESTADO DO PARANÁ	20
2.3.1	Formação de campos	21
2.3.2	Caracterização dos Campos de Altitude	22
2.3.3	Importância e Conservação da Flora e dos Afloramentos Rochosos	24
2.4	MARCADORES MOLECULARES.....	26
2.5	GENÉTICA DE POPULAÇÕES.....	26
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4.	ARTIGO. Diversidade e estrutura genética de populações de <i>Portulaca hatschbachii</i> D. Legrand: Uma espécie endêmica dos afloramentos rochosos de basalto do estado do Paraná.....	34
	REFERÊNCIAS GERAIS	77

1. INTRODUÇÃO

A família Portulacaceae Juss. se distribui amplamente pelas Américas e África, com um menor número de representantes na Austrália, Europa e Ásia. Evidências moleculares não ofereceram suporte à proposição de origem monofilética de Portulacaceae, o que levou à segregação da mesma e manteve apenas o gênero *Portulaca* L. como representante desta família (HERSHKOVITZ; ZIMMER, 2000; APPLEQUIST; WALLACE, 2001; APPLEQUIST et al., 2006; NYFFELER, 2007; NYFFELER; EGGLI, 2010; OCAMPO; COLUMBUS, 2012).

O gênero *Portulaca* apresenta aproximadamente 115 espécies, caracterizadas como herbáceas carnosas, sendo anuais ou perenes, com folhas opostas a alternas e tricomas nas axilas foliares. As flores são bissexuadas, com numerosos estames, apresentam duas sépalas e 4-5 pétalas livres, formando ou não inflorescências capituliformes rodeadas por folhas involucrais (EGGLI; FORD-WERNTZ, 2002; COELHO; GIULIETTI, 2010; OCAMPO; COLUMBUS, 2010).

No Brasil, o gênero compreende aproximadamente 13 espécies, distribuídas desde a Amazônia até o Sul do país, principalmente em regiões semiáridas, onde se encontra o maior número delas. Algumas espécies são endêmicas dos estados da Bahia (*Portulaca weedermannii* Poelln), Minas Gerais (*Portulaca minensis* D. Legrand) e Paraná (*Portulaca hatschbachii* D. Legrand) (FLORA DO BRASIL, 2017; COELHO et al., 2009).

Portulaca hatschbachii ocorre nos afloramentos rochosos do Paraná, dentro do Bioma Mata Atlântica, tendo seus registros restritos ao Terceiro Planalto Paranaense (Ferraz, comunicação pessoal). O estado do Paraná tem apenas 10 % dos remanescentes de Mata Atlântica preservado, resultado da pressão antrópica pelas práticas de cultivo de monoculturas, pastagens e queimadas. A pressão sofrida nesses remanescentes vem causando um declínio na extensão de ocorrência (EOO), na área de ocupação (AOO) e na qualidade do habitat em que *P. hatschbachii* se encontra, o que reduz sua área de ocupação a menos de 500 km² e a categoriza como “Em perigo” (EN) (GUIMARÃES et al., 2013). Somada à pequena área de ocupação, a excessiva exploração do substrato rochoso onde *P. hatschbachii* ocorre, o qual constitui matéria prima para a pedra brita (DNPM, 2008), afeta negativamente a reprodução e sobrevivência da espécie.

O conhecimento sobre a biologia, bem como os mecanismos de reprodução e diversidade genética são imprescindíveis para se estabelecer planos de manejo e conservação

das espécies. Para *P. hatschbachii*, informações como morfologia, sistema de reprodução e fenologia são escassas, sendo inexistentes estudos de diversidade e estrutura genética. Atualmente, dados como estes têm sido obtidos de maneira muito eficiente a partir do uso de marcadores genéticos, pois estas ferramentas permitem estimar índices de diversidade genética em populações naturais e estabelecer o padrão de distribuição espacial da variabilidade entre e dentro das populações (SEBBEN, 2001; PYKE, 2016).

Entre os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis, destacam-se os *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), os quais foram primeiramente descritos por Vos et al. (1995). A versatilidade e quantidade de informações geradas por esses marcadores, aliada a sua ampla cobertura do genoma, sem a necessidade prévia de sequenciamento, tornam os marcadores AFLP extremamente úteis para avaliar relações filogenéticas interespecíficas e delimitar espécies próximas, bem como para estimar índices de diversidade e estrutura genética de populações (TREMETSBERGER et al., 2006; RECK et al., 2011; PREBBLE; MEUDT; GARNOCK-JONES, 2012; SOUZA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2016; GODOY et al., 2017).

Desta maneira, a ausência de estudos genéticos da espécie de distribuição restrita, associada à grande degradação do ambiente de sua ocorrência e sua classificação como espécie “Em perigo” (EN), torna imprescindível o estudo da diversidade genética em *P. hatschbachii*. Para este propósito, foram aplicados marcadores moleculares AFLP, ITS e *rps16* em populações naturais da espécie, tendo por objetivo estimar os índices de diversidade e estrutura genética populacional, e assim obter informações que auxiliem na compreensão dos padrões evolutivos que moldam a diversidade de *P. hatschbachii* e que contribuam para ações de conservação da espécie.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GÊNERO *PORTULACA*

Integrante da ordem Caryophyllales, a família Portulacaceae era anteriormente composta por 30 gêneros, com cerca de 500 espécies distribuídas por várias partes do mundo, como a América do Norte, América do Sul, África, Europa e Ásia. Em sua antiga classificação, os gêneros mais representativos de Portulacaceae eram: *Portulaca* L., com cerca de 100 espécies, *Calandrinia* Kunth, com cerca de 150 espécies e *Talinum* Adans, com mais de 50 espécies (KUBITZKI, 1993). Com base em estudos de filogenia molecular,

Portulacaceae foi considerada não monofilética, levando à segregação da família em outras quatro: Anacampserotaceae, Montiaceae, Portulacaceae e Talinaceae (NYFFELER; EGGLI, 2010). Após a segregação de Portulacaceae, o gênero *Portulaca* L. se tornou o único gênero circunscrito na família, com aproximadamente 115 espécies distribuídas em todo o mundo. Estudos sobre as relações filogenéticas de *Portulaca* ainda são muito escassos, porém, análises realizadas a partir de sequências de regiões do DNA nuclear e plastidial colocam o gênero como um dos grupos mais próximos de Cactaceae (OCAMPO; COLUMBUS, 2012).

As espécies do gênero *Portulaca* são ervas suculentas, perenes ou anuais. Suas raízes são tuberosas, com eixo principal alongado e bem espesso, apresentando raízes secundárias finas. Os caules são aéreos, cilíndricos e com muitas ramificações, sendo geralmente verdes, ainda que em algumas espécies possam apresentar coloração avermelhada. As folhas podem ser caulinares, decíduas ou não, ou involucrais, quando estão ao redor das inflorescências. As flores são sésses, com simetria actinomorfa, bissexuadas e de diâmetro variável (COELHO, 2006; COELHO; GIULIETTI, 2010).

O fruto das espécies deste gênero possui uma cápsula com opérculo (tampa), cuja forma varia desde globular até hemisférica ou cônica (Fig. 1a). As sementes, geralmente pequenas (0,3-0,8mm), porém numerosas (variando entre 10 a 35) são liberadas quando o opérculo cai, embora algumas possam permanecer na parte basal da cápsula (Fig.1b). A reserva nutritiva da semente é um perisperma duro que circunda o embrião recurvado (Fig. 1c). As sementes são de coloração negra, cinza ou castanhas (GEESINK, 1969; COELHO, 2006; COELHO; GIULIETTI, 2010).

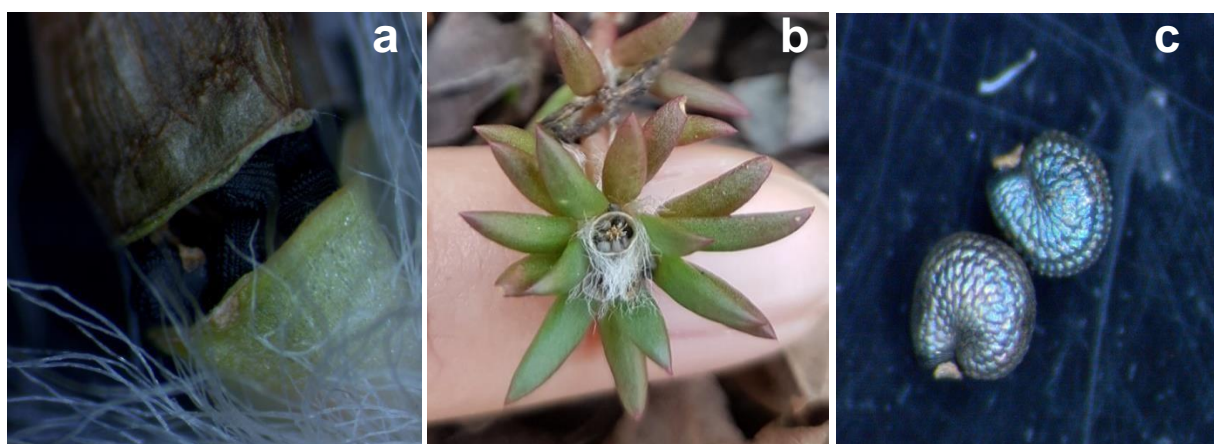


Figura 1 - Fruto e cápsula com opérculo (a); Sementes na base da cápsula (b); Sementes (c). **Fonte:** SANTOS, dados não publicados.

Portulacas possuem antese diurna, sendo conhecidas pelo nome popular de “onze horas”. A duração da antese varia de três horas a dez horas aproximadamente, mas as

espécies com flores pequenas apresentam períodos menores de abertura da flor. Usualmente, são produzidos de 80 a 120 grãos de pólen por antera, sendo em geral encontrada elevada viabilidade polínica para a maioria das espécies (MATTHEWS; LEVINS, 1986; NYANANYO, 1986; KIM; CARR, 1990; AIZEN, 1993; PINTO; SHILIDWEIN, 2015). Nas espécies do gênero estudadas até o momento, foi observado um elevado sucesso reprodutivo por autogamia, polinização cruzada e presença propagação vegetativa, sem relatos da existência de sistema de autoincompatibilidade ou apomixia (NYANANYO, 1986; KIM; CARR, 1990; AIZEN, 1993; WICKRAMASINGHE; HARRISON; JOHNSTON, 2010).

Citogeneticamente, as espécies de *Portulacas* exibem um número cromossômico basal mais comum de $x = 9$, podendo ser, ainda, $x = 4$ (MATTHEWS, 1993). *Portulaca suffrutescens* Engelm, por exemplo, possui $n = 27$ cromossomos, sendo este número também observado em certas subespécies poliplóides de *Portulaca oleracea* L. (KETRON; ZANE, 1993). Turner (1994) encontrou em *Portulaca grandiflora* Hook, um número cromossômico basal $x = 10$. Tais variações, evidenciam uma provável importância dos eventos de poliploidização no processo de evolução cariotípica do gênero (BOUHARMONT, 1965; KIM; CARR, 1990; MATTHEWS; KETRON; ZANE, 1994; ICHIMURA; SUTO, 1998; MISHIBA; MII, 2000), uma vez que, poliplóides, em geral, são bons colonizadores, podendo ocupar habitats pioneiros nos quais os ancestrais diploides não são bem-sucedidos (STEBBINS, 1971; STEBBINS, 1980). A ideia tradicional é de que após o evento de poliploidização, a população, ou espécie nova, se expande e coloniza novos espaços (DE WET, 1980; SOLTIS; SOLTIS, 1995; SOLTIS; SOLTIS, 1999; SOLTIS; SOLTIS, 2000).

Apesar da maioria das espécies do gênero não apresentarem importância econômica expressiva, elas possuem aplicações que podem ser consideradas relevantes. Por exemplo, *P. umbraticola* Kunth e *P. grandiflora* Hook, são utilizadas como plantas ornamentais por possuírem flores vistosas e multicoloridas (MATTHEWS; KETRON; ZANE, 1992). *Portulaca oleracea*, por sua vez, é usada na culinária, devido seu alto valor nutricional, além de apresentar aplicações farmacológicas, devido seu teor de ácidos graxos ômega-3 (CHAN et al., 2000; LIU et al., 2000; SIMOPOULOS et al., 2005; RADHAKRISHNAN et al., 2001; KARIMI; HOSSEINZADEH; ETTEHAD, 2004), Apesar disto, *P. oleracea* também é considerada erva daninha de fácil disseminação e persistência em pastagens em algumas regiões (RASHED; AFIFI; DISI, 2003; EL JACK, 2004; LIM; QUAH, 2006; LORENZI; MATOS, 2008, ALAN et al, 2014).

O número de espécies do gênero *Portulaca* não é bem definido. A grande variabilidade morfológica encontrada no gênero, pode ter implicações na definição do número de espécies reconhecidas, como demonstrado por diferentes autores. A exemplo, Geesink (1969) reconheceu cerca de 40 espécies, Von Poellnitz (1934) reconheceu 104 espécies, enquanto Legrand (1958) reconheceu 126 espécies, de ocorrência em diversas partes do mundo. Desta maneira, tornou-se um pouco difícil de se estabelecer um número de espécies para o gênero, visto que a ampla variação encontrada pode gerar grande confusão taxonômica para identificação das mesmas (OCAMPO; COLUMBUS, 2012).

No Brasil são descritas cerca de 13 espécies de *Portulaca*, as quais estão distribuídas em praticamente todas as regiões do país e em vários tipos de ambientes. Entretanto, a maioria das espécies ocorrem em habitats perturbados ou pioneiros, especialmente sob solos rochosos e pouco profundos, geralmente em pleno sol. As espécies brasileiras incluem: *P. amilis* Speg, *P. elatior* Mart., *P. frieseana* Poelln., *P. grandiflora*, *Portulaca halimoides* L., *P. hatschbachii* D. Legrand, *P. hirsutissima* Camb., *P. minensis* D. Legrand, *P. mucronata* Link., *P. oleracea* L., *Portulaca pilosa* L., *P. umbraticola* Kunth e *P. werdermannii* Poelln (COELHO; GIULIETTI 2009).

2.2 *PORTULACA HATSCHBACHII*

Portulaca hatschbachii, classificada como “Em perigo” (EN) no Livro Vermelho da Flora do Brasil (GUIMARÃES et al., 2013), se encontra distribuída na Mata Atlântica, dentro de um ecossistema associado a esse Bioma, o qual é conhecido como Campos de Altitude Subtropical (IGANCI et al., 2011). Atualmente seus registros são exclusivos ao Terceiro Planalto Paranaense (FERRAZ, comunicação pessoal), conforme demonstrado no mapa de distribuição da CNCFLORA (2012) (Fig. 2). Um único registro fora do estado do Paraná foi documentado no município de Gramado, Rio Grande do Sul, porém, desde 1970 nenhuma outra ocorrência para a região foi registrada (SPECIES LINK, 2018).

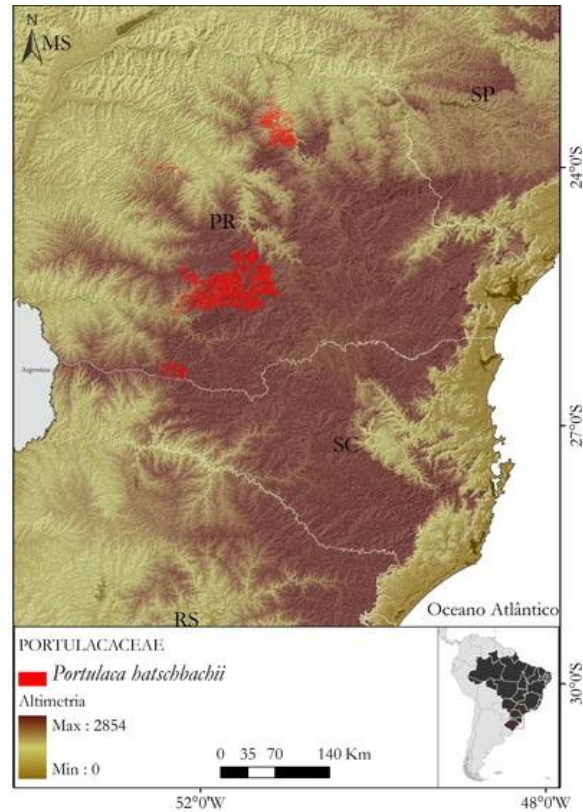


Figura 2 - Mapa do Estado do Paraná mostrando a ocorrência da espécie. **Fonte:** Banco de dados da CNCFlora, 2012.

Legrand (1962) descreve algumas características de *P. hatschbachii* (Fig. 3) como: cápsula sub-hemisférica séssil, sementes de cor cinza claro, caule semi-prostrado, incluindo ramos de 5 a 15 cm de comprimento, verdes e pouco ramificado, raiz tuberosa e alongada, tricomas axilares com 10 mm de comprimento, multisseriados e circundando todo o nó. A espécie exibe um sistema subterrâneo característico muito desenvolvido em relação ao tamanho da planta. Apresenta tricomas com cor castanha, pétalas magenta e folhas de coloração quase negra quando herborizadas (COELHO; GIULIETTI, 2010).



Figura 3 - *Portulaca hatschbachii*. **Fonte:** O autor.

Estudos sobre sua biologia floral, realizados por Santos (dados não publicados), em ambiente controlado (estufa) e natural, consistiu na análise de morfometria dos elementos florais, com acompanhamento do período de antese, liberação do pólen, viabilidade polínica e receptividade dos estigmas. Neste estudo se evidenciou a presença de flores bissexuadas, auto compatíveis e nas formas florais homostílica (Fig. 4a) e longistílica (Fig. 4b), sugerindo um sistema misto de reprodução, além da presença de propagação vegetativa.

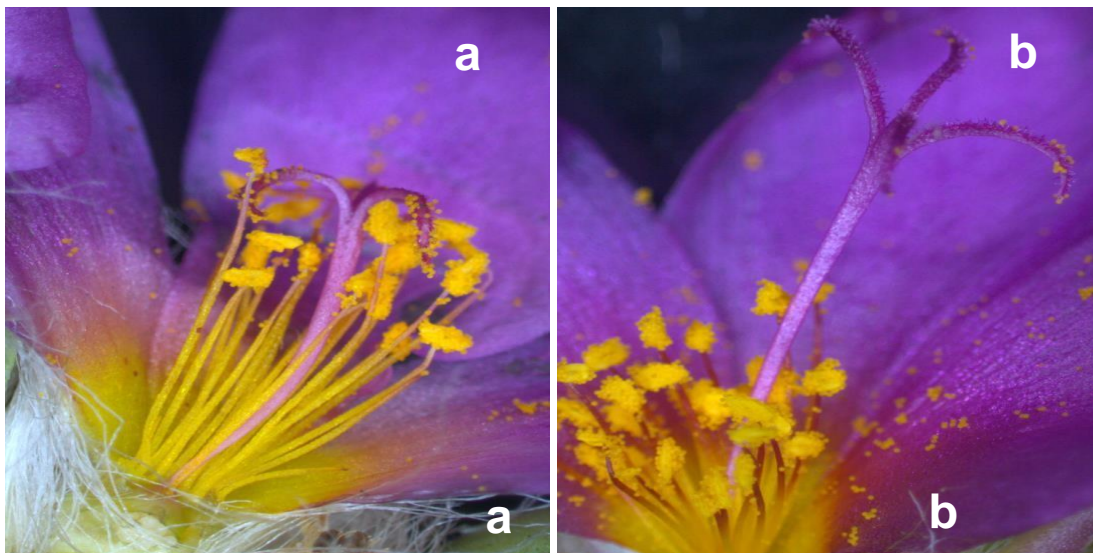


Figura 4 - Flor de *Portulaca hatschbachii*. Forma homostílica (a); Forma longistílica (b). **Fonte:** Santos, dados não publicados.

2.3 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE OCORRÊNCIA DE *P. HATSCHBACHII*: ESTADO DO PARANÁ

A área de ocorrência de *P. hatschbachii* encontra-se situada no Bioma Mata Atlântica ao longo do Terceiro Planalto Paranaense, em afloramentos rochosos basálticos ácidos dos tipos, Palmas e Chapecó, sendo a última mais enriquecida em Titânio, Fósforo e elementos incompatíveis (Lantânio, Zircônio, Cério, etc) do que a primeira. As rochas ácidas do tipo Chapecó são dominantes na região norte da Bacia do Paraná e as do tipo Palmas, na região sul (MACHADO, 2003). Essas rochas ácidas da Formação Serra Geral, são caracterizadas basicamente como riolitos e riolacitos e fazem parte do evento vulcânico que inundou a Bacia do Paraná com cerca de 800.000 km³ de lava que recobriu aproximadamente 75% de toda sua superfície no final da era mesozóica (MACHADO, 2003; MAACK, 2012). O Terceiro Planalto, assim surgiu pelo intenso vulcanismo que formou a Serra Geral, revestindo parte das rochas sedimentares há aproximadamente 133 e 129 milhões de anos atrás, no período Juro-Cretáceo durante a era Mesozoica (MAACK, 2012).

As fito regiões que compõe o Paraná é caracterizada por um conjunto de formações florestais que incluem a Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, também denominada de Mata das Araucárias, Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Estacional Decidual, além dos ecossistemas associados como, os brejos interioranos, a vegetação costeira (manguezais e restingas) e os campos de altitude (BRASIL/MMA, 2010). Segundo o IBGE (2004), o estado, possui uma flora bastante diversificada, dividida entre florestas e campos. Anteriormente o estado possuía 83 % do território coberto por florestas e os 17 % restantes eram ocupados por formações não-florestais, principalmente campos e cerrados, e ainda, por vegetação pioneira de influência marinha (restingas), fluviomarina (mangues) e fluvialacustre (várzeas), e pela vegetação herbácea do alto das montanhas (campos de altitude e vegetação rupestre). O clima no sul do Brasil propicia o desenvolvimento de formações florestais e campos, os quais estão posicionados como manchas edáficas ou relictos históricos no tempo atual (MAACK, 2012). O conjunto dessas distribuições formam o que chamamos de mosaicos. Esses mosaicos constroem uma paisagem heterogênea, composta por unidades que podem ser: fragmentos, corredores, bordas, manchas, unidades de recobrimento e ecossistemas. As observações dessas paisagens podem ser em micro ou macro escala, e sua dinâmica e origem podem ser influenciadas por processos ecológicos ou não, como a propagação do fogo, dispersão de sementes, espécies exóticas introduzidas, extinções, entre outros (FORMAN; GODRON, 1981; COWLING; PRESSEY, 2001; METZGER, 2002; METZGER, 2003).

2.3.1 Formação de campos

A Mata Atlântica, além de ser um bioma caracterizado por grandes formações florestais, também inclui outros diferentes tipos de composições vegetais, como os campos, que se apresentam formando mosaicos com florestas no Paraná, Santa Catarina e na metade norte do Rio Grande do Sul, os quais são formações características denominada Campos de Altitude Subtropical (RAMBO, 1956; BOLDRINI; EGGERS, 1996; OVERBECK; PFADENHAUER, 2007; OVERBECK et al., 2007; IGANCI et al. 2011). Os Campos associados às Florestas com Araucárias no sul do Brasil se estendem por centenas de quilômetros quadrados pelos planaltos, interrompidos por um sistema ramificado de vales rasos. Estas formações arbustivo-arbóreas, que delimitam e entremeiam os campos, são chamadas de capões: áreas de umidade média, onde são encontradas nascentes de pequenos córregos, margens de rios, riachos ou banhados, que marcam a fisionomia dos Campos (KLEIN, 1960; MEDEIROS; PILLAR; REIS, 2004; IGANCI et al., 2011). Quase todos os campos do Paraná e Santa Catarina se encontram cercados ou parcialmente atravessados pelas Florestas com Araucárias (KLEIN; RODRIGUEZ, 1978).

Os Campos de Altitude sob domínio do bioma Mata Atlântica (Lei 11.428/061) estão associados à Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Densa, Florestas Estacional Decidual e Semidecidual. Nesses ambientes há características que não permitem o desenvolvimento das florestas, tais como solos rasos, pouco férteis e com forte *stress* hídrico sazonal, variações mais extremas de temperaturas, exposição ao vento, altitudes elevadas, entre outros. Esses são os principais fatores condicionantes para a formação dos campos (KLEIN, 1960; KLEIN, 1990; SCARANO, 2002; MEDEIROS, 2005).

O conhecimento da história de formação dos campos é de suma importância, principalmente os campos sobre afloramentos rochosos, pois possibilita investigar as relações entre estes e os tipos de vegetações ali estabelecidas, bem como conhecer suas adaptações, mesmo que em substratos diferentes (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000; CONCEIÇÃO; PIRANI, 2005; SILVA, 2011). A aplicação desta abordagem histórica comparativa e interpretativa possibilita a compreensão do funcionamento dos ecossistemas, sua dinâmica sob diferentes cenários de climas e distúrbios, e na definição de manejo adequado de áreas de conservação e de sistemas sustentáveis de produção (PILLAR, 2000). Segundo Mezzomo (2009), os afloramentos rochosos e os solos rasos, estão associados a condições topográficas de maiores declives, com zonas de alta vulnerabilidade ambiental.

Nessas condições, a vegetação precisa se adaptar a um microclima seletivo, o que a torna propensa, inclusive, a desenvolver endemismos (CERVI et al., 2007).

2.3.2 Caracterização dos Campos de Altitude

Em geral, os campos de altitude se encontram em áreas de preservação permanente nos topos de morros, nas bordas de chapadas e em declividades elevadas, as quais são assistidas pela Lei Federal no 12.651, de 2012 (BRASIL, 2012), ocorrendo geralmente nos cumes rochosos das serras com altitudes elevadas, onde predomina clima subtropical ou temperado. A partir da Resolução Conama nº 423 de 2010, critérios específicos para classificação dos Campos de Altitude foram definidos para identificar a vegetação que caracteriza essas áreas, as quais são abrangidas pela Mata Atlântica (BRASIL, 2010). Dados sobre a vegetação dos Campos de Altitude estão listados no Anexo I dessa resolução, a qual reforça a necessidade de proteção destas áreas. Observando a lista indicativa de espécies associadas aos Campos de Altitude, encontramos listadas espécies de ocorrência típica ou restrita aos afloramentos rochosos em altitude, onde *P. hatschbachii* constitui o item 1826 (EN) p.118, constando como espécie restrita à afloramentos do Paraná (CONAMA, 2010).

As altitudes dos Campos de Altitude são variáveis, e em elevações superiores a 1.800 m, pode haver refúgios ecológicos, que são locais com vegetação florística e fisionômico-ecológica diferente do contexto geral da flora dominante (IBGE, 2004). Existem também refúgios montanos e alto montanos, cuja altitude de ocorrência varia de acordo com as latitudes. Para localidades entre 24 e 32 graus-Sul, refúgios montanos podem ser encontrados de 400 m até 1.000 m de altitude, enquanto que os refúgios alto-montanos ocorrem acima deste limite (GOMES, 2009).

Considerando as diferentes variáveis utilizadas para classificar os Campos de Altitude, podemos dizer que existem campos rupestres de altitude, campos de altitude não rupestres, campos rupestres que não sejam de altitude e, ainda, campos que não sejam nem rupestres nem de altitude (GOMES, 2009). No trabalho de Vasconcelos (2011), o autor ressalta que campos de Altitude e campos rupestres, apresentam semelhanças fitofisionômicas e compartilham alguns gêneros e espécies vegetais, mas há diferenças no substrato edáfico-geológico e nas afinidades biogeográficas, fundamentando assim essa diferenciação entre os dois ambientes. Logo, dois campos de altitude, em contextos biogeográficos diferentes, podem apresentar biodiversidade distinta, mas apresentam características ambientais semelhantes como refúgios vegetacionais de grande importância ecológica (MARTINELLI, 1996).

As próprias definições legais sobre campos têm um conceito amplo, podendo ser ambientes abertos, formados por comunidades vegetais de estrutura arbustiva e/ou herbácea, constituídas principalmente por gramíneas, asteráceas, ciperáceas, leguminosas, verbenáceas e apiáceas. Pode haver, ainda, banhados, circundados por arbustos e herbáceas e nas regiões úmidas aparecerem turfeiras e musgos (RAMBO, 1956; KLEIN, 1984; MARTINELLI, 1996).

Barros (2015), afim de melhor explicar a dinâmica dos campos do Sul, conjecturou que os altos índices de endemismo são típicos de ecossistemas antigos e estáveis, uma vez que o surgimento de novas espécies é demorado. Para explicar essa biodiversidade, o autor realizou simulações do clima de 21 mil anos atrás, quando o planeta atingiu sua temperatura mais baixa desde o último ciclo glacial. Com essa simulação Barros (2015) concluiu que, o clima mais frio e seco foi propício para o desenvolvimento dos campos, permitindo que espécies desse ambiente avançassem sobre áreas mais úmidas e quentes, onde antes predominavam florestas. Ao migrar para regiões às quais não estavam adaptadas, as espécies campestres se diversificaram, dando origem a novas espécies (BARROS, 2015). Durante esse período, houve expansão dos campos em direção a locais de menor altitude, ao norte. Mas, com o aquecimento gradual e aumento da umidade, as florestas voltaram a se expandir e ocupar regiões de campos que, por sua vez, se tornaram restritos às regiões mais altas, onde estão hoje (IGANCI et al., 2011). Desta maneira, a dinâmica de expansão e contração dos campos, devido ao esfriamento e aquecimento do planeta, pode explicar a detenção de tamanha biodiversidade nesses ambientes.

A biodiversidade florística que os campos abrigam é elevada, incluindo cerca de 7.061 táxons (espécies, subespécies e variedades) para os campos do sul do Brasil, com cerca de 1.020 táxons endêmicos de angiospermas (IGANCI et al., 2011). No Paraná, cerca de 5 mil espécies de plantas distribuídas por estas formações, foram catalogadas (FORZZA et al., 2010).

Os nichos ecológicos estabelecidos nos Campos de Altitude da Mata Atlântica são únicos. Partindo da abordagem que os ambientes campestres estão associados ao Bioma Mata Atlântica, é provável que devido às flutuações climáticas do passado, os campos de altitude puderam incorporar algumas espécies de outros biomas gerando especiações endêmicas. Dessa forma, temos os campos de altitude como uma modalidade de refúgio ecológico, quando observamos a história adaptativa de suas espécies e o seu valor ecológico (endemismo e alta biodiversidade), podendo fornecer indícios sobre sua relação com outros ecossistemas (SILVA, 2009). Considerando essa linha de raciocínio, ao preservar os

ecossistemas associados, mantemos os repositórios da biodiversidade desse bioma, que pode vir a ser perdido ao longo do tempo se estratégias de conservação e manejo não forem adotadas (HIROTA, 2005; HIROTA, 2011).

2.3.3 Importância e Conservação da Flora e dos Afloramentos Rochosos

A União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) criou, em 1964, o maior catálogo sobre o estado de conservação de espécie de plantas, animais, fungos e protozoários de todo o planeta, conhecida como a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (em inglês, IUCN *Red List* ou *Red Data List*). Seus objetivos são fornecer informações com base científica sobre o estado das espécies e subespécies em um nível global; atentar o público para a magnitude e a importância da biodiversidade ameaçada; implicar nas legislações e políticas nacionais e internacionais; e fornecer informações para orientar as ações de conservação da diversidade biológica (IUCN, 1994).

Dentre as nove categorias que compõem o catálogo Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas, uma espécie que exibe grande número de indivíduos e vasta distribuição é classificada como “segura ou pouco preocupante” (em inglês, *Least Concern*, LC). Entretanto, se a espécie é classificada como “quase ameaçada” (em inglês, *Near Threatened*, NT), pode ser que em breve venha a entrar para uma das categorias seguintes: 'Criticamente em Perigo', 'Em Perigo' ou 'Vulnerável'. Uma vez, que a espécie se encontra numa destas três categorias, ela passa a ser considerada “ameaçada”, pois a melhor evidência disponível indica que a espécie será extinta em um futuro próximo, caso as condições em que ela se encontre na natureza não melhorem. Este é o segundo estado de conservação mais grave para as espécies na natureza (IUCN, 1996).

Os dados da CNCFlora revelam que no bioma Mata Atlântica, formado atualmente por menos de 20 % da sua cobertura original, engloba pelo menos 60 % das espécies de fauna e flora brasileiras ameaçadas de extinção. A Mata Atlântica abriga mais de 20 mil espécies de plantas, das quais 50 % são endêmicas (BRASIL/MMA, 2010). Aproximadamente 57 espécies de plantas ameaçadas de extinção estão espalhadas pelas oito Unidades de Conservação (UC), que ficam em território paranaense, (CNCFlora, 2012). O Livro Vermelho da Flora do Brasil lista *Portulaca hatschbachii* como uma espécie “Em perigo” de extinção, entretanto a mesma não foi relacionada em nenhuma das UCs, o que evidencia uma situação delicada, contribuindo expressivamente para seu possível desaparecimento. A formação vegetal de campos tem apenas 453 km² protegidos em

Unidades de Conservação, o que equivale a menos de 0,5 % da área total deste tipo de formação vegetal (MMA, 2000). A maior parte deste percentual está nos mosaicos de campos de floresta com Araucária, nos Parques Nacionais dos Aparados da Serra, da Serra Geral e de São Joaquim (norte do RS e SC) (OVERBECK et al., 2007).

A história dos campos é marcada por inúmeras atividades culturais, econômicas e históricas promovidas pelo homem e que têm modificado consideravelmente o aspecto primitivo dos Campos (KLEIN; RODRIGUEZ, 1978). Dentre essas atividades, destaca-se a introdução de gramíneas invasoras, que são utilizadas como pastagem na pecuária (NABINGER; MORAES; MARASCHIN, 2000). Invasoras como a *Pennisetum americanum* K. Schum (conhecida como Milheto ou Sorgo) e a *Urochloa* spp. (sinonímia *Brachiaria*), são capazes de deslocar a vegetação nativa e então dominar o substrato (MEDEIROS, 2000). Além do impacto imposto aos Campos por meio da prática da pecuária (BOLDRINI; EGGERS, 1996), os mesmos sofrem ainda com a urbanização, a agricultura e silvicultura (NABINGER; MORAES; MARASCHIN, 2000). Esta última, explora a composição e fisionomia da vegetação para obtenção de madeira, aumentando as áreas para plantio de monoculturas como o *Pinus* spp., por exemplo, destruindo os Campos Naturais (SILVA, 2011).

Além da competição com gramíneas invasoras e plantadas, a flora desses afloramentos rochosos sofre exacerbadamente com a extração da rocha (matéria prima da pedra brita). Segundo o Departamento Nacional de Produção Mineral, a pedra britada proveniente desses locais é destinada à construção civil, à pavimentação asfáltica, à fabricação de artefatos de cimento e pré-moldados e como lastro de ferrovia e contenção (DNPM, 2008).

Culturalmente os Campos não são vistos como detentores de biodiversidade. Essa interpretação equivocada se dá devido a sua condição herbáceo-arbustiva visualmente “feia”, “seca”, “árida” e “amarelada” de rochas expostas como nos campos rupestres (PILLAR et al., 2006). A proteção dos campos tem sido negligenciada, como se tivessem menor valor para conservação do que as florestas nativas (OVERBECK et al., 2006). Entretanto a raridade de muitas espécies e o elevado grau de endemismos (CONAMA, Resolução 10/93) reforçam sua preciosidade. Assim, quando inseridos no Bioma Mata Atlântica, em áreas de tensão ecológica (contatos ou disjunções) e refúgios vegetacionais, os campos de Altitude estão sob a proteção da Lei da Mata Atlântica, Lei Federal no 11.428, de 2006 (BRASIL, 2007).

O ritmo com que os campos estão sendo convertidos em pastagens, lavouras e florestas plantadas, sem que limites sejam efetivamente estabelecidos e aplicados, é acelerado (PILLAR et al., 2006; MARTINELLI, 2007). Desta maneira, a biodiversidade e endemismo elevado, somado a um ecossistema altamente negligenciado e ameaçado por inúmeras atividades antrópicas, que ocasionam a quebra de seu equilíbrio hídrico e a descaracterização da paisagem, podem levar os Campos Naturais a serem extintos em breve (MEDEIROS; PILLAR; REIS, 2004).

Nesse contexto, as análises de parâmetros genéticos podem fornecer informações importantes para a tomada de decisões nos programas de manejo de espécies ameaçadas. O estudo desses parâmetros auxilia no entendimento da diversidade genética e como as degradações de habitats e isolamento de populações podem afetar tais espécies (CARVALHO, 2009). Diversos trabalhos têm sido realizados, visando a conservação da diversidade genética utilizando-se uma grande variedade de marcadores moleculares.

2.4 MARCADORES MOLECULARES

Segundo a definição de Ferreira e Grattapaglia (1998), marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA. Marcadores moleculares resultantes do produto da expressão do DNA, como as isoenzimas, por exemplo, têm se mostrado úteis na identificação indireta de características genotípicas. Entretanto, os marcadores moleculares que avaliam diretamente o DNA acabam tendo vantagens na caracterização da composição genética, pois identificam a variação genética diretamente ao nível de DNA, sem nenhuma interferência ambiental (ALMEIDA; PELEGRINELLI; SODRÉ, 2001).

Após o desenvolvimento da técnica de Reação de Polimerase em Cadeia, ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*), tornou-se fácil isolar e amplificar regiões específicas do DNA de genomas grandes e complexos, o que trouxe muitos avanços para diversas disciplinas da biologia, incluindo a ecologia molecular, genética de populações e evolução (FREELAND, 2005; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Com a técnica da PCR vieram diferentes marcadores moleculares que, quando aplicados em estudos populacionais, permitem acessar a variabilidade genética entre e dentro de populações (PIORSKI et al., 2008). Isto é de grande relevância, uma vez que o conhecimento sobre a estrutura e a diversidade genética de populações naturais é fundamental para obtenção de parâmetros que possam melhorar as

estratégias de manejo e conservação de espécies (RAO; HODGKIM, 2002; SOLÉ-CAVA; CUNHA, 2012).

Marcadores genéticos como SSR (*Simple Sequence Repeat*), SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), assim como análises de trechos do DNA mitocondrial e cloroplastidial, podem acessar a diversidade genética entre diferentes grupos taxonômicos, populações e mesmo indivíduos. Suas características particulares favorecem uma gama de aplicabilidades, tais como em estudos filogenéticos e de distâncias genéticas relativas, na inferência da estrutura genética populacional de espécies e identificação de indivíduos fundadores de novas populações e em análises de parentesco (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010; MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2012; SOLÉ-CAVA; CUNHA, 2012). Estes marcadores, são muito utilizados em estudo genético de plantas, sendo escolhidos e aplicados conforme o objetivo do estudo.

Análises de sequências de DNA cloroplastidial (cpDNA), por exemplo, são amplamente utilizadas para estudos de filogenia, filogeografia e genética de populações, possibilitando inferir padrões evolutivos em plantas, o que tem uma importância particular para estudos de sistemática vegetal, fazendo com que esta abordagem seja considerada ideal para reconstruções filogenéticas (SOLTIS; SOLTIS; MILLIGAN, 1992; WOLF et al., 1999; SMALL et al., 2005; SHAW et al., 2007).

O genoma de organelas, tais como os cloroplastos, tem uma grande vantagem em relação aos marcadores nucleares quando se considera estudos populacionais, principalmente porque o DNA nuclear é de herança biparental (PLEINES; JAKOB; BLATTNER, 2009). A principal vantagem do cpDNA é não sofrer recombinação, possibilitando inferir rotas de colonização (DULMOLIN-LAPÈGUE et al., 1997). Além disto, se analisarmos seu modo clonal de transmissão e a baixa taxa de mutação, as variações encontradas em sequências de cpDNA permitem a elucidação de fatores históricos que influenciam padrões de distribuição da diversidade genética (SCHAAL et al., 1998; LI et al., 2015). Entre os trechos comumente analisados no cpDNA, as regiões intergênicas, as quais não são codificantes, têm sido amplamente utilizadas em análises da diversidade genética, pois toleram mutações e evoluem rapidamente sem afetar as funções dos genes adjacentes. As regiões intergênicas mais utilizadas incluem *rps16*, *rpl16*, *trnK-matK-trnK* e *trnT-trnL-trnF* (SOLTIS; SOLTIS; MILLIGAN, 1992; WOLF et al., 1999; SMALL et al., 2005; SHAW et al., 2007).

Contudo, dentre outros tantos tipos de marcadores moleculares, os marcadores AFLP vem sendo eficientemente utilizados em pesquisas genéticas por apresentarem uma metodologia tecnicamente mais acessível, além de gerarem muitos fragmentos polimórficos,

sendo assim altamente informativos (GAIOTTO; BRAMUCCI; GRATTAPAGLIA, 1997). As vantagens da técnica de AFLP incluem, a não necessidade de conhecimento prévio do genoma, obtenção de dados altamente reprodutíveis, a partir de uma quantidade relativamente pequena de DNA, gerando polimorfismos que abrangem todo o genoma (PORTIS et al., 2004; SHAN et al., 2004). Apesar de os marcadores AFLP serem dominantes, ou seja, não permitirem a distinção entre homozigotos e heterozigotos, dados provenientes desses marcadores permitem o acesso à níveis de diversidade genética e estrutura populacional, além da identificação de marcadores associados ao fenótipo, análises de parentesco, detecção de eventos de hibridização e reconstruções filogenéticas altamente robustas (BENSCH; AKESSON, 2005; TREMETSBERGER et al., 2006; MEUDT; CLARKE, 2007; BUNDOCK et al., 2009; RECK et al., 2011; PREBBLE; MEUDT; GARNOCK-JONES, 2012; SOUZA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2016; GODOY et al., 2017).

2.5 GENÉTICA DE POPULAÇÕES

Estudos genéticos permitem compreender a distribuição e a abundância de genótipos e alelos em populações naturais, bem como os fatores que moldam as suas frequências e a relação entre a estrutura genotípica e o fenótipo (LEWONTIN, 2004; FREELAND, 2005). Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados, para o melhor entendimento dessa relação, uma vez que fornecem informações sobre os padrões de fluxo gênico, o grau de isolamento e a distribuição da diversidade genética dentro e entre populações (SUNNUCKS, 2000). Alta diversidade genética proporciona rápida capacidade de resposta às mudanças ambientais (SHARMA; CLEMENTS; JONES, 2000), enquanto a baixa diversidade tende a reduzir a capacidade reprodutiva e potencial evolutivo, podendo levar as espécies à extinção (REED; FRANKHAM, 2003; SPIELMAN et al. 2004; OUBORG, et al., 2006; JEONG et al., 2010). Portanto, estimar os parâmetros de diversidade genética em populações naturais é de fundamental importância para se avaliar o fitness adaptativo das mesmas e seu sucesso evolutivo.

O padrão de distribuição da variação genética nas populações é a base para a conservação de espécies, e por isso, seu conhecimento e entendimento são fundamentais para a aplicação de técnicas de manejo que contribuam para a conservação de populações naturais (KAGEYAMA; GANDARA 1993, YEEH et al., 1996; FRANKEL et al. 1996; FRANKHAM et al., 2010). A distribuição da variabilidade genética entre e dentro de

populações está relacionada com alguns fatores intrínsecos à espécie como por exemplo, o mecanismo de dispersão de pólen e sementes, o modo de reprodução, o sistema de cruzamento, bem como alguns fatores ambientais que possam influenciar ou direcionar de forma agregada essa distribuição (KEVIN et al., 2004; MARQUARDT; EPPERSON, 2004; LUNA et al., 2005). Logo, informações acerca do padrão de distribuição da variabilidade genética e dos indivíduos no espaço são imprescindíveis para a compreensão do comportamento dos processos evolutivos e ecológicos nas populações naturais (BROWN, 1979).

A Genética da Conservação direciona atividades que buscam a conservação da biodiversidade e dos recursos naturais (SOLÉ-CAVA; CUNHA, 2012). Dentre seus principais objetivos destacam-se: a definição de unidades de manejo, a resolução de incertezas taxonômicas, questões forenses, elucidação de aspectos biológicos e também os fatores que interferem nas populações, incluindo a depressão endogâmica, a perda de potencial adaptativo, a fragmentação, a redução do fluxo gênico, as mutações deletérias, deriva genética e a seleção natural (FRANKHAM et al., 2010).

Para estimar os diferentes parâmetros populacionais utilizados na genética da conservação, são, geralmente, assumidos os pressupostos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, os quais consideram em equilíbrio uma população que apresente tamanho infinito (panmítica), com cruzamentos ao acaso, onde as frequências gênicas e genotípicas permaneçam constantes de geração em geração na ausência de mutação, migração, seleção e deriva genética. Este princípio permite a estimativa da frequência de um determinado genótipo, independentemente do número de alelos existente (BROWN, 1978; HAMRICK, 1982; FUTUYMA, 1992). Com base nas estimativas de frequências alélicas, é possível calcular o parâmetro mais amplamente utilizado para medir a diversidade genética dentro das populações: a heterozigosidade esperada ou diversidade gênica de Nei (NEI, 1973). A diversidade gênica é primeiramente calculada para cada loco em particular e, em seguida, é calculada a média das frequências de todos os locos, fornecendo uma estimativa única de diversidade populacional, o que permite comparações entre diferentes populações (FREELAND, 2005, ALLENDORF et al., 2012).

A estrutura genética espacial das populações é outro importante parâmetro a ser considerado na genética da conservação, pois fornece informações que contribuem para a definição das estratégias de técnicas de manejo e estratégias de amostragem, o que possibilita maximizar a diversidade populacional a ser conservada (SHAPCOTT, 1995; MYAMOTO et al., 2002). Alterações na distribuição espacial dos indivíduos de uma população podem afetar

negativamente o fitness populacional, por modificar a taxa e a dinâmica dos cruzamentos (ALLARD, 1989; EPPERSON, 2000). Mudanças na densidade e no comportamento dos polinizadores, por exemplo, podem aumentar a taxa de autofecundação e, conseqüentemente, a endogamia (BAWA; KRUGMAN, 1990; MURAWSKI, 1995; FRANCESCHINELLI; BAWA, 2000).

Informações sobre os níveis de endogamia são informações de grande importância na compreensão de aspectos relacionados à biologia e a evolução das espécies (FUTUYMA, 2005). As espécies comumente não se distribuem de maneira uniforme ao longo de sua área de distribuição geográfica. Fatores ambientais, como a fragmentação de habitats, por exemplo, podem favorecer algum nível de endocruzamento dentro de populações naturais (HARTL e CLARK, 1997; FREELAND, 2005), tendendo a aumentar a endogamia. Neste cenário o aumento da proporção de homozigotos, leva a redução nos níveis de diversidade genética individual (HARTL e CLARK, 1997) e de aptidão dos indivíduos, o que ocorre principalmente devido à depressão endogâmica. Neste caso, a elevação dos níveis de endocruzamento, tal como ocorre a partir de reduções drásticas no tamanho efetivo populacional, pode expor alelos recessivos deletérios, levados à homozigose em determinados locos, resultando em genótipos com baixo potencial adaptativo ou com baixa taxa de sobrevivência (FREELAND, 2005; ALLENDORF et al., 2012).

O tamanho efetivo populacional influencia diretamente na manutenção da estrutura genética de uma população ao longo das gerações, sendo a diminuição do tamanho efetivo da população um dos principais fatores responsáveis pela perda de variabilidade em populações podendo levar à ameaça de extinção (SOLÉ-CAVA, 2001). Assim, uma vez que, o número total de indivíduos em uma população comumente não reflete o número de indivíduos que estão aptos a se reproduzir e contribuir para a composição genotípica da próxima geração (FRANKHAM et al., 2010; SOLÉ-CAVA e CUNHA, 2012), o tamanho efetivo populacional (N_e) (WRIGHT, 1931) constitui um importante estimador para estratégias de conservação *in situ* das espécies.

O tamanho efetivo populacional fornece a proporção de indivíduos que realmente estão contribuindo para a diversidade genética da população. Deste modo, um gargalo genético poderia reduzir temporariamente o tamanho efetivo de uma população, influenciando em seus níveis globais de diversidade genética (FREELAND, 2005; FRANKHAM et al., 2010). Logo, o número mínimo de indivíduos que se reproduziram durante um período do estrangulamento demográfico (bottleneck) define a probabilidade de perda de alelos por deriva genética. Os alelos perdidos só podem ser recuperados por

mutação ou, a partir de outras populações, por imigração (SOLÉ-CAVA, 2001). A gravidade de qualquer gargalo genético depende tanto do grau da redução populacional quanto da velocidade de recuperação. De modo geral, a perda de alelos inicial é proporcional à redução do tamanho da população. Neste caso, em virtude da deriva genética, a diversidade genética continua a ser perdida enquanto a população permanece reduzida. Assim, populações que levam mais tempo para recuperar-se de uma redução geralmente perdem mais diversidade genética (FREELAND, 2005).

Portanto, fatores como o tamanho populacional pequeno e a endogamia reduzem a variabilidade genética dentro da população via deriva genética, contribuindo para uma maior diferenciação genética entre populações. Segundo Hartl e Clark (1997), a importância do fluxo gênico está justamente em contrapor os efeitos da deriva genética, permitindo a homogeneização das frequências alélicas. O fluxo gênico é estimado a partir das medidas de divergência genética entre as populações. Quando um ou mais indivíduos migram por geração, os efeitos da migração são suficientes para contrapor os efeitos da deriva e, portanto, o número de migrantes por geração impede a divergência entre populações (WRIGHT, 1951). Futuyma (1992) descreve quatro modelos para explicar como o fluxo gênico atua em metapopulações: a) Modelo continente-ilha, no qual existe um movimento unidirecional de uma população grande continental para uma população menor isolada (WRIGHT, 1943); b) Modelo de ilha, no qual a migração ocorre ao acaso entre grupos de pequenas populações (WRIGHT, 1951); c) Modelo de alpondras (ou stepping-stone), no qual cada população recebe migrantes somente de populações vizinhas (KIMURA e WEISS, 1964); d) Modelo de isolamento pela distância, no qual o fluxo gênico ocorre localmente entre vizinhos, em uma população de distribuição contínua (WRIGHT, 1943).

Medidas diretas e indiretas podem ser utilizadas para estimar o fluxo gênico entre populações. As medidas diretas permitem estimar o fluxo gênico contemporâneo e são baseadas em observações do movimento dos vetores de pólen e sementes (LATTA et al., 1998) e na análise da paternidade (JONES e ARDREN, 2003). Já as medidas indiretas permitem estimar apenas o fluxo gênico histórico (ou passado), sendo baseadas na distribuição da estrutura e diversidade genética entre populações, as quais são usualmente inferidas por meio de marcadores moleculares (NEIGEL, 1997; SORK et al., 1999; SMOUSE E SORK, 2004). Assim, medidas simples de variação como número de alelos por loco e as frequências alélicas têm sido usadas como parâmetros quantitativos para descrever a estrutura genética, considerando premissas evolutivas em um contexto espacial (WEIR e COCKERHAM, 1984; EPPERSON, 2000; HARDY e VEKEMANS, 2002), onde

populações geograficamente próximas tendem a ser mais parecidas geneticamente do que populações mais distantes (WRIGHT, 1965). Portanto, considerando-se que a estrutura genética populacional resulta do balanço entre a deriva genética e o fluxo gênico, informações acerca do sistema reprodutivo, relações ecológicas entre os indivíduos e seus polinizadores e demais fatores que possam alterar os padrões de fluxo gênico, são imprescindíveis para a compreensão dos processos evolutivos que moldam o padrão de distribuição da diversidade genética e estrutura espacial das populações (ROCHA e AGUILAR, 2001; PEARSE; CRANDALL, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Portulaca hatschbachii se encontra listada como espécie “Em perigo” de extinção e não há informações literárias relativas ao seu atual status de conservação genética que auxiliem em ações para a preservação dos afloramentos de ocorrência. Portanto, por meio da aplicação dos marcadores moleculares buscamos acessar a variabilidade genética de *P. hatschbachii* para assim compreender os aspectos relacionados à sua diversidade e aos processos evolutivos que moldam a estrutura das populações desta espécie.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar os índices de diversidade e estrutura genética de populações de *P. hatschbachii* por meio da aplicação de marcadores AFLP, ITS e *rps16*;
- Elucidar os mecanismos evolutivos que possam estar atuando no padrão da distribuição da variabilidade genética da espécie no espaço;
- Obter informações genéticas que possam contribuir para um melhor entendimento da biologia da espécie, bem como para a aplicação de ações de conservação dos afloramentos rochosos de sua ocorrência;

4. ARTIGO

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
Portulaca hatschbachii D. Legrand: UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DOS
AFLORAMENTOS ROCHOSOS DE BASALTO DO ESTADO DO
PARANÁ**

*Este artigo será submetido à revista: *Botanical Journal of the Linnean Society*

ARTIGO ORIGINAL

**Diversidade e Estrutura Genética de Populações de *Portulaca hatschbachii*
D. Legrand: Uma Espécie Endêmica dos Afloramentos Rochosos de
Basalto do Estado do Paraná**

Daniele Cassiano Feliciano^{1, *}, Claudete de Fátima Ruas¹

¹ *Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 10011, 86057-970 Londrina, Paraná, Brasil*

**E-mail para correspondência: daniele.uenp@gmail.com*

Running title: Diversity and genetic structure in populations of *Portulaca hatschbachii*

RESUMO

FELICIANO, Daniele Cassiano. **Diversidade e estrutura genética de populações de *Portulaca hatschbachii* D. Legrand: Uma espécie endêmica dos afloramentos rochosos de basalto do estado do Paraná.** 2018. 90 pg. Mestrado em Genética e Biologia Molecular - Universidade Estadual de Londrina, 2018.

O gênero *Portulaca* abrange um grupo de plantas popularmente conhecidas como “onze horas”, caracterizadas como ervas suculentas perenes ou anuais. Algumas espécies possuem propriedades terapêuticas e relevante importância em áreas agrícolas e paisagismo. *Portulaca hatschbachii* é uma espécie ameaçada de extinção, que não dispõe de dados genéticos descritos na literatura. A espécie se distribui pelos Campos de Altitude associados à Mata Atlântica, tendo ocorrência restrita aos afloramentos rochosos de basalto do Paraná. Esses ambientes foram erroneamente considerados como sendo detentores de pouca riqueza de espécies, o que colaborou para que esse habitat extremamente rico em biodiversidade fosse cruelmente negligenciado e desprotegido. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo acessar a diversidade genética de *P. hatschbachii* por meio de marcadores AFLP, *rps16* e ITS. Além de 347 indivíduos de *P. hatschbachii*, foram analisados 85 indivíduos de *P. grandiflora* como forma de comparar os índices de diversidade de uma espécie com ampla distribuição. Informações importantes para estimativa de parâmetros de diversidade e estrutura genética das populações de *P. hatschbachii*, puderam ser estimadas pelos marcadores AFLP. Os resultados evidenciaram baixos níveis de variação intrapopulacional, fluxo gênico limitado e níveis elevados de estruturação genética. A análise de agrupamento Bayesiano (BAPS) revelou a existência de dois *clusters* genéticos para *P. grandiflora* e oito *clusters* genéticos para *P. hatschbachii*. A *Neighbor-Net* construída para as duas espécies corroborou os mesmos *clusters* obtidos pelo BAPS. A análise das sequências de cpDNA (*rps16*) encontrou 4 haplótipos e nrDNA (ITS) 3 haplótipos diferentes nas populações. A diversidade gênica das populações de *P. hatschbachii* foi, de maneira geral, baixa, o que pode ter relação com a biologia reprodutiva da espécie e ao padrão de distribuição endêmica e restrita à afloramentos rochosos. O Teste de Mantel, bem como as análises de agrupamento Bayesiano e *Neighbor-Net*, mostraram que as populações de *P. hatschbachii* se encontram isoladas pela distância. O escaneamento realizado pelo Bayescan, verificou a presença de locos sob seleção diversificadora, a qual pode ser uma importante força a moldar os padrões de distribuição da variação genética na espécie.

Palavras-chave: Portulacaceae; AFLP; Marcadores Moleculares; Flora em extinção

ABSTRACT

FELICIANO, Daniele Cassiano. **Diversity and genetic structure in *Portulaca hatschbachii* D. Legrand populations: endemic in basalt rocky outcrops in Paraná state.** 2018. 90 pg. Master Degree in Genetic and Molecular Biology - State University of Londrina, 2018.

Genus *Portulaca* includes a group of plants popularly known as "onze horas", characterized as perennial or annual succulent herbs. Some species have therapeutic properties and relevant importance in agricultural areas and landscaping. *Portulaca hatschbachii* is an endangered species that does not have genetic data described in literature. The species is distributed in the Height Fields associated to the Atlantic Rain Forest, restricted to the basalt rocky outcrops of Paraná. These environments were erroneously considered to have low species richness, which contributed to make this extremely rich biodiversity habitat to be cruelly neglected and unprotected. Thus, the present study aimed to access the genetic diversity of *P. hatschbachii* through AFLP, rps16 and ITS markers. In addition to 347 individuals of *P. hatschbachii*, 85 individuals of *P. grandiflora* were analyzed as a way to compare the diversity indexes in a species with wide distribution. Important information for diversity parameters estimations and genetic structure of *P. hatschbachii* populations could be estimated by the AFLP markers. The results showed low levels of intrapopulation variation, restricted gene flow and high levels of genetic structure. Bayesian Analysis of Population Structure (BAPS) revealed the existence of two genetic clusters for *P. grandiflora* and eight genetic clusters for *P. hatschbachii*. The Neighbor-Net built for the two species corroborated the same clusters obtained by BAPS. Analysis of cpDNA sequences (rps16) found 4 haplotypes and nrDNA (ITS) 3 different haplotypes in populations. Genetic diversity of *P. hatschbachii* populations was generally low, which may be related to the species reproductive biology and to the pattern of endemic and restricted distribution to rocky outcrops. The Mantel test, as well as the Bayesian and Neighbor-Net cluster analyzes of the populations, showed that *P. hatschbachii* populations are isolated by distance. The Bayescan test verified the presence of loci under diversification selection, which may be an important force shaping the distribution patterns of genetic variation in the species.

Keywords: Portulacaceae; AFLP; Molecular Markers; Flora in extinction.

Introdução

A família Portulacaceae Juss., com distribuição nas Américas, África, Austrália, Europa e Ásia, apresenta uma história taxonômica controversa, tendo sua circunscrição debatida por mais de 200 anos. Na classificação feita por Carolin (1993), a família era composta por 30 gêneros e cerca de 450 espécies. Porém, análises filogenéticas moleculares levaram à segregação de Portulacaceae em quatro famílias: Anacampserotaceae, Montiaceae, Portulacaceae e Talinaceae (Hershkovitz & Zimmer, 1997; Applequist & Wallace, 2001; Applequist *et al.*, 2006; Nyffeler, 2007; Thorne & Reveal, 2007; Nyffeler & Egli, 2010; Ocampo, 2013). Dentro da nova classificação taxonômica, a família Portulacaceae é representada por apenas um gênero, *Portulaca* L., o qual se relaciona mais proximamente à família Cactaceae (Ocampo & Columbus, 2012).

O gênero *Portulaca*, apresenta aproximadamente 115 espécies, caracterizadas como herbáceas carnosas, anuais ou perenes, com folhas opostas a alternas e tricomas nas axilas foliares. As flores são bissexuadas, com numerosos estames, apresentam duas sépalas e 4 - 5 pétalas livres, formando ou não inflorescências capituliformes rodeadas por folhas involucrais (Eggl & Ford-Werntz, 2002; Coelho & Giulietti, 2010; Ocampo & Columbus, 2010).

No Brasil, o gênero *Portulaca* é representado por aproximadamente 13 espécies que se distribuem desde a Amazônia até a região Sul do país, preferencialmente nas regiões semiáridas, onde são encontradas em maior número. Algumas espécies são caracterizadas por endemismos, como no caso de *P. weedermannii* Poelln (Bahia), *P. minensis* D. Legrand (Minas Gerais) e *P. hatschbachii* D. Legrand (Paraná) (Coelho & Giulietti 2010; Flora do Brasil, 2017).

Portulaca hatschbachii ainda é pouco conhecida. Esta espécie apresenta um sistema radicular característico, muito desenvolvido em relação ao tamanho da planta, exibe tricomas com cor castanha, pétalas magenta e folhas de coloração quase negra quando herborizadas (Coelho, 2006; Coelho & Giulietti, 2010). A ocorrência restrita de *P. hatschbachii*, nos afloramentos rochosos basálticos dos Campos de Altitude Paranaense, tornam a conservação da espécie preocupante, visto que estes afloramentos são altamente negligenciados. Por muito tempo esses ambientes foram considerados como áreas de pouca biodiversidade e, portanto, foram explorados pela extração de suas rochas, pela substituição de sua vegetação nativa por pastagens, ou ainda invadidos por plantas exóticas ou pelas práticas de silvicultura

(Nabinger; Moraes & Maraschin, 2000; DNPM, 2008; Hirota, 2011). Devido aos processos de fragmentação sofridos pela Mata Atlântica (Ribeiro *et al.*, 2009), bioma ao qual os Campos de Altitude estão associados, e a área de ocupação reduzida (menos de 500 km²) de *P. hatschbachii*, a espécie foi classificada no Livro Vermelho da Flora do Brasil como “Em perigo” (EN) de extinção (Guimarães *et al.*, 2013).

A fragmentação ou a perda de habitats, assim como a introdução de espécies exóticas, mudança na composição de ecossistemas, desequilíbrio ecológico, contaminação e a poluição, além das mudanças climáticas, são apontadas como as maiores causas da redução da diversidade genética das espécies. De modo particular, espécies endêmicas, já tendem a apresentar menores níveis de diversidade em suas populações (Cavalli & Winge, 2003).

Em populações naturais, a distribuição da variabilidade genética é influenciada pelo modo de reprodução, tamanho da população, distribuição geográfica e fluxo gênico, bem como, por mudanças ambientais, naturais ou causadas pelo homem, que venham a eliminar parte dos indivíduos da população (Hamrick, 1982). Desta maneira, uma redução significativa no tamanho das populações seria capaz de submetê-las à deriva genética, podendo leva-las à perda de diversidade e depressão por endogamia, o que consequentemente reduziria a fertilidade, o vigor e a capacidade reprodutiva dos indivíduos, culminando com uma redução do fitness adaptativo dos mesmos (Allard, 1971; Sebbenn & Etori, 2001).

Assim, estimar os índices de diversidade genética de populações naturais é importante para inferir sobre sua estrutura genética, a qual é reflexo do equilíbrio entre a deriva genética e o fluxo gênico (Wright, 1978). Nesse contexto, os marcadores moleculares constituem ferramentas importantes para acessar os padrões de variabilidade genética dentro e entre populações (Ruas *et al.*, 2011; Conson *et al.*, 2013), permitindo inferir sobre o modo de reprodução e estrutura populacional, bem como indicar eventos referentes à migração e dispersão de populações através do processo evolutivo da espécie (Avise, 1994; Avise, 2000).

Dentre os diferentes tipos de marcadores moleculares, os AFLP se destacam pela quantidade de fragmentos polimórficos gerados. Apesar do seu caráter dominante, esses marcadores apresentam vantagens, uma vez que não necessitam de sequenciamento prévio do genoma, são altamente reprodutíveis, geram uma grande quantidade de informação para indivíduos e populações e se encontram amplamente distribuídos por todo o genoma, permitindo inferências robustas sobre a diversidade e estrutura genética de populações

naturais (Portis *et al.*, 2004; Shan *et al.*, 2004; Conson *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2013; Pometti *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2016; Tinnert *et al.*, 2016).

Considerando a inexistência de dados moleculares para *P. hatschbachii* e seu status de espécie “Em perigo” de extinção, no presente estudo usamos marcadores AFLP, cpDNA (*rps16*) e nrDNA (ITS), em populações desta espécie, tendo como foco os seguintes objetivos: a) entender, a partir das informações obtidas, os processos evolutivos e padrões de distribuição da diversidade genética de *P. hatschbachii* ao longo de sua área de ocorrência; b) analisar uma segunda espécie, *Portulaca grandiflora*, de distribuição ampla, para comparar e melhor entender os padrões de diversidade genética de *P. hatschbachii*, de distribuição restrita; e c) a partir da interpretação dos resultados, buscar entender como fatores ecológicos e antrópicos afetam a diversidade genética e o atual status ‘em perigo’ de *P. hatschbachii*, com vistas a estabelecer estratégias para a conservação e proteção da espécie.

Material e Métodos

AMOSTRAGEM E CARACTERIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE COLETA

Foram coletadas folhas de cerca de 30 indivíduos por localidade, em pacotes de papel contendo sílica gel, sendo posteriormente armazenadas em caixas de isopor para se evitar luz e umidade, realizando periodicamente a troca da sílica. Algumas plantas foram coletadas para cultivo em casa de vegetação. As coletas se deram no período de agosto/2017 a setembro/2017, nas áreas de distribuição de *P. hatschbachii*.

Além de 12 populações de *P. hatschbachii*, foram coletadas três populações de *P. grandiflora* (Tabela 1), quando ao visitar os afloramentos rochosos de possível ocorrência de *P. hatschbachii*, amostramos tais populações. Ainda que as duas espécies não tenham sido encontradas em co-ocorrência e sejam morfologicamente diferentes, as três populações de *P. grandiflora* foram mantidas no presente estudo e analisadas para fins comparativos entre as populações de *P. hatschbachii*.

Tabela 1 - Localização e coordenadas geográficas das populações de *P. hatschbachii* e *P. grandiflora*, coletadas no Estado do Paraná – PR.

LOCALIDADES	POPULAÇÃO	N. INDIVÍDUOS	ALTITUDE (M)	VOUCHER (HERBÁRIO UEL)	COORDENADAS GEOGRÁFICAS
<i>P. hatschbachii</i>					
Lerroville	LRV	30	674	FUEL 55722	23°38'20.89"S, 51° 5'26.43"O
Lerroville	LRV1	29	793	FUEL 55713	23°42'27.00"S, 51° 0'36.00"O
Lerroville	LRV2	29	773	FUEL 55715	23°42'1.68"S, 51° 0'47.99"O
Lerroville	LRV3	29	809	FUEL 55714	23°42'10.24"S, 51° 0'33.14"O
Luiziana	LUI1	27	667	FUEL 55711	24° 9'45.09"S, 52°16'17.03"O
Luiziana	LUI2	30	661	FUEL 55718	24°12'9.24"S, 52°19'18.33"O
Turvo	TUV	27	1008	FUEL 55720	25° 2'6.30"S, 51°32'20.40"O
Guarapuava	GUA	29	952	FUEL 55719	25°25'28.00"S, 51°48'7.00"O
Lagoa Seca	LSC	29	945	FUEL 55712	25°25'25.00"S, 51°54'30.00"O
Br277 – Km 405	BR277	29	827	FUEL 55717	25°25'48.00"S, 52° 0'36.00"O
Cantagalo	CAN	30	714	FUEL 55721	25°24'40.00"S, 52° 3'54.00"O
Pinho Fleck	PFK	29	864	FUEL 55716	26°13'26.00"S, 52°23'47.00"O
<i>P. grandiflora</i>					
Congonhas	CONG	27	521	FUEL 55723	23°11'46.19"S, 50°42'24.09"O
Cruzeiro Do Norte	CRN	30	508	FUEL 55724	23°12'1.27"S, 50°52'22.06"O
Campo Mourão	CM	28	553	-	24° 2'14.00"S, 52°21'10.00"O

As localidades amostradas encontram-se distribuídas no Bioma Mata Atlântica, ao longo do Terceiro Planalto Paranaense, em afloramentos rochosos basálticos (Maack, 2012; Machado, 2003). As áreas onde se encontra *P. hatschbachii* estão em altitudes superiores a 600 m, estando situadas, em sua maioria, em formações fitogeográficas de ambiente montano, de Floresta Estacional Semidecidual (populações LRV, LRV1; LRV2; LRV3) ou de Floresta

Ombrófila Mista (populações LUI1; LUI2; TUV; CAN; PFK). Contudo, foram também coletadas populações em formações de Campos Naturais (populações BR277; LSC; GUA). As populações de *P. grandiflora*, por sua vez, foram obtidas em altitude abaixo de 600 m, ocorrendo em formações fitogeográficas da Floresta Estacional Semidecidual, Submontana (CRN) e Montana (CONG) e da Floresta Ombrófila Mista Montana (CM) (Fig. 5).

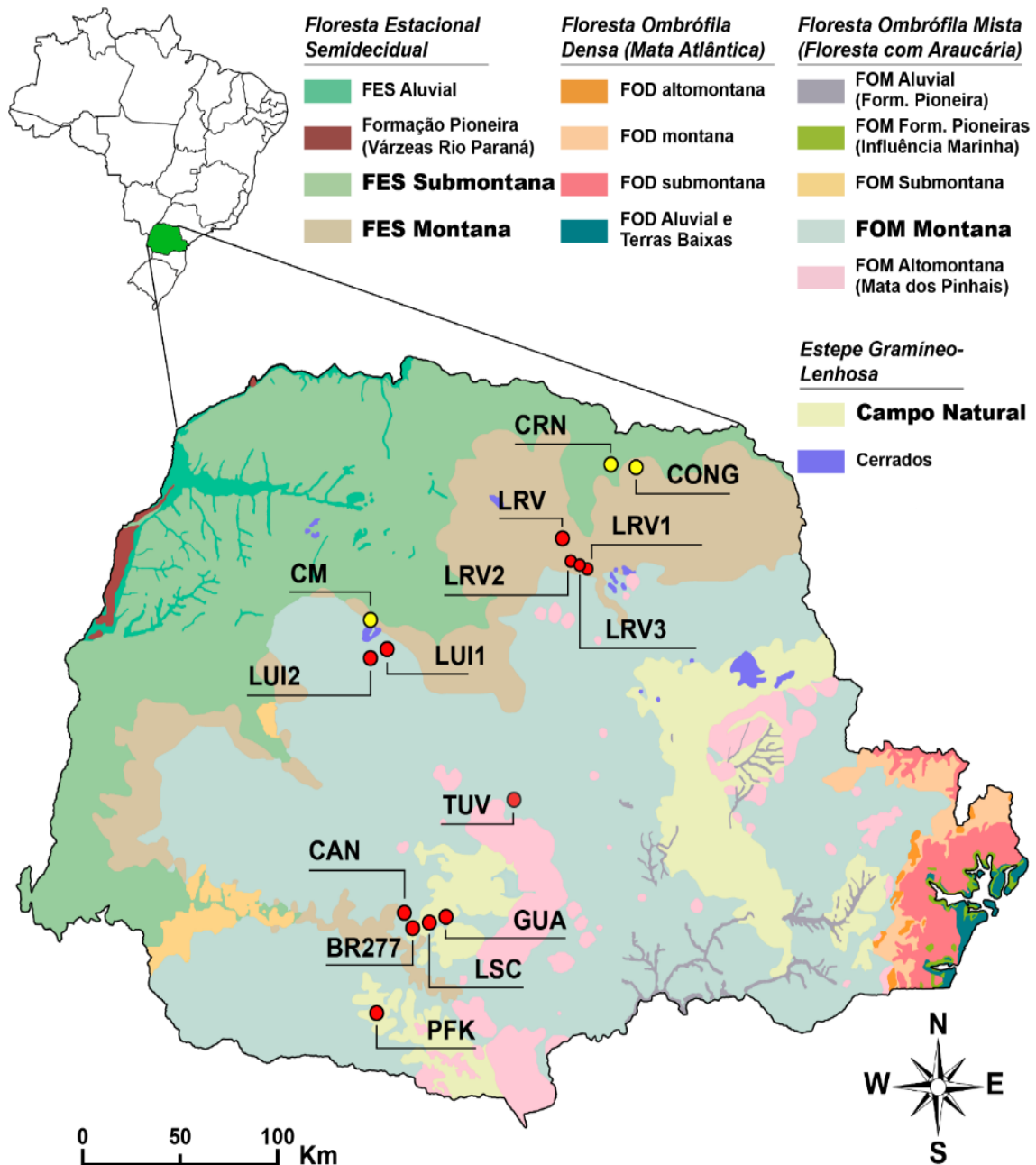


Figura 5 - Áreas de coleta das espécies: *P. hatschbachii* (círculos vermelhos) e *P. grandiflora* (círculos amarelos). **Fonte:** Adaptado do mapa ITCG (2009) de Formações fitogeográficas do Paraná –PR.

Alguns padrões característicos das regiões puderam ser observados. As populações mais ao Norte do Estado (populações LRV, LRV1; LRV2; LRV3), por exemplo, apresentaram áreas circundadas tanto por fragmentos típicos de Floresta Estacional Semidecidual bem como por plantações de milho, soja e pastagens para o gado. Já nas região mais Centro-Oeste, observamos a ocorrência das populações TUV, LUI1 e LUI2 em afloramentos com o entorno composto por silvicultura típica da região, como o *Eucaliptos* e *Pinus*. Nos afloramentos da região Centro-Sul do Estado as populações (LSC; GUA; CAN; BR277; PFK) apresentaram uma formação com fragmentos de Floresta Ombrófila Mista entremeados por plantações de soja e milho. Para além da ocorrência restrita nos afloramentos rochosos, as populações amostradas apresentam em comum a localização em propriedades privadas e a forte degradação do ambiente em que se distribuem, devido à extração de rochas para a construção civil e uso de pastagens.

EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO DE NRDNA E CPDNA

O DNA total foi extraído a partir das folhas secas em sílica utilizando-se tampão CTAB 5 % (*cetyltrimethylammonium bromide*), segundo o protocolo de Doyle e Doyle (1987) com modificações. Utilizou-se cerca 150 mg de folhas que foram trituradas no extrator automático (*Retch* MM 400) por 3 min. Após a trituração, foi adicionado a cada amostra 1,5 ml de tampão CTAB (CTAB 5 %, 20 mM-EDTA 0,5 M, 100 mM - Tris-HCl 1 M, NaCl 1 M, PVP 1 %, 20 µl de beta-mercaptoetanol e 2 µl de proteinase K), seguido de incubação em banho-maria à 65 °C por 1 hora, sendo as amostras homogeneizadas a cada 10 min. Imediatamente após a retirada das amostras do banho-maria, as mesmas foram incubadas em gelo por 5 min e levadas para centrifugação por 5 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo de 2 ml, sendo acrescentados 600 µl de clorofórmio-isoamílico (24:1), vertendo-se cuidadosamente por 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 14.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. O procedimento de lavagem com clorofórmio-isoamílico foi repetido mais uma vez. Posteriormente, foram adicionados 2/3 do volume do sobrenadante de isopropanol gelado, e em seguida as amostras foram homogeneizadas levemente e armazenadas no freezer -20 °C por no mínimo 2 horas. O DNA foi precipitado por centrifugação durante 10 min a 14.000 rpm e o pellet lavado com 500 µl de etanol 70 % gelado (2x) e deixado em temperatura ambiente para secar. A eluição foi feita em 40 µl de TE (0,1 nM) e a degradação do RNA realizada com 3 µl de RNase (110 mg/ml) por 30 min a 37 °C. A concentração de DNA foi estimada por espectrofotometria no

NanoDrop 2000/2000c (*Thermo Scientific*) e a integridade do DNA total verificada por eletroforese em gel de agarose 1 %.

Para se acessar a diversidade genética das espécies em estudo, além da técnica de AFLP, aplicada a todos os indivíduos das populações amostradas, foram realizados o sequenciamento da região de DNA ribossômico nuclear (nrDNA) ITS1-5.8S-ITS2 e do íntron ribossomal cloroplastidial (cpDNA) *rps16* de cerca de seis indivíduos de cada população. Portanto, neste estudo, foram geradas 178 novas sequências para as regiões ITS1-5.8S-ITS2 e *rps16* (Tabela 3).

REAÇÕES DE AFLP, ELETROFORESE CAPILAR E REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO

A técnica de AFLP foi realizada seguindo o protocolo proposto por Vos et al. (1995), com modificações. A restrição, de aproximadamente 500 ng de DNA e a ligação dos adaptadores aos fragmentos gerados foram realizadas numa única reação. Para a restrição foi utilizada 1 U de enzima de restrição *MseI* (*New England Biolabs Inc*); 5 U de enzima de restrição *EcoRI* (*Thermo Scientific*) e tampão *MseI* 10X (*New England Biolabs Inc*). Para a ligação dos fragmentos pela enzima T4 DNA ligase 1 U, foram utilizados adaptadores *EcoRI* (0,16 μ M) e *MseI* (1,66 μ M); tampão T4 DNA ligase 5X (*Thermo Scientific*); NaCl (0,016 M); BSA (1,6 mg/mL); DTT (0,16 mM) e água para um volume final de 30 μ L. As amostras foram incubadas por 4 h a 37 °C para a restrição, seguidas de 1 h e 15 min a 22 °C para a ligação dos adaptadores e por 10 min a 70 °C para inativação térmica das enzimas. O padrão da restrição-ligação foi verificado em gel de agarose 1 % e em seguida o produto foi diluído na proporção de 1:4 com água ultrapura.

A reação de amplificação pré-seletiva foi preparada utilizando 3,5 μ L de *GoTaq® Green Master Mix* (*Promega*); 0,3 μ M dos *primers* pré-seletivos *EcoRI* e *MseI*, contendo as sequências de bases dos respectivos adaptadores mais a base pré-seletiva A para *EcoRI* e C para *MseI*; 3,0 μ L da diluição da restrição-ligação e água ultrapura para completar o volume de 10 μ L. O programa da amplificação pré-seletiva consistiu de: 1 ciclo de 72 °C por 2 min, 20 ciclos de 94 °C por 1 seg, 56 °C por 30 seg, 72 °C por 2 min e um ciclo final de 60 °C por 30 min. A confirmação da amplificação pré-seletiva foi visualizada em gel de agarose 1 % e o produto amplificado foi diluído para a proporção 1:8 em água ultrapura. Para a amplificação seletiva foi feito um *screening* inicial com oito combinações de *primers* seletivos *EcoRI/MseI*, em gel de poliacrilamida 7 %. As quatro combinações mais polimórficas e reprodutíveis foram

selecionadas e aplicadas a todas as amostras. As combinações escolhidas foram: *EcoRI*-ACA (6-FAM) / *MseI*-CAAG; *EcoRI*-AGG (NED) / *MseI*-CAA; *EcoRI*-ACT (VIC) / *MseI*-CTG; *EcoRI*-AGC (PET) / *MseI*-CTAG.

As reações seletivas foram realizadas em um volume de 10 µL contendo 3,5 µL do kit *GoTaq® Green Master Mix (Promega)*; 0,27 µM de *primer MseI*; 0,054 µM de *primer EcoRI* marcado com fluoróforo; 2,5 µL da reação de pré-amplificação diluída e 2,92 µL de água ultrapura. O programa de amplificação foi composto por 1 ciclo de 94 °C por 2 min, 65 °C por 30 seg e 72 °C por 2 min; 8 ciclos de 94 °C por 1 seg, 64 °C por 30 seg e 72 °C por 2 min; 23 ciclos de 94 °C por 1 seg, 56 °C por 30 seg e 72 °C por 2 min e 1 ciclo final de 60 °C por 30 min.

Para resolução dos produtos de PCR obtidos pela amplificação seletiva com *primers EcoRI* marcados com fluoróforos (FAM, VIC, PET e NED), as reações foram combinadas na seguinte proporção: 2 µL de 6-FAM, 2 µL de VIC, 2 µL de NED, 2 µL de PET e 2 µL de água ultrapura. Desta mistura 1 µL foi adicionado a 0,2 µL de *size standard 600-LIZ (GeneScan v2.0)* e 8,8 µL de formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*). Em seguida as amostras foram desnaturadas a 95 °C por 3 minutos e imediatamente colocadas no gelo, sendo, por fim, submetidas à eletroforese capilar em sistema automatizado ABI 3500 xL *Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*.

Para a amplificação das regiões ITS e *rps16* foram realizadas reações de PCR utilizando-se 25 ng de DNA; 7.5 µl de *GoTaq® Green Master Mix (Promega)*; 0.6 µl de *primers* forward e reverse (10 µM); 0.6 µl de DMSO (dimetilsufóxido) e água ultra-pura para um volume final de 15 µl. As regiões foram amplificadas utilizando os pares de *primers* 17SE e 26SE (Sun *et al.* 1994) para ITS1-5.8S-ITS2 e *rps16* F e *rps16* R (Oxelman *et al.* 1997) para *rps16* seguindo as condições de ciclagem descritas pelos autores. Os produtos de PCR foram checados em gel de agarose 1 % antes de serem purificados com o kit *illustra™ ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare, Little)*. O sequenciamento foi conduzido em ambas as direções, forward e reverse, utilizando o kit *BigDye® terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer/Applied Biosystems)* e o ABI 3500 xL *Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*.

ANÁLISE DOS DADOS DE AFLP E SEQUÊNCIAS

A detecção de picos dos eletroferogramas e a determinação do número de fragmentos gerados partir dos dados de AFLP foram realizadas pelo *software GeneMaPPer® v.4.1 (Applied Biosystems)*. Os picos foram definidos para todas as amostras com base em uma

unidade de fluorescência relativa mínima de 50 RFU, *light smooth* e detecção automática de *bins* com variação de 1 pb. Fragmentos com tamanho variando de 75 a 450 pares de bases, provenientes dos quatro pares de *primers*, foram combinados em uma única matriz binária de presença (1) e ausência (0).

O sequenciamento das regiões ITS e *rps16* geraram um total de 89 sequências para cada região. A chamada de bases e montagem de sequências *contigs* das duas regiões sequenciadas foram realizadas de forma automática utilizando os *softwares* Phred v.071220.c (Ewing *et al.* 1998) e Phrap v.1.090518 (Green, 1999), seguida de inspeção visual e manipulação dos cromatogramas utilizando o pacote Chromaseq v.1.12 (Maddison & Maddison, 2014a) do sistema de computação filogenética Mesquite v.3.03 (Maddison & Maddison, 2014b). O alinhamento das sequências foi realizado pelo MUSCLE v.3.8.31 (Edgar, 2004) e refinado manualmente.

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *P. HATSCHBACHII* E *P. GRANDIFLORA*

A diversidade genética intrapopulacional estimada a partir dos marcadores AFLP para as duas espécies foi inferida a partir do número (LP) e percentual de locos polimórficos (PLP) e da diversidade gênica (Hj), análogo ao *He* de Nei (Nei, 1978), usando o *software* AFLP-SURV v.1.0 (Vekemans, 2002). O número de fragmentos privados foi inferido pelo *software* FAMD (*Fingerprint Analysis with Missing Data*) (Schlueter & Harris, 2006). O índice de raridade DW, foi estimado utilizando o pacote do R AFLPDAT (Ehrich, 2006). Este índice, pode ser utilizado como uma medida de divergência genética populacional, pois estima a frequência de um dado fragmento AFLP na população e divide pela frequência global do marcador em todo o conjunto de dados, sendo, portanto, os valores de DW, mais altos para fragmentos raros e substancialmente menores para bandas que são comuns no conjunto geral de dados (Schönswetter & Tribsch, 2005). Para os dados de *rps16* e ITS também foram calculados índices de diversidade, sendo os *indels* (eventos de inserção e deleção) considerados em todas as análises. As estimativas do número de haplótipos (Nhap), número de sítios polimórficos (S), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π) (Nei, 1987) foram realizadas pelo *software* ARLEQUIN v.11 (Excoffier; Laval & Schneider, 2005).

Para estimar o particionamento da variância genética para os dados de AFLP, ITS e *rps16*, dentro e entre populações de ambas espécies separadamente, foi realizada uma análise de variância para dados moleculares (AMOVA) por meio do *software* ARLEQUIN v.11 (Excoffier; Laval & Schneider, 2005) utilizando-se 10.100 permutações para confirmar a

significância do teste. A partir da AMOVA foi estimada, ainda, a diferenciação populacional através do índice F_{st} total e par a par utilizando o mesmo *software*. O fluxo gênico foi estimado a partir da estatística- F , F_{st} , a qual foi utilizada como uma medida de diferenciação entre as populações, indicando o número de migrantes entre pares de populações por geração. Para essa finalidade, foi utilizada a fórmula “ $M = (1 - F_{st}) / (8 F_{st})$ ”, proposta por Nielsen & Slatkin (2013).

Visando identificar os grupos genéticos existentes entre amostras de *P. hatschbachii* e determinar a qual desses agrupamentos os indivíduos amostrados pertencem, foi realizada uma análise *mixture* no *software* BAPS v.6.0 (Corander *et al.*, 2008), testando-se valores de $K = 1$ a $K = 20$. A partir dos grupos genético encontrados foi realizada uma análise *admixture*, para calcular a possível mistura genotípica ancestral entre as populações (Corander & Marttinen, 2006). Esta análise contou com 10.000 interações, tendo 500 indivíduos referência por população e 500 interações para cada indivíduo. O mesmo *software* foi utilizado para identificar os grupos genéticos existentes *P. grandiflora*, tendo como parâmetros os mesmo utilizados para *P. hatschbachii*, exceção apenas, ao número de K testados na análise *mixture* que foi de 1 a 6. A existência de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas foi verificada a partir do teste de Mantel, aplicado apenas para as populações de *P. hatschbachii*, a partir de todos os marcadores (AFLP, ITS e *rps16*). A matriz de distância F_{st} par a par foi gerada pelo *software* ARLEQUIN 3.5.1.3. (Excoffier; Laval & Schneider, 2005), enquanto a matriz de distância geográfica foi obtida por meio do satélite de imagens *Google Earth Pro* v.7.3.1.4507 (Google Inc). O coeficiente de correlação de Mantel (r) foi calculado pelo método “Pearson” utilizando o pacote VEGAN (Oksanen *et al.*, 2012) implementado no ambiente R v.1.1.423 (R Studio Team, 2018). Foram realizadas 10.000 permutações para confirmar a significância do teste. Para tentar discriminar as fontes de variação na estrutura espacial onde se encontram distribuídas as populações amostradas, foi verificada a auto correlação espacial entre as diferentes classes de distâncias geográficas, por meio do pacote VEGAN (Oksanen *et al.*, 2012) implementado no R v.1.1.423 (R Studio Team, 2018).

As relações entre as populações de *P. hatschbachii* e *P. grandiflora* foram verificadas por meio da construção de Neighbor-Net (Bryant & Moulton, 2004), a partir dos dados de AFLP, utilizando a distância genética de Nei-Li (Nei & Li, 1979). A matriz de distância par a par foi calculada pelo *software* PAUP* v.4.0b10 (Swofford, 2003) e a *Neighbor-Net* construída no *software* *SplitsTree* v.4.14.2 (Huson & Bryant, 2006) para cada espécie separadamente.

Dada a natureza endêmica e restrita de *P. hatschbachii*, e considerando o padrão de distribuição da diversidade e estrutura genética observados para a espécie (ver resultados), foi utilizado um método de investigação de locos *outliers* por meio do *software* Bayescan v2.1 (Foll & Gaggiotti, 2008). Este método bayesiano é amplamente utilizado para marcadores dominantes e estima diretamente a probabilidade *posteriori* de um determinado loco estar sob seleção, quando desvios da neutralidade nos valores de *Fst* em um loco específico, faz necessário um componente adicional (alfa diferente de 0) para explicar a variação encontrada, é provável que o loco apresente pressão seletiva atuando como força purificadora (alfa negativo) ou força diversificadora (alfa positivo) (Foll & Gaggiotti, 2008). Foram feitas 20 corridas pilotos de 5.000 interações para ajustar os parâmetros do modelo. O *burn-in* foi fixado em 50.000 interações, sendo o tamanho amostral definido em 5.000 e os intervalos “*thinning*” de interação entre as amostras definidos em 10, resultando em 50.000 interações.

Uma rede de haplótipos sem raiz, foi construída pelo método estatístico de parcimônia (Templeton *et al.* 1992), implementado no *software* TCS v1.21 (Clement *et al.* 2000), para inferir as relações genealógicas das sequências de ITS e *rps16* e estimar o haplótipo com maior probabilidade de ser o ancestral.

Resultados e Discussão

DIVERSIDADE GENÉTICA

A aplicação de quatro combinações de *primers* seletivos de AFLP em 432 indivíduos, sendo 347 de *P. hatschbachii* e 85 de *P. grandiflora*, possibilitou a análise de 1660 fragmentos AFLP, para *P. hatschbachii* sendo 99,58 % polimórficos e 883 fragmentos para *P. grandiflora* sendo 94,45 % polimórficos (Tabela 2).

Tabela 2 - Número total de fragmentos (NF) gerados e percentual de fragmentos polimórficos (% FP) para cada combinação de *primers* das 12 populações de *P. hatschbachii* e três populações de *P. grandiflora*.

<i>Primers (EcoRIRI / MseI)</i>	Nº Frag.	% Frag. polimórficos
<i>P. hatschbachii</i>		
<i>EcoRI+ACA / MseI+CAAG</i>	343	97,66
<i>EcoRI+AGG / MseI+CAA</i>	486	100
<i>EcoRI+ACT / MseI+CTG</i>	339	96,75
<i>EcoRI+AGC / MseI+CTAG</i>	492	100
TOTAL	1660	99,58
<i>P. grandiflora</i>		
<i>EcoRI+ACA / MseI+CAAG</i>	152	92,76
<i>EcoRI+AGG / MseI+CAA</i>	299	91,64
<i>EcoRI+ACT / MseI+CTG</i>	174	98,28
<i>EcoRI+AGC / MseI+CTAG</i>	258	96,12
TOTAL	883	94,45

Para *P. hatschbachii*, o percentual de locos polimórficos (PLP) teve considerável variação entre as localidades, tendo a população de (CAN) menor percentual (24,10 %) e LRV o maior (50,10 %), sendo o valor médio de 30,6 %. Foi encontrado um total de 178 fragmentos privados (F_{PRIV}) distribuídos entre as localidades. As populações LRV e TUV foram as que apresentaram maior percentual de fragmentos privados, 6,25 % e 6,85 %, respectivamente, enquanto LRV1, LSC e BR277 foram as populações que apresentaram os menores percentuais, 0,83 %, 0,82 % e 1 %, respectivamente. Maiores incidências de alelos privados têm sido identificadas em populações consideradas mais antigas. Por exemplo, em *Hypothenemus hampei* um parasita que causa “coffee Berry disease” nas culturas de café, a população que mostrou um número desproporcional de alelos privados foi considerada como estando próxima do centro de origem do parasita (Benavides *et al.* 2005). Em *Homo sapiens*, o maior número de alelos privados foi observado em populações da África, enquanto populações das Américas tiveram um número bem menor, fato este que concorda com a teoria da origem do ser humano na África, sendo que o mesmo alcançou o continente americano somente após uma série de eventos fundadores (Szpiech & Rosenberg, 2012). Logo a maior incidência de fragmentos privados foi verificada nas populações LRV e TUV, que também apresentaram maior variabilidade genética. Estes fatos permitem considerar que, possivelmente, a LRV (Tabela 3) é a população mais antiga da qual as outras derivaram por efeito fundador.

Em *P. hatschbachii* as sequências das regiões ITS1-ITS2 (ITS), tiveram comprimento alinhado de 550 pb, sem variação no tamanho, com apenas 3 sítios variáveis (0,54 %) e nenhum evento de inserção e deleção (*indels*), enquanto que para a região *rps16* as sequências variaram de 788 – 849 pb, tendo comprimento alinhado de 849 pb, com 2 sítios variáveis (0,24 %) e presença de 3 *indels*. Já em *P. grandiflora*, o comprimento das sequências de ITS alinhadas foi de 558 pb com 1 sítio variável (0,18 %), e para *rps16* o comprimento das sequências alinhadas foi 860 pb, não havendo sítios variáveis. Ambas as regiões não apresentaram *indels*. Os índices de diversidade intra e interpopulacional das regiões de ITS e *rps16* não puderam ser estimados satisfatoriamente, visto que houve pouca ou nenhuma variação entre as sequências, para as duas espécies (Tabela 3). Portanto, para evitar viés na interpretação desses dados apenas a informação que concerne ao número e distribuição dos haplótipos encontrados nessas sequências, será discutida.

Tabela 3 - Estimativas de diversidade genética de 12 populações de *P. hatschbachii* e três populações de *P. grandiflora* a partir de dados de AFLP, sequências ITS e *rps 16*.

Populações	AFLP							ITS					<i>rps 16</i>				
	N	NLP	PLP	Hj± sd	Fpriv	% Fpriv	DW	N	S	Nhap	Hd	π	N	S	Nhap	Hd	π
<i>P. hatschbachii</i>																	
LRV	30	832	50,10	0,146 ± 0,0037	52	6,25	663,92	6	0	1	0	0	6	0	1	0	0
LRV1	29	480	28,90	0,089 ± 0,0035	4	0,83	145,25	6	0	1	0	0	6	0	1	0	0
LRV2	29	543	32,70	0,101 ± 0,0035	16	3,06	226,15	6	0	1	0	0	6	0	1	0	0
LRV3	29	438	26,40	0,080 ± 0,0033	8	1,83	115,82	6	0	1	0	0	5	0	1	0	0
LUI1	27	523	31,50	0,106 ± 0,0036	16	3,06	339,30	6	0	1	0	0	6	0	1	0	0
LUI2	30	572	34,50	0,104 ± 0,0035	18	3,15	339,80	6	0	1	0	0	6	1	2	0,6	0,006
TUV	27	540	32,50	0,108 ± 0,0035	37	6,85	427,35	6	0	1	0	0	6	0	1	0	0
GUA	29	434	26,10	0,077 ± 0,0032	6	1,38	163,97	6	0	1	0	0	6	0	1	0	0
LSC	29	486	29,30	0,092 ± 0,0035	4	0,82	161,64	6	0	1	0	0	6	1	2	0,33	0,02
BR277	29	401	24,20	0,076 ± 0,0035	4	1	95,72	6	0	1	0	0	6	0	1	0	0
CAN	30	400	24,10	0,078 ± 0,0035	7	1,75	136,12	5	0	1	0	0	6	0	1	0	0
PFK	29	442	26,60	0,078 ± 0,0033	6	1,36	160,12	6	0	1	0	0	6	0	1	0	0
MÉDIA	28,92	507,58	30,6	0,09	15	2,61	247,93	6	0	1	0	0	6	0,17	1,2	0,08	0,0022
HT = 0.13								HTs	0,50		πt	0,0013	HTs	0,32		πt	0,0003
<i>P. grandiflora</i>																	
CONG	27	422	47,80	0,158 ± 0,0053	241	27,29	1.077,34	6	0	1	0	0	6	0	1	0	0
CRN	30	346	39,20	0,125 ± 0,0055	57	6,45	473,74	6	0	1	0	0	6	0	1	0	0
CM	28	318	36,00	0,106 ± 0,0050	73	8,26	656,33	6	0	1	0	0	6	0	1	0	0
MÉDIA	28,33	362	41	0,13	124	14	735,08	6	0	1	0	0	6	0	1	0	0
HT = 0.15								HTs	0,47		πt	0,0009	HTs	0		πt	0

Nota: N = número de indivíduos; NLP = número de locos polimórficos; PLP = percentual de locos polimórficos; Hj = diversidade gênica; s.d = desvio padrão; Fpriv = número de fragmentos privados; % Fpriv = percentual de fragmentos privados; DW = índice de raridade; S = sítios polimórficos; Nhap = número de haplótipos na localidade; Hd = diversidade haplotípica (diversidade gênica); π = diversidade nucleotídica; HT = Diversidade gênica para todo o conjunto amostrado a partir dos dados de AFLP; HTs = Diversidade gênica para todo o conjunto amostrado a partir dos dados de sequências; πt = diversidade nucleotídica para todo o conjunto amostrado.

Os índices de diversidade gênica de Nei (Hj) variaram de 0,076 (BR277) a 0,146 (LRV), com média de 0,09, sendo a diversidade gênica total (Ht) de 0,13 para *P. hatschbachii* e para *P. grandiflora*, a diversidade gênica total (Ht) foi de 0,15, variando de 0,106 em CM a 0,158 em CONG, com média de 0,13, um valor relativamente maior do que o encontrado em *P. hatschbachii*, visto que foi amostrado um número muito menor de indivíduos (85) em *P. grandiflora* (Tabela 3). De modo geral, *P. hatschbachii* mostrou níveis de diversidade genética (Ht = 0,13) abaixo daqueles previamente estimados para dados AFLP em outras espécies herbáceas-arbustivas, incluindo *Helmholtzia glaberrima* Hooker. (Ht = 0,25), *Olearia gardneri* Heads (Ht = 0,17), *Loropetalum subcordatum* Benth. (Ht = 0,26) e *Ranunculus cabrerensis* Rothm. (Ht = 0,19) (Prentis & Mather, 2008; Barnaud & Houlston, 2010; Gong; Gu & Zhang, 2010; Cires; Cuesta & Prieto, 2013), as quais também são endêmicas e ameaçadas de extinção. Interessantemente, até mesmo espécies endêmicas de ilhas, incluindo *Calandrinia galapagosa* H. St. John (Galápagos; Ht = 0,34), anteriormente circunscrita na família Portulacaceae, e *Armeria maderensis* Lowe (ilha da Madeira; Ht = 0,14) (Piñeiro *et al.*, 2009; Jaramillo; Atkinson & Gentile, 2011) mostraram estimativas de diversidade genética maiores que *P. hatschbachii*.

Quando a diversidade genética de *P. hatschbachii* é comparada com a outra espécie que também ocorre em afloramentos rochosos associados à Mata Atlântica, *Rhipsalis dissimilis* K. Schum. (endêmica dos estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo), esta última mostra uma diversidade genética inferior (Ht = 0,03), para dados dominantes ISSR (Giovanoni, 2014) do que a estimada para *P. hatschbachii*. Entretanto quando comparamos com a diversidade estimada para *P. grandiflora*, mesmo com grande diferença no número de indivíduos amostrados, esta apresenta maior diversidade gênica total e média (0,15; 0,13) que *P. hatschbachii* (0,13; 0,09) para os marcadores AFLP utilizados no presente estudo, evidenciando alguma implicação de sua ocorrência restrita nos índices de diversidade da espécie. Ainda dentro do mesmo gênero, populações de *Portulaca oleracea* L. (Ht = 0,35) foram previamente estudadas a partir de marcadores ISSR (Alam *et al.*, 2015), e *P. grandiflora* (Ht = 0,31) a partir de SRAP (*Sequence-Related Amplified Polymorphism*) (Jia *et al.*, 2017) mostraram estimativas de diversidade genética muito maiores que as de *P. hatschbachii*. Vale ressaltar, que *P. oleracea* e *P. grandiflora* são amplamente distribuídas (Zuloaga; Marrone & Belgrano, 2008), sem restrições significativas para o seu desenvolvimento diferentemente de *Rhipsalis dissimilis* (Ht = 0,03), que possui taxa de crescimento populacional lenta, o que em Cactaceae contribui em agravar a baixa variabilidade genética (Falk & Hosinger, 1991), e de *P. hatschbachii* que possui distribuição endêmica e restrita, características de distribuição que

naturalmente tendem a proporcionar índices de diversidade genética reduzidos (Cavalli & Winge, 2003; Serrote; Reiniger & Stefenon, 2016).

As populações de *P. hatschbachii* visitadas em campo, apresentavam uma razoável homogeneidade ambiental onde um número abundante de indivíduos podia ser observado. Contudo, tenderam a apresentar menores níveis de diversidade do que as amostras de *P. grandiflora*. Uma vez que espécies de distribuição restrita tendem a apresentar baixa diversidade genética, devido a colonização de novas áreas por efeito fundador (Cavalli & Winge, 2003), é possível que a reduzida diversidade genética de *P. hatschbachii* seja também devida à fundação de novas populações a partir de um ou poucos indivíduos, seguida de rápida expansão na área ocupada, o que resultaria numa grande densidade de indivíduos, porém com baixa diversidade genética.

ESTRUTURA GENÉTICA

A análise bayesiana de agrupamento sem mistura (*mixture*) do BAPS para as 12 populações de *P. hatschbachii*, resultou em oito *clusters* geneticamente distintos (Fig. 6), sendo o melhor marginal *likelihood* estimado (-126744,4475) para $K = 8$, com probabilidade posterior máxima ($p = 1$). Dentre os oito *clusters* observados, cinco foram correspondentes para cada população, LRV, TUV, GUA, LSC (cinco indivíduos de LSC sendo atribuídos ao *cluster* de GUA) e PKF e os outros três incluíram mais de uma população por *cluster*, agrupando as amostras de LRV1, LRV2 e LRV3 em um, LUI1 e LUI2 num outro e o terceiro *cluster* sendo formado por BR277 e CAN.

A análise *admixture* (com mistura), por sua vez, mostrou poucos indivíduos (20) apresentando alguma ancestralidade entre os oito agrupamentos encontrados. Os *clusters* formados pelas populações LRV, GUA e PKF não apresentaram mistura ancestral, ainda que tenha sido observada a presença do *pool* gênico destes em outros *clusters*. Quatro dos cinco indivíduos de LSC que pertencem ao *cluster* de GUA, apresentaram mistura com outros agrupamentos, ainda que, a maior parte do *pool* gênico tenha sido proveniente de GUA. Os demais *clusters* também apresentaram entre si algum percentual de ancestralidade, entretanto, esses foram baixos, evidenciando um forte isolamento entre os agrupamentos genéticos e homogeneidade das amostras dentro de cada população.

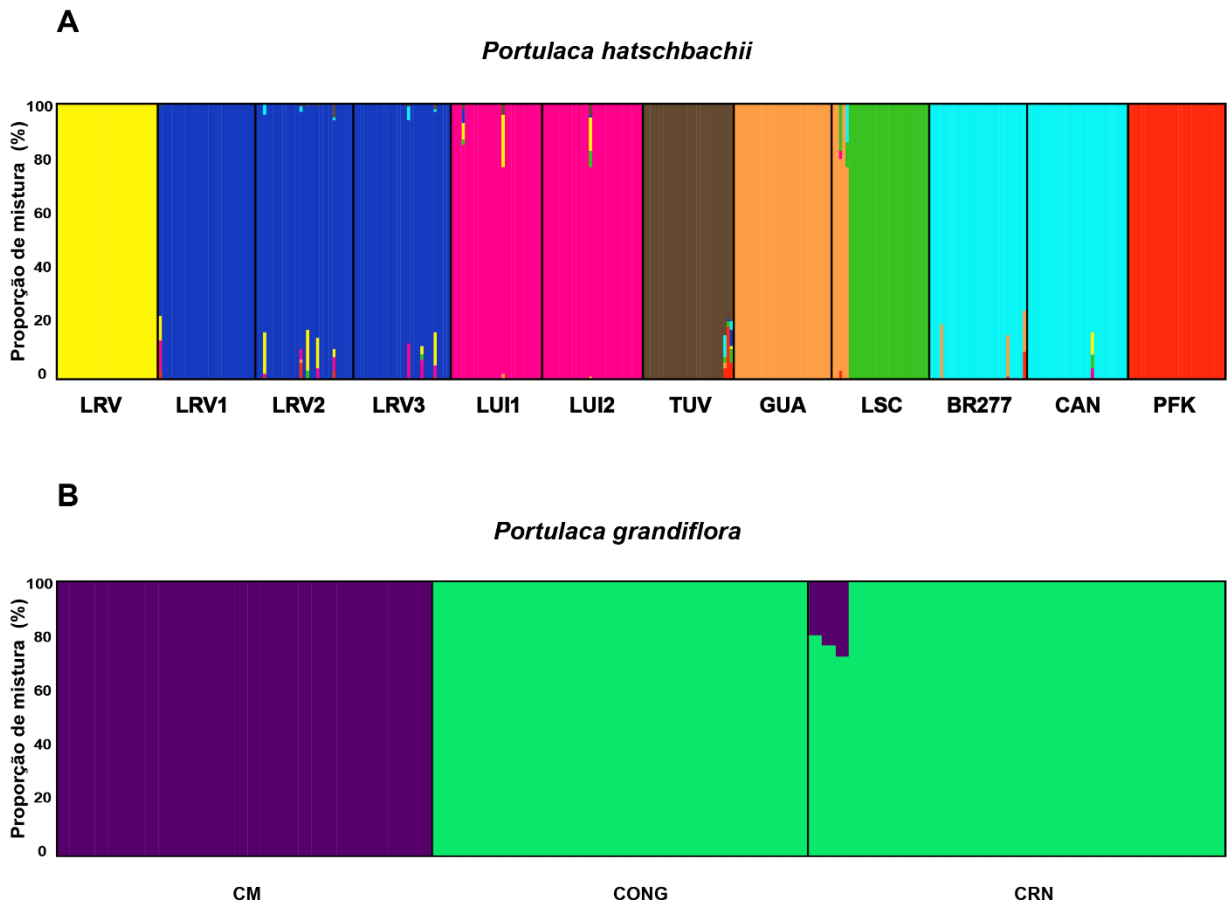


Figura 6 - Inferência Bayesiana de agrupamento realizada pelo BAPS para 12 populações de *P. hatschbachii* (a) e três populações de *P. grandiflora* (b). A análise encontrou o melhor resultado para $K = 8$ agrupamentos, a partir de 1660 fragmentos de AFLP para *P. hatschbachii* e o $K = 2$ agrupamentos para os 883 fragmentos de AFLP de *P. grandiflora*, provenientes de quatro combinações de *primers*. Cada população se encontra abaixo de cada grupo.

Para as populações de *P. grandiflora*, a análise *mixture* do BAPS encontrou o melhor *marginal likelihood* (-20180,8341) para $K = 2$, com probabilidade posterior máxima ($p = 1$), agrupando as amostras de CONG e CM num mesmo *cluster* e mantendo as amostras de CRN num agrupamento distinto (Fig. 6). Já a análise *admixture* mostrou apenas três indivíduos de CM com algum percentual (cerca de 20 %) de ancestralidade em CRN.

Este padrão de agrupamento foi corroborado pela *Neighbor-Net* construída pela distância de Nei-Li, a qual evidenciou os mesmos agrupamentos, com a presença de indivíduos de LSC dentro do cluster de GUA, inclusive. Exceção à estruturação observada em todos os *clusters* constituí as populações LRV1, LRV2 e LRV3, as quais apresentaram seus indivíduos misturados num único agrupamento.

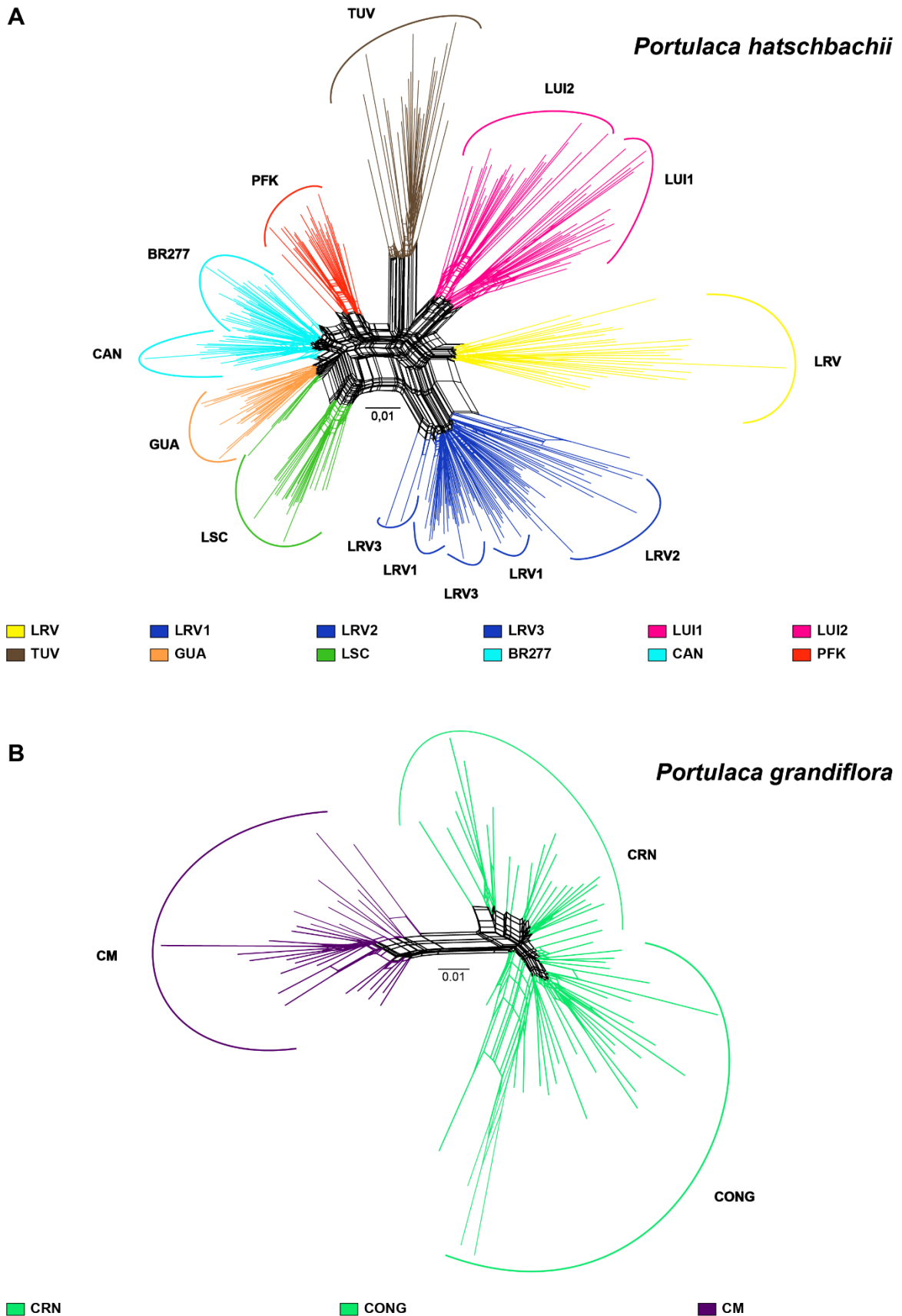


Figura 7 - *Neighbor-Net* baseada na distância de Nei-Li e inferida pelo *SplitsTree*. Relações filogenéticas de 12 populações de *P. hatschbachii* (a) e três populações de *P. grandiflora* (b), estimadas a partir dos dados de AFLP provenientes da combinação de quatro *primers*. Indivíduos das populações coloridos de acordo com os grupamentos genéticos encontrados pelo BAPS.

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou a existência de uma grande variação genética entre populações (35,88 %, $F_{st} = 0,36$), embora a maior parte da variação tenha ocorrido dentro das populações (64,12 %) de *P. hatschbachii* (Tabela 4). Para *P. grandiflora*, também um maior percentual de variação foi observado dentro das populações (75,45 %) do que entre elas (24,55 %), entretanto a diferenciação nesta espécie foi menor ($F_{st} = 0,24$) do que a observada para *P. hatschbachii* (Tabela 4). De acordo com Hartl & Clark (2010), valores de F_{st} menores que 0,05, de 0,05 a 0,15, de 0,15 a 0,25 e acima de 0,25, são considerados indicativos de diferenciação genética baixa, moderada, alta e muito alta entre populações, respectivamente. Com base na interpretação dos autores, as populações analisadas de *P. hatschbachii* podem ser consideradas altamente diferenciadas geneticamente, sendo as populações de *P. grandiflora* menos diferenciadas, ainda que com alto nível de divergência. A alta estruturação observada, pode apontar para um fluxo gênico restrito, ainda que a maior diferenciação genética dentro das populações sugira um sistema de reprodução por alogamia.

Tabela 4 - Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada aos marcadores AFLP, ITS e *rps16* para 12 populações de *P. hatschbachii* e três populações de *P. grandiflora*. g.l. = graus de liberdade; s.q. = soma dos quadrados; c.v. = componentes da variação; % de variação = Porcentagem da variação; *Fst* = índice de fixação.

<i>P. hatschbachii</i>						<i>P. grandiflora</i>					
AFLP											
Fontes de variação	g. l.	s.q.	c.v.	% de variação	<i>Fst</i>	Fontes de variação	g. l.	s.q.	c.v.	% de variação	<i>Fst</i>
Entre populações	11	15.514,50	45,94	35,88	0,36*	Entre populações	2	1.157	18	24,55	0,24*
Dentro das populações	335	27.506,83	82,11	64,12		Dentro das populações	82	4.644	57	75,45	
Total	346	43.021				Total	84	5.801	75		
ITS											
Entre populações	11	24,42	0,38	100	1*	Entre populações	2	4	0,33	100	1*
Dentro das populações	59	0,00	0	0		Dentro das populações	15	0	0	0	
Total	70					Total	17	4	0		
<i>rps 16</i>											
Entre populações	11	350,53	5,20	82,83	0,83*	Entre populações	2	0	0	0	0
Dentro das populações	59	63,67	1,08	17,17		Dentro das populações	15	0	0	0	
Total	70	414,20	6,28			Total	17	0	0		
*P	<	0,01	(teste	de	significância	de	10100	permutações)			

Estudos recentes, entretanto, têm mostrado que *P. hatschbachii* possui flores bissexuadas, exibindo dimorfismo quanto ao tipo de verticilo floral, podendo apresentar homostilia ou heterostilia do tipo longistilia, possuindo, portanto, um sistema misto de reprodução sexuada, o qual favorece tanto a fecundação cruzada, quanto a autofecundação, além de apresentar eventos de propagação vegetativa (Fig. 8. Santos, dados não publicados), sendo os dois últimos mecanismos capazes de reduzirem o fluxo gênico entre as populações. De fato, as estimativas do fluxo gênico, obtidas entre os pares de populações (Tabela 5), resultou em valor médio de 0,30 migrantes por geração para *P. hatschbachii*, sendo o menor número encontrado entre LRV3 e GUA (0,13) e o maior número entre LRV1 e LRV2 (2,50). Apenas os pares LRV1 x LRV2, LRV1 x LRV3 e LRV2 x LRV3 apresentaram número de migrantes maior que 1 por geração (tabela 5). Para *P. grandiflora*, a média foi de 0,47 e, nenhuma das comparações atingiu 1 migrante por geração entre as populações (CM/CRN = 0,29), (CM/CONG = 0,29), (CONG/CRN = 0,83). A regra amplamente utilizada em estudos de genética e conservação de populações tem como pressuposto que, um indivíduo migrante por população local, por geração, propicia fluxo gênico suficiente para manter a variabilidade genética e evitar depressão endogâmica nas populações (Mills & Allendorf, 1996; Wang, 2004). Assim, considerando os números de migrantes estimados para populações de *P. hatschbachii*, podemos dizer que, apenas as populações LRV1, LRV2 e LRV3 exibem fluxo gênico suficiente. As demais populações apresentam, portanto, fluxo gênico restrito.

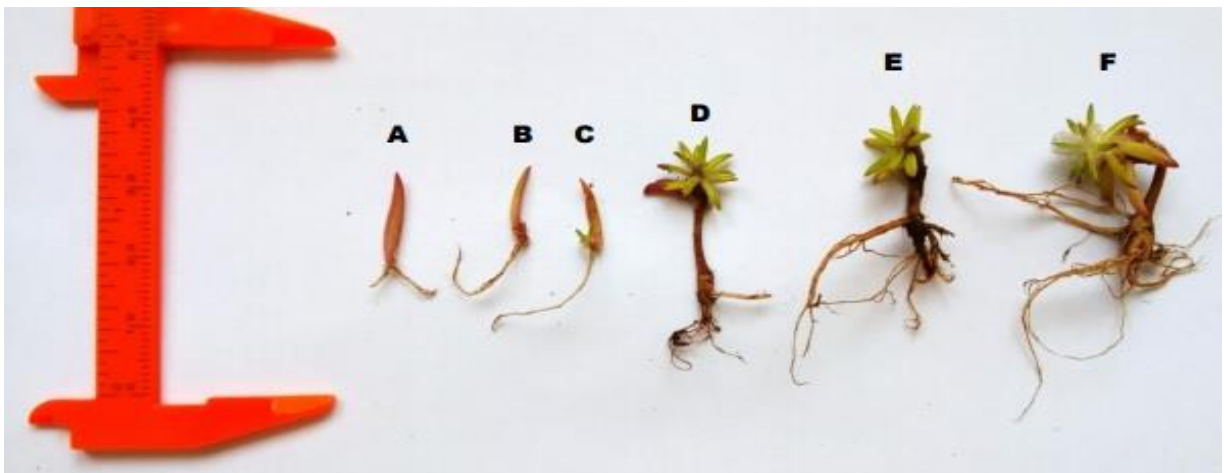


Figura 8 - Propagação vegetativa a partir da folha dos ramos vegetativos de *P. hatschbachii*. As letras condizem com o tempo de surgimento das raízes, sendo: (a) 25 dias (b) 30 dias (c) 35 dias (d) 45 dias (e) 50 dias (f) 60 dias. **Fonte:** Santos, dados não publicados.

Tabela 5 - Valores estimado de número de migrantes por geração conforme fórmula proposta por Nielsen e Slatkin (2013), para 12 populações de *P. hatschbachii*.

	LRV	LRV1	LRV2	LRV3	LUI1	LUI2	TUV	GUA	LSC	BR277	CAN	PFK
LRV	0											
LRV1	0,36	0										
LRV2	0,42	2,5	0									
LRV3	0,33	1,83	1,13	0								
LUI1	0,35	0,19	0,21	0,19	0							
LUI2	0,34	0,19	0,21	0,18	0,44	0						
TUV	0,37	0,19	0,21	0,18	0,25	0,28	0					
GUA	0,25	0,14	0,15	0,13	0,18	0,19	0,19	0				
LSC	0,27	0,19	0,21	0,19	0,18	0,19	0,19	0,33	0			
BR277	0,27	0,16	0,17	0,14	0,18	0,18	0,18	0,3	0,32	0		
CAN	0,25	0,16	0,18	0,15	0,17	0,18	0,17	0,24	0,38	0,77	0	
PFK	0,30	0,16	0,18	0,14	0,21	0,22	0,19	0,24	0,22	0,24	0,21	0

Além de um sistema reprodutivo misto, com presença de propagação vegetativa, a ocorrência restrita de *P. hatschbachii* em afloramentos rochosos pode ter implicações na atividade dos polinizadores, uma vez que reduz a densidade de recursos alimentares disponíveis e aumenta a distância entre esses recursos. Isto limitaria o potencial de polinização e, conseqüentemente, provocaria um aumento das taxas de cruzamento entre indivíduos aparentados e de autofecundação (Serrote; Reiniger & Stefenon, 2016).

A estruturação observada no agrupamento *Bayesiano*, na *Neighbor-Net* e na AMOVA pode ser corroborada pela distância geográfica entre as populações. O Teste de Mantel revelou uma correlação positiva ($r = 0,63$; $P = 0,0001$) entre as matrizes. Essa correlação entre as distâncias geográfica e genética, mostra que populações próximas tendem a ser mais similares geneticamente do que o esperado ao acaso (Fig. 9). As distâncias *Fst* par a par estimadas variaram consideravelmente e foram todas significativas a um alfa = 0,05, sendo as populações com maior distância genética LRV3 e GUA (0.49), e a menor distância entre LRV1 e LRV2 (0,05) (Tabela 6).

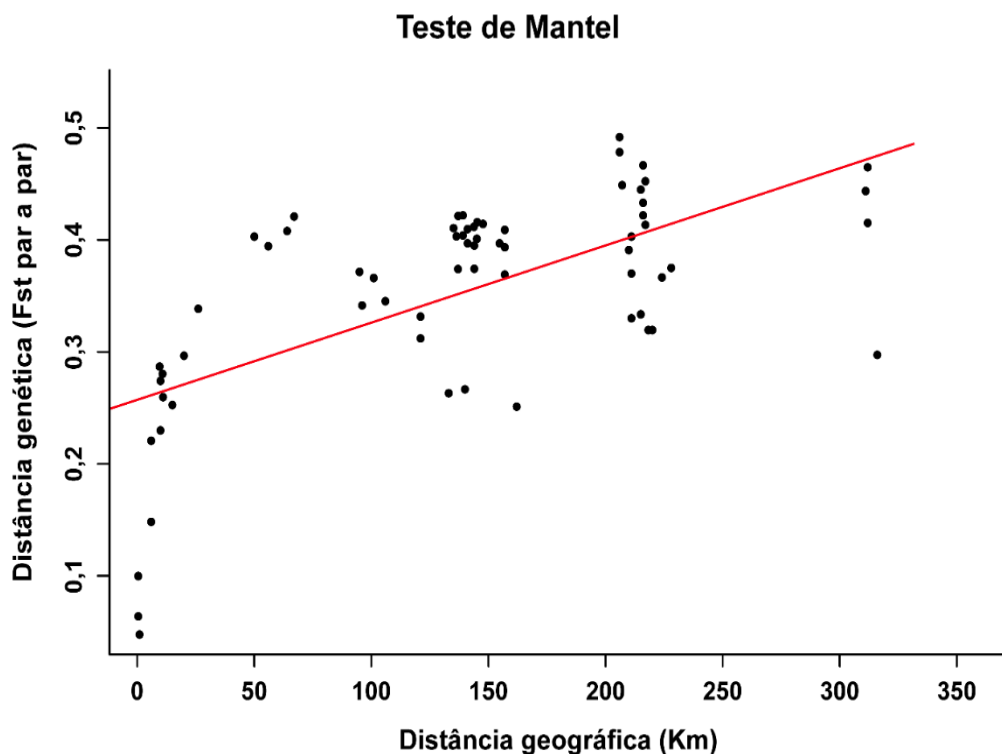


Figura 9 - Correlação entre a distância genética (*Fst*) e distância geográfica (Km) de 12 populações de *P. hatschbachii* ($r = 0,63$, $P = 0,0001$). Análise realizada pelo teste de Mantel por meio do método “*Pearson*” no R. Distâncias geográficas no eixo (x); Distâncias genética no eixo (y).

Tabela 6 - Valores de distância genética (*Fst*) par a par entre as 12 populações de *P. hatschbachii* acima da diagonal e valores de distância geográfica (km), abaixo da diagonal.

	LRV	LRV1	LRV2	LRV3	LUI1	LUI2	TUV	GUA	LSC	BR277	CAN	PFK
LRV	*****	0,259	0,229	0,277	0,262	0,266	0,251	0,329	0,319	0,319	0,333	0,297
LRV1	11	*****	0,047	0,063	0,403	0,394	0,395	0,478	0,391	0,444	0,433	0,443
LRV2	10	1	*****	0,099	0,373	0,374	0,369	0,448	0,369	0,421	0,413	0,415
LRV3	10,8	0,5	0,5	*****	0,421	0,413	0,408	0,491	0,402	0,466	0,452	0,464
LUI1	133	137	137	138	*****	0,220	0,331	0,412	0,411	0,409	0,421	0,374
LUI2	140	144	144	145	6	*****	0,311	0,401	0,396	0,404	0,408	0,366
TUV	162	156	157	157	121	121	*****	0,402	0,394	0,408	0,420	0,393
GUA	211	206	207	206	147	145	50	*****	0,274	0,296	0,338	0,345
LSC	220	210	211	211	144	141	56	10	*****	0,284	0,252	0,365
BR277	219	215	216	216	142	139	64	20	10	*****	0,148	0,341
CAN	215	216	217	217	139	136	67	26	15	6	*****	0,371
PFK	316	311	312	312	228	224	157	106	101	96	95	*****

Esta correlação positiva, porém, sem uma perfeita linearidade, sugere uma distribuição espacial da espécie de acordo com o modelo *Stepping-Stone* (Kimura & Weiss, 1964), onde as trocas alélicas ocorrem somente entre populações vizinhas. Isto acaba estabelecendo um padrão de isolamento por distância (IBD), o qual é considerado comum para espécies com capacidade de dispersão limitada (Slatkin, 1993).

Fato que também foi corroborado pela análise *admixture* do BAPs e pela *Neighbor-Net*, os quais sugerem maiores níveis de fluxo gênico entre populações próximas. Ao mesmo tempo, o autocorrelograma espacial empregado para discriminar as fontes de variação na estrutura espacial, mostrou correlação significativa para duas classes de distância, 1 (0,5 - 45,6 Km) e 5 (180,8 - 225,9 Km) (Fig. 10).

Correlograma de Mantel

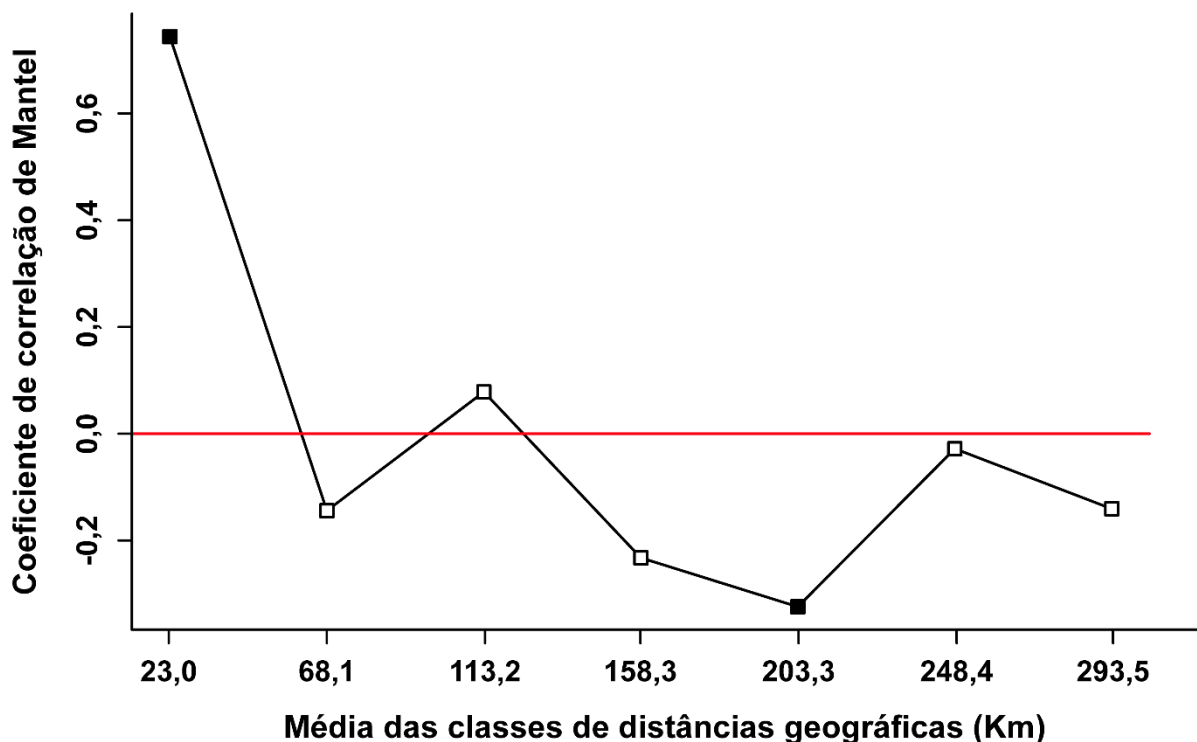


Figura 10 - Autocorrelograma espacial para 12 populações de *P. hatschbachii* a partir de sete classes de distâncias geográficas (classe 1= 0 - 45,6 Km; classe 2= 45,7 - 90,6 Km; classe 3= 90,6 - 135,7 Km; classe 4= 135,7 - 180,8 Km; classe 5= 180,8 - 225,8 Km; classe 6= 225,8 - 270,9 Km; classe 7= 270,9 - 306,0 Km) a partir do teste de Mantel. Média das classes no eixo x, correlação de Mantel no eixo y. Pontos fechados (pretos) são significativos a um alfa de 0,05. Pontos abertos (brancos) não são significativos a um alfa de 0,05.

Isso mostra que as populações de *P. hatschbachii* são muito similares geneticamente quando apresentam entre si distância geográfica de 0,5 a 45,6 Km, sendo que essa semelhança tende a diminuir ao passo que a distância geográfica aumenta. Então, quando atingem mais de 180 km de distância, as populações podem ser consideradas independentes geneticamente. De

acordo com o proposto por Diniz-Filho & Telles (2002; 2006) a análise de autocorrelação espacial, pode ser útil para definir unidades operacionais intraespecíficas para conservação da variabilidade genética. Isso significa que, em possíveis planos de conservação para a espécie, seria necessário amostrar ou conservar prioritariamente as populações com mais de 180 Km de distância, de maneira a diminuir os esforços necessários para se recrutar a maior parte da variação genética existente na espécie, evitando assim, uma redundância na amostragem do *pool* gênico de *P. hatschbachii* (Diniz-Filho; Telles, 2002; Diniz-Filho; Telles, 2006).

Além de ser restrita a afloramentos rochosos, *P. hatschbachii* parece ter uma dispersão de sementes e pólen limitada. No presente estudo, aspectos como o endemismo e o isolamento populacional estão entre os principais determinantes dos atuais níveis de diversidade genética da espécie. De modo geral, as áreas amostradas aparecem comumente isoladas por plantações, fragmentos florestais e silviculturas, formando um mosaico com essas paisagens ao longo da área de distribuição. Situações de isolamento populacional podem influenciar a diversidade genética de espécies raras ou endêmicas, com pequeno tamanho populacional efetivo, este cenário, pode favorecer um aumento nas taxas de cruzamento biparental e autofecundação, uma vez que limita o potencial de polinização pelos polinizadores (Serrote; Reiniger & Stefenon, 2016; Ellstrand & Elam, 1993; Gibson; Rice & Stucke, 2008; Jeong *et al.*, 2010). Um exemplo de como a paisagem no entorno das populações pode influenciar significativamente no fluxo gênico, e conseqüentemente nos padrões de diversidade e estrutura genética das populações, foi abordado por Barros *et al.* (2005), onde os autores observaram que as florestas de Araucária são como barreiras à travessia de abelhas responsáveis pela polinização de petúnias e outras espécies de plantas da área.

Considerado como o fator evolutivo que diminui a estruturação populacional, o fluxo gênico é um dos principais parâmetros populacionais estimados nos trabalhos que objetivam a conservação da variabilidade genética, pois permite a homogeneização das frequências alélicas, reduzindo os efeitos da deriva genética (Zucchi, 2002; Silva *et al.*, 2014). Entretanto, o distanciamento geográfico entre fragmentos, como o observado para *P. hatschbachii*, acaba reduzindo o fluxo gênico, culminando com a perda da variabilidade genética nas populações isoladas. Ao mesmo tempo, o isolamento pode acabar criando condições para a atuação da seleção natural direcional, favorecendo a adaptação a ambientes locais (Gibson; Rice & Stucke, 2008).

Por meio da estimativa de *Fst* loco-a-loco, o programa Bayescan identificou 300 locos (18 % do total) em *P. hatschbachii* sob possível processo de seleção (Fig. 11). Quando desvios da neutralidade nos valores de *Fst* em um loco específico, faz necessário um componente

adicional (alfa diferente de 0) para explicar a variação encontrada, é provável que o loco apresente pressão seletiva atuando como força purificadora (alfa negativo) ou força diversificadora (alfa positivo). Todos os 300 locos identificados, apresentaram valores de alfa positivo e significativo (HPI – *highest probability interval*, de 99 %), indicando que as populações de *P. hatschbachii* possivelmente estão passando por processo de seleção diversificadora. Embora os marcadores genéticos comumente sejam considerados neutros, é de conhecimento que os AFLPs fazem uma ampla leitura dos genomas, incluindo regiões codificantes e não codificantes (Portis *et al.*, 2004; Shan *et al.*, 2004; Freeland, 2005). Assim, o isolamento geográfico no qual as populações da espécie se encontra, pode estar favorecendo a fixação de locos com importância adaptativa local e propiciando um processo de seleção natural disruptiva ou diversificadora (Hartl & Clark, 1997), a qual provavelmente constitui importante força motriz para a alta diferenciação genética encontrada entre as populações de *P. hatschbachii*.

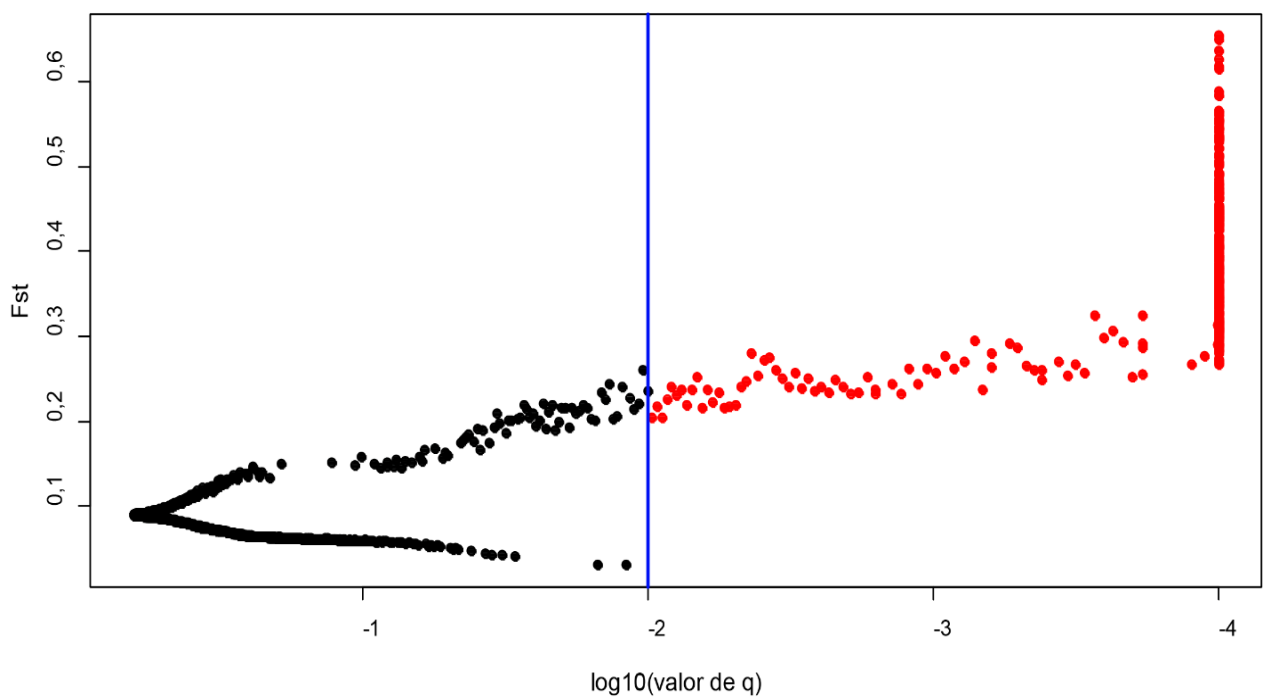


Figura 11 - Análise de identificação de loci outliers realizada pelo *software* Bayescan. Escaneamento de 1660 fragmentos de AFLP a partir de 12 populações de *P. hatschbachii*. Pontos à direita da linha azul estão sob possível processo de seleção diversificadora com um intervalo de confiança de 99 % (FDR = 0,01).

As 89 sequências geradas para as regiões ITS1-5.8S-ITS2 e 89 para *rps16* (Tabela 3), foram analisadas, mas não apresentaram polimorfismos suficientes para realizar estimativas de diversidade e estruturação genética populacional. Entretanto, foram importantes em mostrar alguma diferenciação entre as populações.

As sequências de ITS geraram três haplótipos, os quais formaram uma única rede haplotípica, com 95 % de confiabilidade na conectividade entre os haplótipos. O haplótipo considerado mais ancestral (itsh_1 – pp 0,84) pelo método de parcimônia estatística, esteve presente em 47 indivíduos (66,20 %) e em oito das 12 populações amostradas, ausente apenas em LRV1, LRV2, LRV3 e TUV. A partir do haplótipo mais ancestral derivaram os haplótipos itsh_2, com apenas um passo mutacional e o haplótipo itsh_3 com dois passos mutacionais. Todos os indivíduos de TUV apresentaram haplótipo distinto (itsh_3), enquanto os indivíduos de LRV1, LRV2 e LRV3 compartilharam o mesmo haplótipo (itsh_2) (Fig.12). Apenas três dos quatro haplótipos amostrados formaram uma única rede com 95 % de confiabilidade na conectividade para os dados de *rps16*. O haplótipo cuja conexão não foi mantida esteve presente em uma amostra de LSC e em todas as amostras de TUV. Já entre os três haplótipos que formaram uma única rede com confiabilidade de 95 % na conectividade entre as formas haplotípica, o mais ancestral (rpsh_1 – pp 0,95) esteve presente em 58 indivíduos (81,70 %) e 10 populações, estando ausente em LUI2 e TUV. O haplótipo rpsh_2, o qual derivou a partir do haplótipo mais ancestral com apenas um passo mutacional, foi observado em três dos seis indivíduos da população LUI2, enquanto o haplótipo rpsh_3 derivou com seis passos mutacionais, e foi observado nos outros três indivíduos dessa mesma população (Fig. 11 b).

A rede haplótipos de *P. grandiflora*, formada a partir das sequências de ITS, constituiu-se de um haplótipo formado pela população CM (itss_2) e outro pelas populações CONG e CRN (itss_1), formando uma rede única com 95 % de confiabilidade na conectividade, sendo o haplótipo presente em CONG e CRN o que teve a maior probabilidade de constituir o haplótipo ancestral dentre os amostrados (pp 0,67). Apenas um passo mutacional entre o haplótipo mais ancestral e o segundo haplótipo (Fig. 11 c). Não foi possível construir uma rede de haplótipos, para *rps16* em *P. grandiflora*, visto que foi encontrado um único haplótipo nas três populações amostradas.

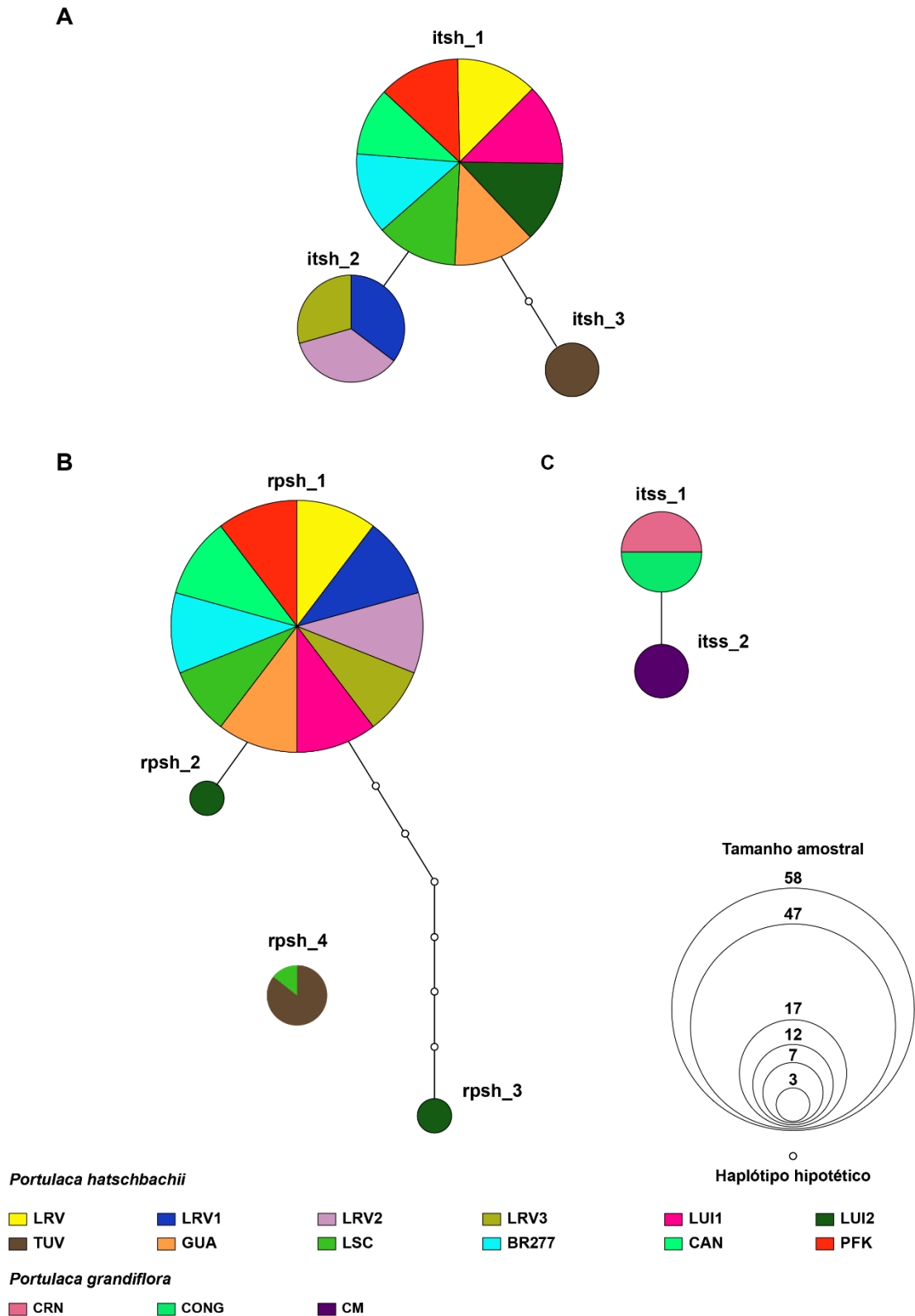


Figura 12 - Rede de haplótipos de *P. hatschbachii* baseada em sequências de ITS (a) e *rps16* (b) e Rede de haplótipos de *P. grandiflora* de ITS (c). Todas as redes foram construídas pelo método de parcimônia estatística no software TCS 1.21.

Ainda que os haplótipos observados não tenham mostrado um padrão claro de distribuição geográfica, eles foram úteis em evidenciar uma maior diferenciação para a população de TUV. Também o percentual de fragmentos privados (6,85 %) e o índice de raridade, DW, (427,35) foram altos para essa população, corroborando a alta diferenciação observada nos haplótipos. O índice DW constitui uma ferramenta útil para se verificar a divergência populacional (Schönswetter & Tribsch, 2005), uma vez que, estima a frequência de um dado fragmento AFLP na população e divide pela frequência global do marcador em todo o conjunto de dados, sendo, portanto, os valores de DW, mais altos para fragmentos raros e substancialmente menores para bandas que são comuns no conjunto geral de dados. Sendo assim, altos valores de DW são esperados em populações isoladas a longo prazo, enquanto que populações recém-divergentes devem apresentar baixos valores de DW devido ao efeito fundador (Schönswetter & Tribsch, 2005; Skrede; Borgen & Brochmann, 2009).

Também o número de fragmentos privados (Fpriv), pode ser utilizado para estimar a divergência entre populações, uma vez que, populações mais antigas tendem a apresentar número mais elevados desses fragmentos por estarem a mais tempo acumulando mutações (Ortiz *et al.*, 2008; Tremetsberger *et al.*, 2009). Então, considerando o índice de raridade (DW) e percentual de fragmentos privados, podemos considerar a população de LRV como a possivelmente mais ancestral (663,92 e 6,25 % para DW e Fpriv, respectivamente), seguida da população TUV (427,35 e 6,85 % para DW e Fpriv, respectivamente) a qual apresentou altos valores para os mesmos índices. De maneira geral, essas duas populações, juntamente com as demais populações mais ao norte, apresentam maiores índices de diversidade genética e DW, bem como maiores percentuais de fragmentos privados (Tabela 3).

Os níveis de diversidade genética um pouco mais elevados para as populações situadas mais ao norte, em relação às populações mais ao sul das áreas de distribuição, podem sugerir um padrão de colonização da espécie. Essa tendência à diminuição da diversidade genética no sentido norte-sul, conforme o modelo de distribuição espacial *stepping-stone* (Kimura & Weiss, 1964) para as populações de *P. Hatschbachii*, onde apenas populações vizinhas compartilham alelos, o que acaba por isolar as mesmas devido à distância, aumentando a estruturação entre elas e diminuindo a diversidade genética ao passo que novos eventos de colonização ocorrem. Logo, considerando a distribuição geográfica das populações, com aparentes intervalos sem ocorrência da espécie, e o padrão de distribuição da diversidade genética observado no presente estudo, é possível que as populações de *P. hatschbachii* tenham se originado a partir de LRV por meio de eventos de dispersão de um ou poucos indivíduos que deram origem às novas populações por efeito fundador.

Os padrões de variação do AFLP dentro das populações, corroboram com o padrão de isolamento por distância, pois os indivíduos das populações foram agrupados de acordo com a sua proximidade de origem geográfica no BAPS e na *Neighbor-Net*. Desta maneira, um padrão de fluxo gênico restrito, devido à distância geográfica entre as populações, agregado ao baixo sucesso de dispersão da espécie, sugerem que essas populações se isoladas a longo prazo, propicia possível evolução de linhagens genéticas distintas devido o acúmulo substancial de diferenças no genoma (Avice, 1987).

Conclusões

Contudo, os campos associados a Mata Atlântica, especialmente os sobre os afloramentos rochosos, vem sendo cruelmente negligenciados ao longo dos anos e a burocracia que envolve o desenvolvimento e aplicação de planos de manejo e conservação, podem levar muito tempo e o risco de extinção de inúmeras espécies ali é eminente. Logo, medidas de conservação visando a manutenção do máximo de diversidade genética de *P. hatschbachii* devem considerar a conservação de populações e seus entornos em diferentes locais da área de ocorrência da espécie, priorizando principalmente aquelas populações com ao menos 180 Km de distância. Os resultados do presente estudo forneceram informações importantes sobre a diversidade e estrutura genética de populações de *P. hatschbachii* e podem contribuir para guiar ações voltadas à preservação da espécie, como manejo e medidas de proteção que contrabalancem os efeitos das alterações ambientais.

Os dados obtidos com marcadores AFLP se mostraram eficientes para estimar os parâmetros de diversidade e estrutura genética de populações de *P. hatschbachii*. A diversidade genética da espécie se apresentou heterogeneamente distribuída ao longo da área de estudo, com baixos níveis de variação intra populacional, fluxo gênico limitado e níveis elevados de estruturação genética. Estes resultados parecem ter relação com a biologia reprodutiva de *P. hatschbachii* e com o fato desta espécie ser endêmica e restrita a afloramentos rochosos o que pôde ser observado nos menores índices de diversidade quando comparados com *P. grandiflora*, a qual apresenta ampla distribuição. Também a presença de seleção diversificadora atuando em locos específicos das populações parece ser uma importante força a moldar os padrões de distribuição da variação genética na espécie, uma vez que tende a aumentar a diferenciação entre as populações.

De acordo com o Teste de Mantel, e as análises de agrupamento *Bayesiano* e *Neighbor-Net*, as populações de *P. hatschbachii* se encontram isoladas pela distância. Além disso, as áreas de ocorrência da espécie formam mosaicos com plantações e florestas o que provavelmente contribuiu para esse isolamento, por restringir o acesso dos polinizadores às populações e, por consequência, o fluxo gênico. O padrão espacial de distribuição da variabilidade genética observada para a espécie sugere que *P. hatschbachii* colonizou novas áreas no sentido norte-sul ao longo de sua história evolutiva, pois menores níveis de diversidade genética e de fragmentos raros são esperados para as novas áreas de ocorrência como consequência do efeito fundador. Para conclusões mais robustas sobre estes padrões, outros marcadores genéticos também devem ser analisados. Os marcadores de cpDNA e nrDNA não foram tão informativos para tal estudo, sendo necessárias regiões mais polimórficas.

REFERÊNCIAS

- Alam, MA, Juraimi, AS, Rafii, MY, Hamid, AA, Uddin, MK, Alam, MZ, Latif, MA. 2014.** Genetic Improvement of Purslane (*Portulaca Oleracea* L.) And Its Future Prospects. *Molecular Biology Reports* **11**: 7395-7411.
- Allard, RW. 1971.** Princípios Do Melhoramento Genético Das Plantas. São Paulo: Edgard Blücher, 381.
- Applequist, WL, Wagner, WL, Zimmer, EA. 2006.** Nepokroeff, M. Molecular Evidence Resolving the Systematic Position of *Hectorella* (Portulacaceae). *Systematic Botany* **31**: 310–319.
- Applequist, WL, Wallace, RS. 2001.** Phylogeny of The Portulacaceous Cohort Based on Ndhf Sequence Data. *Systematic Botany* **2**: 406-419.
- Avise, JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders, NC. 1987.** Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **18**: 489-522.
- Avise, JC. 1994.** Molecular Markers, Natural History and Evolution. London: Chapman & Hall, 511.
- Avise, JC. 2000.** Phylogeography: The History and Formation of Species. London: Harvard University Press, 464p.
- Barros, MJ, Silva-Arias, GA, Fregonezi, JN, Turchetto-Zolet, AC, Iganci, JR, Diniz-Filho, JAF, Freitas, LB. 2015.** Environmental Drivers of Diversity in Subtropical Highland Grasslands. Perspectives in *Plant Ecology, Evolution and Systematics* **5**: 360-368.
- Barnaud E, Houliston, 2010; Barnaud, A.; Houliston, G. J. 2010.** Population Genetics of The Threatened Tree Daisy *Olearia Gardneri* (Asteraceae), Conservation of A Critically Endangered Species. *Conservation Genetics* **11**: 1515-1522.
- Benavides P, Vega FE, Romero-Severson, J, Bustillo AE, Stuart JJ. 2005.** Biodiversity and Biogeography of Na Important Inbred Pest of Coffee, Coffee Berry Borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Annals of The Entomological Society of America* **98**: 359-366.
- Bryant, D, Moulton, V. 2004.** Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks. *Molecular Biology and Evolution* **21**: 255–265.
- Cavalli, SS, Winge, H. 2003.** Variabilidade Genética Em Populações Naturais. In: Freitas L. B.; Bered F. Genética E Evolução Vegetal. Porto Alegre: Ed. Ufrgs, 165-175.
- Cires, E, Cuesta, C, Prieto, JAF. 2013.** Genetic Diversity And Structure In Fragmented Populations Of The Endangered Species *Ranunculus Cabrerensis* (Ranunculaceae): Implications For Conservation. *Biologia* **68**: 30-40.
- Clement, M, Posada, DCKA, Crandall, KA. 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**: 1657-1659.

- Coelho, AAOP, Giuletta, AM. 2010.** O Gênero *Portulaca* L. (Portulacaceae) No Brasil. *Acta Botânica Brasileira* **24**: 655 – 670.
- Corander, J, Marttinen, P, Sirén, J, Tang, J. 2008.** Enhanced Bayesian Modelling in Baps *Software* for Learning Genetic Structures of Populations. *Bmc Bioinformatics* **9**: 539.
- Corander, J, Marttinen, P. 2006.** Bayesian Identification of Admixture Events Using Multilocus Molecular Markers. *Molecular Ecology* **15**: 2833–2843.
- Diniz-Filho, JAF, De Campos Telles, MP. 2002.** Spatial Autocorrelation Analysis and The Identification of Operational Units for Conservation in Continuous Populations. *Conservation Biology* **16**: 924-935.
- Diniz Filho, JAF, De Campos Telles, MP. 2006.** Optimization Procedures For Establishing Reserve Networks For Biodiversity Conservation Taking Into Account Population Genetic Structure. *Genetics And Molecular Biology* **29**: 207-214,
- Dnpm – Departamento Nacional De Produção Mineral. Sumário Mineral 2008.**
Disponível Em:
<[Http://Www.Dnpm.Gov.Br/Assets/Galeriadocumento/Sumariomineral2008/Aggregados.Pdf](http://www.dnpm.gov.br/assets/galeriadocumento/sumariomineral2008/agregados.pdf)>
. Acesso Em: 19 jan. 2018
- Doyle, JJ, Doyle, JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15.
- Edgar, R. C. 2004.** MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792–1797.
- Eggl, U, Ford-Werntz, D. Portulacaceae. 2002.** Illustrated Handbook of Succulent Plants: Dicotyledons 370-433.
- Ehrich, DA. 2006.** Collection of R Functions for Convenient Handling of Aflp Data. *Molecular Ecology. Notes* **6**: 603–604.
- Ellstrand, NC, Elam, DR. 1993.** Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant Conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**: 217-242.
- Ewing, B, Hillier, L, Wendl, MC, Green, P. 1998.** Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome research* **8**: 175-185.
- Excoffier, L, Laval, G, Schneider, S. 2005.** Arlequin (Version 3.0): An Integrated *Software* Package for Population Genetics Data Analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47–50.
- Falk, DA, Holsinger, KE. 1991.** Genetics and Conservation of Rare Plants. *New York: Oxford University Press.*
- Flora Do Brasil 2020 Em Construção. Portulacaceae. 2017.** Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB20618>>. Acesso em: 19 jan. 2018.
- Foll, M, Gaggiotti, OA. 2008.** An Approximate Bayesian Computation Approach to Overcome Biases That Arise When Using Amplified Fragment Length Polymorphism Markers to Study Population Structure. *Genetics* **179**: 927-239.

- Freeland, JR. 2005.** *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd, England. 388p.
- Gibson, J, Rice, SA, Stucke, CM. 2008.** Comparison of Population Genetic Diversity Between A Rare, Narrowly Distributed Species and A Common, Widespread Species of *Alnus* (Betulaceae). *American Journal Of Botany* **95**: 588-596.
- Giovanoni, SS. 2014.** Caracterização Genética De Populações De *Rhipsalis Dissimilis* K. Schum. (Cactaceae) No Estado Do Paraná, Curitiba-Pr. 2014. 43p. Dissertação De Mestrado – Universidade Federal Do Paraná, Curitiba.
- Gong, W, Gu, L, Zhang, D. 2010.** Low Genetic Diversity and High Genetic Divergence Caused by Inbreeding and Geographical Isolation in The Populations of Endangered Species *Loropetalum Subcordatum* (Hamamelidaceae) Endemic to China. *Conservation Genetics* **11**: 2281-2288.
- Green, P.** Documentation for phrap and cross_match. Disponível em: <<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>>, 1999.
- Guimarães, EF, Santos-Filho, LAF, Barros, ASM, Maurenza, D. Portulacaceae. In: Martinelli, M, Moraes, MA. 2013.** Livro Vermelho Da Flora Do Brasil. Rio De Janeiro: Andrea Jakobsson, Instituto De Pesquisas Jardim Botânico Do Rio De Janeiro. p1100.
- Hamrick, JL. 1982.** Distribution Of Genetic Whitin And Among Natural Forest Population. Shonewald-Cox.
- Hartl, DL, Clark, AG. 2010.** Princípios De Genética De Populações. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed. p660.
- Hershkovitz, M, Zimmer, E. 1997.** On the Evolutionary Origins of The Cacti. *Taxon* **46**: 217-232,
- Hirota, MM. 2011.** Atlas Dos Remanescentes Florestais Da Mata Atlântica: Período 2008-2010. São Paulo: Sos Mata Atlântica/Inpe.
- Huson, DH, Bryant, D. 2006.** Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* **23**: 254–267.
- Jaramillo, P, Atkinson, R, Gentile, G. 2011.** Evaluating Genetic Diversity for The Conservation of The Threatened Galapagos Endemic *Calandrinia Galapagosa* (Portulacaceae). *Biotropica* **43**: 386-392.
- Jeong, JH, Kim, EH, Guo, W, Yoo, KO, Jo, DG, Kim, ZS. 2010.** Genetic Diversity and Structure of The Endangered Species *Megaleranthis Saniculifolia* In Korea As Revealed by Allozyme And Issr Markers. *Plant Systematics and Evolution* **289**: 67–76.
- Jia, S, Yan, Z, Wang, Y. 2017.** Genetic Diversity and Relatedness Among Ornamental Purslane (*Portulaca L.*) Accessions Unraveled by Srap Markers Sizhen. *Biotech* **7**: 241.
- Kimura, M & Weiss, GH. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* **49**: 561, 1964.

Maack, R. 2012. Geografia Física Do Estado Do Paraná. Ponta Grossa: Universidade Estadual De Ponta Grossa. Editora: Uepg 4ed. p526.

Machado, F. B. Geologia e possíveis zonas de efusão do magmatismo ácido cretácico da Bacia do Paraná. Monografia (TCC), Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

Maddison, DR, Maddison, WP. 2014^a. *Chromaseq: a Mesquite package for analyzing sequence chromatograms. Version 1.12.* Disponível em: <<http://mesquiteproject.org/packages/chromaseq>>.

Maddison, DR, Maddison, WP. 2014b. *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.01.* Disponível em: <<http://mesquiteproject.org>>, 2014b.

Mills, LS, Allendorf, FW. 1996. The One-Migrant-Per-Generation Rule in Conservation and Management. *Conservation Biology* **10**: 1509-1518.

Nabinger, C, Moraes, AD, Maraschin, GE. 2000. Campos In Southern Brazil. In: Lemaire, G, Hodgson, J, Moraes, AD, Carvalho, PDF. Nabinger, C. Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology. Cabi Publishing, Wallingford 1996.

Nei, M. 1978. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from A Small Number Of Individuals. *Genetics* **89**: 583-590.

Nielsen R, Slatkin M. 2013. *Introduction to Population Genetics, Theory and Applications*, Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press.

Nyffeler, R. 2007. The Closest Relatives Of Cacti: Insights From Phylogenetic Analyses Of Chloroplast And Mitochondrial Sequences With Special Emphasis On Relationships In The Tribe Anacampseroteae. *American Journal of Botany* **94**: 89-101.

Nyffeler, R, Eggli, U. 2010. Disintegrating Portulacaceae: A New Familial Classification of The Suborder Portulacineae (Caryophyllales) Based on Molecular And Morphological Data. *Taxon* **59**: 227-240.

Ocampo, G, Columbus, JT. 2012. Molecular Phylogenetics, Historical Biogeography, And Chromosome Number Evolution of Portulaca (Portulacaceae). *Molecular Phylogenetics And Evolution* **63**: 97-112.

Oksanen, J, Blanchet, FG, Kindt, R, Legendre, P, Minchin, PR, O'hara, RB, Wagner, H. 2017. Community Ecology Package. R Package Version 2.3-4. 2012. Disponível Em: <[https://Cran.R-Project.Org/Web/Packages/Vegan/Index.Html](https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html)>. Acesso Em: 08 Set.

Ortiz MA, Tremetsberger K, Terrab A, Stuessy Tf, García-Castanõ JI, Urtubey E, Baeza Cm, Ruas Cf, Gibbs Pe, Talavera S. 2008. Phylogeography Of The Invasive Weed Hypochaeris Radicata (Asteraceae): From Moroccan Origin To Worldwide Introduced Populations. *Molecular Ecology* **17**: 3664–3667.

Ouborg, NJ, Vergeer, P, Mix, C. 2006. The Rough Edges Of The Conservation Genetics Paradigm For Plants. *Journal Of Ecology* **94**: 1233-1248,

- Piñeiro, R, Aguilar, JF, De Sequeira, MM, Feliner, GN. 2009.** Low Genetic Diversity In The Rare Madeiran Endemic *Armeria Maderensis* (Plumbaginaceae). *Folia Geobotanica* **44**: 65.
- Pometti, CL, Bessega, CF, Vilkardi, JC, Ewens, M, Saidman, BO. 2016.** Genetic Variation In Natural Populations Of *Acacia Visco* (Fabaceae) Belonging To Two Sub-Regions Of Argentina Using Aflp. *Plant Systematics And Evolution* **302**: 901-910.
- Portis, E, Comino, C, Lenzi, A, Lombardi, P, Tesi, R, Lanteri, S. 2004.** Amplified Fragment Length Polymorphism For Variety Identification And Genetic Diversity Assessment In Oleander (*Nerium Oleander* L.). *Euphytica* **136**: P.125-137.
- Prentis, PJ, Mather, PB. 2008.** Fine-Scale Patterns Of Genetic Variation Indicate Non-Equilibrium Gene Frequency Divergence In The Stream Lily, *Helmholtzia Glaberrima*. *Freshwater Biology* **53**: 973-980.
- Rstudio Team. Rstudio: Integrated Development For R. Rstudio, Inc. 2018.** Disponível Em: <[Http://Www.Rstudio.Com/](http://www.Rstudio.com/)>.
- Reed, DH, Frankham, R. 2003.** Correlation Between Fitness And Genetic Diversity. *Conservation Biology* **17**: P.230-237.
- Ribeiro, MC, Metzger, JP, Martensen, AC, Ponzoni, F, Hirota, MM. 2009.** The Brazilian Atlantic Forest: How Much Is Left, And How Is The Remaining Forest Distributed? Implications For Conservation. *Biological Conservation* **142**: 141-1153.
- Rodrigues, LA, Ruas, EA, Ruas, PM, Reck M, Fiorin, FG, Ortiz, MA, Urtubey, E, Matzenbacher, NI, Ruas, CF. 2016.** Population Genetic Structure Of The South American Species *Hypochoeris Lutea* (Asteraceae). *Plant Species Biology* **31**: 55-64.
- Ruas, EA, Ruas, CF, Medri, PS, Medri, C, Medri, ME, Bianchini, E, Pimenta, JA, Rodrigues, LA, Ruas, PM. 2011.** Anatomy And Genetic Diversity Of Two Populations Of *Schinus Terebinthifolius* (Anacardiaceae) From The Tibagi River Basin In Parana, Brazil. *Genetics And Molecular Research* **10**: 526-536.
- Santos, GM. 2018.** Biologia Floral E Reprodutiva De *Portulaca Hatschbachii* D. Legrand (Portulacaceae): Uma Espécie Endêmica Do Terceiro Planalto Paranaense. Tcc, Universidade Estadual De Londrina – Dados Não Publicados,
- Schlueter, PM, Harris, SA. 2006.** Analysis Of Multilocus Fingerprinting Data Sets Containing Missing Data. *Molecular Ecology Resources* **6**: 569-572.
- Schönswetter P, Tribsch A. 2005.** Vicariance And Dispersal In The Alpine Perennial *Bupleurum Stellatum* L. (Apiaceae). *Taxon* **54**: 725 –732.
- Sebbenn, AM, Ettori, L. C. 2001.** Conservação Genética *Ex Situ* De *Essenbeckis Leiocarpa*, *Myracrodruon Urundeuva* E *Peltophorum Dubium* Em Teste De Progênes Misto. *Revista Do Instituto Florestal* **13**: 201-211.
- Serrote, CML, Reiniger, LRS, Stefenon, VM. 2016.** Simulações Em Genética De População E Conservação De Recursos Florestais. Jundiaí: Paco Editorial, 116p.

- Shan, F, Clarke, H, Yan, G, Plummer, JA, Siddique, KH. 2004.** Development Of Dna Fingerprinting Keys For Discrimination Of *Cicer Echinosperrum* (Ph Davis) Accessions Using Aflp Markers. *Australian Journal Of Agricultural Research* **55**: 947-952.
- Sharma, IK, Clements, MA, Jones, DL. 2000.** Observations Of High Genetic Variability In The Endangered Australian Terrestrial Orchid *Pterostylis Gibbosa* R. Br.(Orchidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **28**: 651-663.
- Shaw, J, Lickey, EB, Schilling, EE, Small, RL. 2007.** Comparison of Whole Chloroplast Genome Sequences To Choose Noncoding Regions For Phylogenetic Studies In Angiosperms: The Tortoise And The Hare Iii. *American Journal of Botany* **94**: 275-288.
- Silva, SMM, Martins, K, Mesquita, AGG, Wadt, LHO. 2014.** Parâmetros Genéticos Para A Conservação De *Hymenaea Courbaril* L. Na Amazônia Sul-Occidental. *Ciência Florestal* **24**.
- Skrede I, Borgen L, Brochmann C. 2009.** Genetic Structuring In Three Closely Related Circumpolar Plant Species: Aflp Versus Microsatellite Markers And High-Arctic Versus Arctic-Alpine Distributions. *Heredity* **102**: 293 –302.
- Souza, LB, Ruas, EA, Rodrigues, LA, Ruas, CF, Ruas, PM. 2013.** AFLP marker analysis revealing genetic structure of the tree *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae) in the southern Brazilian Tropical Rainforest. *Genetics and Molecular Biology* **36**: 533-539.
- Spielman, D, Brook, BW, Frankham, R. 2004.** Most Species Are Not Driven to Extinction Before Genetic Factors Impact Them. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **101**: 15261-15264.
- Swofford, DL. 2003.** Paup*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*And Other Methods), Version 4.0 B10.
- Szpiech ZA. 2012.** Human Migration, Population Divergence, And the Accumulation Of Deleterious Alleles: Insights From Private Genetic Variation And Whole-Exome Sequencing. Phd Tesis, *University Of Michigan*, USA 136p.
- Thorne, RF, Reveal, JL. 2007.** An updated classification of the class Magnoliopsida (“Angiospermae”). *The Botanical Review* **73**: 67-181, 2007.
- Tinnert, J, Hellgren, O, Lindberg, J, Koch-Schmidt, P, Forsman, A. 2016.** Population Genetic Structure, Differentiation, And Diversity In *Tetrix Subulata* Pygmy Grasshoppers: Roles Of Population Size And Immigration. *Ecology And Evolution* **6**: 7831-7846.
- Tremetsberger, K, Stuessy, TF, Kadlec, G, Urtubey, E, Baeza, CM, Beck, SG, Valdebenito, HA, Ruas, CF, Matzenbacher, NI. 2006.** Aflp Phylogeny of South American Species Of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). *Systematic Botany* **31**: 610-626,
- Vekemans, X. 2017** Aflp-Surv Version 1.0. Laboratoire De Genetique Et Ecologie Vegetale. Universite Libre De Bruxelles, Belgium, 2002. Disponível Em: <[Http://Www.Ulb.Ac.Be/Sciences/Lagev/Aflp-Surv.Html](http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/aflp-surv.html)>. Acesso Em: 8 Set.
- Wang, J. 2004.** The One-Migrant-Per-Generation Rule in Conservation and Management. *Conservation Biology* **18**: 332-343.

Wright, S. 1978. Evolution and The Genetics of Populations, V.4. Variability Within and Among Populations. *Chicago: University of Chicago*, p580.

Zucchi, MI. 2002. Análise Da Estrutura Genética Da *Eugenia Dysenterica* Dc Utilizando Marcadores Rápido E Ssr. 130f. 2002. Tese De Doutorado. Escola Superior De Agricultura “Luiz De Queiroz” (Esalq).

Zuloaga, FO, Marrone, O, Belgrano, ML. 2008. Catálogo De Las Plantas Vasculares Del Cono Sur. St. Louis, Mo., U.S.A.; *Missouri Botanical Garden Press*. 2796-2816,

REFERÊNCIAS GERAIS

- AIZEN, M. A. Self-pollination shortens flower lifespan in *Portulaca umbraticola* H.B.K. (PORTULACACEAE). **International Journal of Plant Sciences**, v. 154, n. 3, p. 412-413, 1993.
- ALAM, M. A.; JURAIMI, A. S.; RAFII, M. Y.; HAMID, A. A.; UDDIN, M. K.; ALAM, M. Z.; LATIF, M. A. Genetic improvement of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) and its future prospects. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 11, p. 7395-7411, 2014.
- ALMEIDA, F. S.; PELEGRINELLI, M. H.; SODRÉ, L. M. K. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil. **Journal of Zoology**, v. 253, p. 113–120, 2001.
- APPLEQUIST, W. L.; WALLACE, R. S. Phylogeny of the portulacaceous cohort based on ndhF sequence data. **Systematic Botany**, v. 26, n. 2, p. 406-419, 2001.
- APPLEQUIST, W. L.; WAGNER, W. L.; ZIMMER, E. A.; NEPOKROEFF, M. Molecular evidence resolving the systematic position of Hectorella (Portulacaceae). **Systematic Botany**, v. 31, p. 310–319, 2006.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 18, p. 489-522. 1987.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. London: Chapman & Hall, 511p. 1994.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: The history and formation of species**. London: Harvard University Press, 464p. 2000.
- BARNAUD, A.; HOULISTON, G. J. Population genetics of the threatened tree daisy *Olearia gardneri* (Asteraceae), conservation of a critically endangered species. **Conservation Genetics**, v. 11, p. 1515-1522, 2010.
- BARROS, M. J.; SILVA-ARIAS, G. A.; FREGONEZI, J. N.; TURCHETTO-ZOLET, A. C.; IGANCI, J. R.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; FREITAS, L. B. Environmental drivers of diversity in Subtropical Highland Grasslands. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**. v. 17, n. 5, p. 360-368, 2015.
- BAWA, K. S.; KRUGMAN, S. L. **Reproductive biology and genetics of tropical trees in relation to conservation and manegement**. In: GOMES-POMPA, A.; WHITMORE, T. C.; HADLEY, M. Rain forest regeneration and manegement. Paris: UNESCO, p. 119-136. 1990.
- BENAVIDES, P.; VEGA, F. E.; ROMERO-SEVERSON, J.; BUSTILLO, A. E.; STUART, J. J. Biodiversity and biogeography of na important inbred pest of coffee, coffee Berry borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, n. 3, p. 359-366. 2005.

BENSCH, S.; AKESSON, M. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2899-2914, 2005.

BOLDRINI, I. I.; EGGERS, L. Vegetação campestre do sul do Brasil: dinâmica de espécies à exclusão do gado. **Acta Botânica Brasílica**, v. 10, n. 1, p.37-50, 1996.

BOUHARMONT, J. Note sur la cytologie de quelques espèces de Portulaca. **Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique/Bulletin van de Koninklijke Belgische Botanische Vereniging**, p. 175-188, 1965.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 10, de 1º de outubro de 1993. Dispõe sobre os parâmetros básicos para análise dos estágios de sucessão da Mata Atlântica. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 nov. 1993.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 392, de 25 de junho de 2007. Definição de vegetação primária e secundária de regeneração de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 jun. 2007.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 423, de 12 de abril de 2010. Dispõe sobre parâmetros básicos para identificação e análise da vegetação primária e dos estágios sucessionais da vegetação secundária nos Campos de Altitude associados ou abrangidos pela Mata Atlântica. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 abr. 2010.

BRASIL. Decreto Federal nº 6.660, de 21 de novembro de 2008. Regulamenta dispositivos da Lei 11.428, de 22 de dezembro de 2006, que dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 nov. 2008.

BRASIL. Lei Federal nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006. Dispõe sobre a utilização e a proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 dez. 2006. Retificado em 9 jan. 2007.

BRASIL. Lei Federal nº 12.651, de 25 de maio de 2012. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa; altera as Leis nos 6.938, de 31 de agosto de 1981, 9.393, de 19 de dezembro de 1996, e 11.428, de 22 de dezembro de 2006; revoga as Leis nos 4.771, de 15 de setembro de 1965, e 7.754, de 14 de abril de 1989, e a Medida Provisória no 2.166-67, de 24 de agosto de 2001; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 mai. 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos**. MMA/SBF, Brasília, p.28-40. 2000.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Mapas de cobertura vegetal dos biomas brasileiros: 2002 a 2008**. Disponível em: <<http://homologw.mma.gov.br/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=72&idMenu=3813>>. Acesso em: 5 mar. 2018.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Quarto Relatório Nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica: Brasil**. Brasília (DF): Ministério do Meio Ambiente/ Diretoria do Programa Nacional de Conservação da Biodiversidade - DCBio, 2010.

BROWN, A. H. D. Enzymes polymorphisms in plant populations. **Theoretical Population Biology**, San Diego, v. 15, n. 1, p. 1-42, 1979.

BRYANT, D.; MOULTON, V. Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, p. 255–265, 2004.

BUNDOCK, P. C.; ELIOTT, F. G.; ABLETT, G.; BENSON, A. D.; CASU, R. E.; AITKEN, K. S.; HENRY, R. J. Targeted single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in a highly polyploid plant species using 454 sequencing. **Plant Biotechnology Journal**, v. 7, p. 347–354, 2009.

CAROLIN, R. C. Portulacaceae. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V. **The families and genera of vascular plants. Flowering plants: Dicotyledons; Magnoliid, hamamelid and caryophyllid families**. Berlin: Springer, v. 2, p. 544-555, 1993.

CAVALLI S. S., WINGE H. Variabilidade genética em populações naturais. In: FREITAS L. B.; BERED F. **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, p. 165-175. 2003.

CARVALHO, S. V. A. **Parâmetros genéticos populacionais como indicadores de sustentabilidade em populações naturais de pimenta rosa – *Schinus terebinthifolius* RADDI. (Anacardiaceae), no Baixo São Francisco – SE/AL**. 2009. 47f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2009.

CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA. *Portulaca hatschbachii*. In: **Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2**. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Portulaca_hatschbachii>. Acesso em: 8 dez. 2016.

CERVI, A. C.; LINSINGEN, L.; HATSCHBACH, H.; RIBAS, O. S. A vegetação do Parque Estadual de Vila Velha, município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. **Boletim do Museu Botânico Municipal**. Curitiba, v. 69, p. 01-52, 2007.

CIRES, E.; CUESTA, C.; PRIETO, J. A. F. Genetic diversity and structure in fragmented populations of the endangered species *Ranunculus cabrerensis* (Ranunculaceae): implications for conservation. **Biologia**, v. 68, n. 1, p. 30-40, 2013.

CHAN, K.; ISLAM, M. W.; KAMIL, M.; RADHAKRISHNAN, R.; ZAKARIA, M. N. M.; HABIBULLAH, M.; ATTAS, A. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Portulaca oleracea* L. subsp. *sativa* (Haw.) Celak. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p. 445–451, 2000.

- CHEN, J.; SHI, Y.; LIU, J. Determination of noradrenaline and dopamine in Chinese herbal extracts from *Portulaca oleracea* L. by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 1003, p. 127–132, 2003.
- CLEMENT, M.; POSADA, D. C. K. A.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular ecology**, v. 9, n. 10, p. 1657-1659, 2000.
- COELHO, A. A. O. P.; GIULIETTI, A. M. Flora da Bahia: Portulacaceae. **Sitientibus: Série Ciências Biológicas**, v. 6, n. 3, p. 182-193, 2006.
- COELHO, A. A. O. P.; GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; YESILYURT, J. C. Synonymies and typifications in the *Portulaca* (Portulacaceae) of Brazil. **Kew Bulletin**, v. 65, p. 37-43, 2009.
- COELHO, A. A. O. P.; GIULIETTI, A. M. O gênero *Portulaca* L. (Portulacaceae) no Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 24, p. 655 – 670, 2010.
- CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R. Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: substratos, composições florísticas e aspectos estruturais. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 85-111, 2005.
- CONSON, A. R. O.; RUAS, E. A.; VIEIRA, B. G.; RODRIGUES, L. A.; COSTA, B. F.; BIANCHINI, E.; PRIOLI, A. J.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M. Genetic structure of the Atlantic Rainforest tree species *Luehea divaricata* (Malvaceae). **Genetica**, v. 141, p. 205-215, 2013.
- CORANDER, J.; MARTTINEN, P. Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 2833–2843, 2006.
- CORANDER, J.; MARTTINEN, P.; SIRÉN, J.; TANG, J. Enhanced Bayesian modelling in BAPS *software* for learning genetic structures of populations. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 539, 2008.
- COWLING, R. M.; PRESSEY, R. L. Rapid plant diversification: planning for an evolutionary future. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 98, n. 10, p. 5452-5457, 2001.
- DE WET, J. M. J. Origins of polyploids. In: LEWIS, W. H. **Polyploidy: biological relevance**. New York: Plenum. p. 3-15, 1980.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- DULMOLIN-LAPÈGUE, S.; DEMESURE, B.; FINESCHI, S.; CORRE, V. L.; PETIT, R. J. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. **Genetics**, v. 146, n. 4, p. 1475-1487, 1997.
- DINIZ-FILHO, J. A. F.; DE CAMPOS TELLES, M. P. Spatial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations. **Conservation biology**, v. 16, n. 4, p. 924-935, 2002.

DINIZ FILHO, J. A. F.; DE CAMPOS TELLES, M. P. Optimization procedures for establishing reserve networks for biodiversity conservation taking into account population genetic structure. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 207-214, 2006.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792–1797, 2004.

EGGLI, U.; FORD-WERNTZ, D. *Portulacaceae*. **Illustrated handbook of succulent plants: dicotyledons**, p. 370-433, 2002.

EHRICH, D. A collection of R functions for convenient handling of AFLP data. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 603–604, 2006.

EL JACK, A. E. *Portulaca oleracea* L. In: GRUBBEN, G. J. H.; DENTON, O. A. **Plant Resources of Tropical Africa 2: Vegetables/Légumes**. Backhuys Publishers, Wageningen, p. 426–428, 2004.

ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual review of Ecology and Systematics**, v. 24, n. 1, p. 217-242, 1993.

EPPERSON, B. K. Spatial genetic structure and non-equilibrium demographics within plant population. **Plant Species Biology**, v. 15, p. 269-279, 2000.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated *software* package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47–50, 2005.

FALK, D. A.; HOLSINGER, K. E. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. **New York: Oxford University Press**, 1991.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p.1998.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. **Portulacaceae**. 2017. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB20618>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

FOLL, M.; GAGGIOTTI, O. A. An Approximate Bayesian Computation Approach to Overcome Biases That Arise When Using Amplified Fragment Length Polymorphism Markers to Study Population Structure. **Genetics**, v. 179, p. 927-239, 2008.

FORMAN, T. T.; GODRON, M. Patches and Structural Components for a Landscape Ecology. **Bioscience**, v. 31, n. 10, p. 733-740, 1981.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F.; BICUDO, C. E.M.; CARVALHO JUNIOR A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M. J. G.; LEITMAN, P.; LOHMANN, L. G.;

- MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J.; SYLVESTRE, L.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. **Catálogo das plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio & Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, 2010.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Fundamentos de genética da conservação. **Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética**, 2008.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge University Press, Cambridge. 2ed. 619p. 2010.
- FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D.; BURDON, J. J. **The conservation of plant biodiversity**. Cambridge: Cambridge University. p. 299, 1996.
- FRANCESCHINELLI, E. V.; BAWA, K. S. The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). **Heredity**, London, v. 84, n. 1, p. 116-123, Jan. 2000.
- FREELAND, J. R. **Molecular ecology**. John Wiley & Sons Ltd, England. 388p. 2005.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 631, 1992.
- FUTUYMA, D.J. **Evolution**. Sinauer Associates, Sunderland. P. 603, 2005.
- GAIOTTO, F. A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, n. 5-6, p. 842-849, 1997.
- GEESINK, R. An account of the genus *Portulaca* in Indo-Australia. **Blumea**, v. 17, n. 2, p. 275-307, 1969.
- GHAZANFAR, S. A. Handbook of Arabian Medicinal Plants. **CRC Press**. p. 176–178, 1994.
- GIBSON, J.; RICE, S. A.; STUCKE, C. M. Comparison of population genetic diversity between a rare, narrowly distributed species and a common, widespread species of *Alnus* (Betulaceae). **American Journal of Botany**, v. 95, n. 5, p. 588-596, 2008.
- GIOVANONI, S. S. **Caracterização Genética de Populações de *Rhipsalis dissimilis* k. Schum. (cactaceae) no Estado do Paraná, Curitiba-PR**. 2014. 43p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- GODOY, S. M. D.; SILVA, J. F. M. D.; PAULA, G. B. N. D.; RUAS, P. M.; GÓES, B. D.; RUAS, C. D. F. Phylogenetic relationships of Brazilian *Mikania* species (Asteraceae, Eupatorieae) based on multilocus DNA markers. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 184, n. 3, p. 326-346, 2017.

GOMES, M. A. M. **Caracterização da vegetação de Campos de Altitude em unidades de paisagem na região do Campo dos Padres, Bom Retiro/Urubici, SC.** 2009. 115p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

GONG, W.; GU, L.; ZHANG, D. Low genetic diversity and high genetic divergence caused by inbreeding and geographical isolation in the populations of endangered species *Loropetalum subcordatum* (Hamamelidaceae) endemic to China. **Conservation genetics**, v. 11, n. 6, p. 2281-2288, 2010.

GOOGLE INC. **Google Earth Pro v. 7.3.1.4507**, 2018. Disponível em: <<https://www.google.com/earth/>>.

GREEN, P. Documentation for phrap and cross_match. Disponível em: <<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>>, 1999.

GUIMARÃES, E. F.; SANTOS-FILHO, L. A. F.; BARROS, A. S. M.; MAURENZA, D. Portulacaceae. In: MARTINELLI, M.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil.** Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 1100p. 2013.

HAMRICK, J. L. Distribution of genetic whitin and among natural forest population. **Shonewald-cox**, 1982.

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

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Princípios de genética de populações.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2010. 660p.

HERSHKOVITZ, M.; ZIMMER, E. On the Evolutionary Origins of the Cacti. **Taxon**, v. 46, n. 2, p. 217-232, 1997.

HERSHKOVITZ, M. A.; ZIMMER, E. A. Ribosomal DNA evidence and disjunctions of Western American Portulacaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 15, p. 419–439, 2000.

HIROTA, M. M. Monitoramento da cobertura da Mata Atlântica brasileira. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas.** Belo Horizonte: Fundação SOS Mata Atlântica/ Conservação Internacional, p. 60-65. 2005.

HIROTA, M. M. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2008-2010.** São Paulo: SOS Mata Atlântica/INPE, 2011.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, p. 254–267, 2006.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa de Biomas do Brasil: Primeira aproximação**. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Cartas_e_Mapas/Mapas_Murais/biomas_pdf.zip>. Acesso em: 15 dez. 2017.

ICHIMURA, K.; SUTO, K. Environmental factors controlling flower opening and closing in a *Portulaca* hybrid. **Annals of Botany**, v. 82, p. 67–70, 1998.

IGANCI, J. R. V.; HEIDEN, G.; MIOTTO, S. V.; PENNINGTON, R. T. Campos de Cima da Serra: the Brazilian Subtropical Highland Grasslands show an unexpected level of plant endemism. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, p. 378–393, 2011.

IUCN – (International Union for Conservation of Nature). THE WORLD CONSERVATION UNION. **IUCN Red List Categories**. Gland, 1994.

IUCN – (International Union for Conservation of Nature). THE WORLD CONSERVATION UNION. **IUCN Red List of Threatened Animals**. Gland, 1996.

JARAMILLO, P.; ATKINSON, R.; GENTILE, G. Evaluating genetic diversity for the conservation of the threatened Galapagos endemic *Calandrinia galapagosa* (Portulacaceae). **Biotropica**, v. 43, n. 3, p. 386-392, 2011.

JEONG, J. H.; KIM, E. H.; GUO, W.; YOO, K. O.; JO, D. G.; KIM, Z. S. Genetic diversity and structure of the endangered species *Megaleranthis saniculifolia* in Korea as revealed by allozyme and ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 289, p. 67–76, 2010.

JIA, S., YAN, Z., WANG, Y. et al. Genetic diversity and relatedness among ornamental purslane (*Portulaca* L.) accessions unraveled by SRAP markers Sizhen. **3 Biotech**, v. 7, n. 4, p. 241, 2017.

JONES, A. G.; ARDREN, W. R. Methods of parentage analysis in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 10, p. 2511-2523, Oct. 2003.

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F. B. Recuperação de áreas ciliares. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO-FILHO, H. F. Matas ciliares: conservação e recuperação. São Paulo: p. 249-269, 2000.

KARIMI, G.; HOSSEINZADEH, H.; ETTEHAD, N. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Portulaca oleracea* L. extracts in mice. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 6, p. 484-487, 2004.

KEVIN, K.; NG, S.; LEE, L.; KOH, L. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 5, May. p. 657-669, 2004.

KIM, I.; CARR, G. D. Cytogenetics and hybridization of *Portulaca* in Hawaii. **Systematic Botany**, v. 15, p. 370-377, 1990.

KIMURA, M.; WEISS, G. H. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. **Genetics**, v. 49, n. 4, p. 561, 1964.

KLEIN, R. M. O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Sellowia**, v. 12, n. 12, p. 17-44, 1960.

KLEIN, R. M.; RODRIGUEZ, H. B. Mapa fitogeográfico do estado de Santa Catarina. In _____ **Mapa fitogeográfico do estado de Santa Catarina**. IOESC. 25p. 1978.

KLEIN, R. M. Aspectos dinâmicos da vegetação do sul do Brasil. **Sellowia**, v. 36, n. 36, p. 5-54, 1984.

KLEIN, R. M. Os tipos florestais com Araucária em Santa Catarina. In: _____. **Anais do XXXVI Congresso Nacional de Botânica**. IBAMA, Brasília. v. 1, p. 101-119, 1990.

KUBITZKI, K. Introduction. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V. **The families and genera of vascular plants. Flowering plants: Dicotyledons; Magnoliid, hamamelid and caryophyllid families**. Berlin: Springer Heidelberg, p. 1-12, 1993.

LATTA, R. G.; LINHART, Y. B.; FLECK, D.; ELLIOT, M. Direct and indirect estimates of seed versus pollen movement within a population of ponderosa pine. **Evolution**, Washington, v. 52, n. 1, p. 61-67, Feb. 1998.

LEGRAND, C. D. Desmembración del género *Portulaca* II. **Comunicaciones Botánicas del Museo de Historia Natural de Montevideo**, v. 34, n. 3, p. 1-17, 1958.

LEGRAND, C. D. Las Especies Americanas de *Portulaca*. **Anales del Museo de Historia Natural de Montevideo**, v. 7, n. 3, p. 9-147, 1962.

LEWONTIN, R. The problems of population genetics, p.5-23. In: SINGH, R.S.; KRIMBAS, C.B. (Eds.). **Evolutionary Genetics: from Molecules to Morphology**. Cambridge University, Cambridge. 702p. 2004.

LI, X.; YANG, Y.; ROBERT, J.H.; MAURIZIO, R.; WANG, Y.; SHILIN, C. Plant DNA barcoding: from gene to genome. **Biological Reviews**, v. 90, n. 1, p. 157-166, 2015.

LIM, Y.Y.; QUAH, E. P. L. Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. **Food Chemistry**, v. 103, p. 734-740, 2006.

LIU, L.; HOWE, P.; ZHOU, Y.; XU, Z.; HOCART, C.; ZHANG, R. Fatty acids and b-carotene in Australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties. **Journal of Chromatography A**, v. 893, p. 207-213, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2ed. 544p. 2008.

LUNA, R.; EPPERSON, B. K.; OYAMA, K. Spatial genetic structure of two sympatric neotropical palms with contrasting life histories. **Heredity**, London, v. 95, n. 4, p. 298-305, Oct. 2005

MAACK, R. **Geografia Física do Estado do Paraná**. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa. Editora: UEPG 4ed. 526p. 2012.

MACHADO, F. B. **Geologia e possíveis zonas de efusão do magmatismo ácido cretácico da Bacia do Paraná.** Monografia (TCC), Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

MADDISON, D. R.; MADDISON, W. P. **Chromaseq: a Mesquite package for analyzing sequence chromatograms. Version 1.12.** Disponível em: <<http://mesquiteproject.org/packages/chromaseq>>, 2014a.

MADDISON, D. R.; MADDISON, W. P. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.01.** Disponível em: <<http://mesquiteproject.org>>, 2014b.

MARQUARDT, P. E.; EPPERSON, B. K. Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 11, p. 3305-3315, Nov. 2004.

MARTINELLI, G. **Campos de altitude.** Rio de Janeiro: Editora Index. 1996.

MARTINELLI, G. Mountain biodiversity in Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 30, n. 4, p. 587-597, 2007.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos, In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. **Biologia molecular e evolução.** Holos, Ribeirão Preto. p. 217-238. 2012.

MATTHEWS, J. F.; LEVINS, P. A. The systematic significance of seed morphology in *Portulaca* (Portulacaceae) under scanning electron microscopy. **Systematic Botany**, p. 302-308, 1986.

MATTHEWS, J. F.; KETRON, D. W.; ZANE, S. F. *Portulaca umbraticola* Kunth (Portulacaceae) in the United States. **Castanea**, p. 202-208, 1992.

MATTHEWS, J. F.; KETRON, D. W.; ZANE, S. F. The biology and taxonomy of the *Portulaca oleracea* L. (Portulacaceae) complex in North America. **Rhodora**, p. 166-183, 1993.

MATTHEWS, J. F.; KETRON, D. W.; ZANE, S. F. The seed surface morphology and cytology of six species of *Portulaca* (Portulacaceae). **Castanea**, p. 331-337, 1994.

MEDEIROS, J. D. Da exploração e conservação da *Araucaria angustifolia*. **Parecer Ministério Público Federal**, Florianópolis, Brasil. 6p, 2000.

MEDEIROS, R. B. D., PILLAR, V. D.; REIS J. C. L. Expansão de *Eragrostis plana* Ness. (Capim Annoni-2) no Rio Grande do Sul e indicativos de controle. In: _____ **20 Reunión del grupo técnico regional del Cono Sur en mejoramiento y utilización de los recursos forrajeros del área tropical y subtropical.** Grupo Campos Salta, p.208-211, 2004.

MEDEIROS, J. D. Campo dos Padres. In: BEASLEY, J. R. **Serra Catarinense: As montanhas do sul do Brasil.** Florianópolis: Letras Brasileiras. v.1, p.48-71, 2005.

METZGER, J. P. O que é ecologia de paisagens? **Biota Neotropica**, v. 28, n. 11, p. 1-9, 2002.

METZGER, J. P. Delineamento de experimentos numa perspectiva de ecologia da paisagem. In: CULLEN, L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. **Métodos e Técnicas na Biologia da Conservação e no Manejo da Vida Silvestre**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 539-555, 2003.

MEUDT, H. M.; CLARKE, A. C. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 106-117, 2007.

MEZZOMO, M. M. Vulnerabilidade ambiental do município de Marechal Cândido Rondon-PR. In: _____ **Anais do Encontro de Produção Científica e Tecnológica**. Campo Mourão. Campo Mourão: Editora da Fecilcam, v. 4, 2009.

MILLS, L. S.; ALLENDORF, F. W. The One-Migrant-per-Generation Rule in Conservation and Management. **Conservation Biology**, v. 10, p. 1509-1518, 1996.

MISHIBA, K. I.; MII, M. Polysomaty analysis in diploid and tetraploid **Portulaca grandiflora**. **Plant Science**, v. 156, n. 2, p. 213-219, 2000.

MURAWSKI, D. A. Reproductive biology and genetics of tropical trees from canopy perspective. In: LOWMAN, M. D.; NADKARNI, N. M. (Ed.). **Forest canopies**. New York: Academic. p. 457-493, 1995.

MYAMOTO, M.; KURAMOTO, N.; YAMADA, H. Differences in spatial autocorrelation between four sub-populations of *Alnus trabeculosa* Hand. - Mazz. (Betulaceae). **Heredity**, Essex, v. 89, n. 4, p. 273-279, Oct. 2002.

NABINGER, C.; MORAES, A. D.; MARASCHIN, G. E. Campos in southern Brazil. In: LEMAIRE, G.; HODGSON, J.; MORAES, A. D.; CARVALHO, P. D. F.; NABINGER, C. **Grassland ecophysiology and grazing ecology**. CABI Publishing, Wallingford, v. 1996, p. 355-376, 2000.

NIELSEN R.; SLATKIN M. **Introduction to Population Genetics, Theory and Applications**, Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press, 2013.

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

NEI, M.; LI, W-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.

NEIGEL, J. E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review Ecology Systematics**, Palo Alto, v. 28, p. 105-128, 1997.

NYANANYO, B. L. Notes on the reproductive biology of *Portulaca* L. (Portulacaceae) in Nigeria. **Folia Geobotanica & Phytotaxonomica**, v. 21, n. 4, p. 431-434, 1986.

NYFFELER, R. The closest relatives of cacti: insights from phylogenetic analyses of chloroplast and mitochondrial sequences with special emphasis on relationships in the tribe Anacampseroteae. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 1, p. 89-101, 2007.

NYFFELER, R.; EGGLI, U. Disintegrating Portulacaceae: a new familial classification of the suborder Portulacineae (Caryophyllales) based on molecular and morphological data. **Taxon**, v. 59, n. 1, p. 227-240, 2010.

OBIED, W. A.; MOHAMOUD, E. N.; MOHAMED, O. S. A. *Portulaca oleracea* (purslane): nutritive composition and clinico-pathological effects on Nubian goats. **Small Ruminant Research**, v. 48, n. 1, p. 31-36, 2003.

OCAMPO, G. Morphological characterization of seeds in Portulacaceae. **Phytotaxa**, v. 141, n. 1, p. 1-24, 2013.

OCAMPO, G.; COLUMBUS, J. T. Molecular phylogenetics of suborder Cactineae (Caryophyllales), including insights into photosynthetic diversification and historical biogeography. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 11, p. 1827-1847, 2010.

OCAMPO, G.; COLUMBUS, J. T. Molecular phylogenetics, historical biogeography, and chromosome number evolution of *Portulaca* (Portulacaceae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 63, n. 1, p. 97-112, 2012.

OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; WAGNER, H. **Community ecology package. R package version 2.3-4**. 2012. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>>. Acesso em: 08 set. 2017.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 793-810, 2000.

ORTIZ, M. A.; TREMETSBERGER, K.; TERRAB, A.; STUESSY, T. F.; GARCÍA-CASTANÕ, J.L.; URTUBEY, E.; BAEZA, C. M.; RUAS, C. F.; GIBBS, P. E.; TALAVERA, S. Phylogeography of the invasive weed *Hypochaeris radicata* (Asteraceae): from Moroccan origin to worldwide introduced populations. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 3664-3667, 2008.

OUBORG, N. J.; VERGEER, P.; MIX, C. The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants. **Journal of Ecology**, v. 94, n. 6, p. 1233-1248, 2006.

OVERBECK, G. E.; MÜLLER, S. C.; FIDELIS, A.; PFADENHAUER, J.; PILLAR, V. D.; BLANCO, C. C.; BOLDRINI, I. I.; BOTH, R.; FORNECK, E. D. Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 9, n. 2, p. 101-116, 2007.

OVERBECK, G. E.; MÜLLER, S.C.; PFADENHAUER, J.; PILLAR, V. D. Floristic composition, environmental variation and species distribution patterns in burned grassland in southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 4, p. 1073-1090, 2006.

OVERBECK, G. E.; PFADENHAUER, J. Adaptive strategies in burned subtropical grassland in southern Brazil. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 202, n. 1, p. 27-49, 2007.

PEARSE, D.E.; CRANDALL, K.A. Beyond FST: analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetics**, v.5, n.5, p.585-602. 2004.

PILLAR, V. D.; BOLDRINI, I. I.; HASENACK, H.; JACQUES, A. V. A.; BOTH, R. Estado atual e desafios para a conservação dos campos. **Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2006.

PILLAR, V. P. Padrões e processos em campos do sul do Brasil. **Tópicos atuais em botânica, SBB & Embrapa/Cenargen, Porto Alegre**, p. 165-171, 2000.

PIÑEIRO, R.; AGUILAR, J. F.; DE SEQUEIRA, M. M.; FELINER, G. N. Low genetic diversity in the rare Madeiran endemic *Armeria maderensis* (Plumbaginaceae). **Folia Geobotanica**, v. 44, n. 1, p. 65, 2009.

PINTO, C. E.; SCHLINDWEIN, C. Pollinator sharing and low pollen–ovule ratio diminish reproductive success in two sympatric species of *Portulaca* (Portulacaceae). **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 50, n. 1, p. 4-13, 2015.

PIORSKI, N. M.; SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; CARRILLO-AVILA, M.; FREITAS, P. D.; GALETTI JR, P. M. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 1039-1050, 2008.

PLEINES, T.; JAKOB, S. S.; BLATTNER, F. R. Application of non-coding DNA regions in intraspecific analyses. **Plant Systematics and Evolution**, v. 282, n. 3-4, p. 281-294, 2009.

POMETTI, C. L.; BESSEGA, C. F.; VILKARDI, J. C.; EWENS, M.; SAIDMAN, B. O. Genetic variation in natural populations of *Acacia visco* (Fabaceae) belonging to two sub-regions of Argentina using AFLP. **Plant systematics and evolution**, v. 302, n. 7, p. 901-910, 2016.

PORTIS, E.; COMINO, C.; LENZI, A.; LOMBARDI, P.; TESI, R.; LANTERI, S. Amplified fragment length polymorphism for variety identification and genetic diversity assessment in oleander (*Nerium oleander* L.). **Euphytica**, v. 136, n. 2, p. 125-137, 2004.

PREBBLE, J. M.; MEUDT, H. M.; GARNOCK-JONES, P. J. Phylogenetic relationships and species delimitation of New Zealand bluebells (*Wahlenbergia*, Campanulaceae) based on analyses of AFLP data. **New Zealand Journal of Botany**, v. 50, n. 3, p. 365-378, 2012.

PRENTIS, P. J.; MATHER, P. B. Fine-scale patterns of genetic variation indicate non-equilibrium gene frequency divergence in the stream lily, *Helmholtzia glaberrima*. **Freshwater biology**, v. 53, n. 5, p. 973-980, 2008.

PYKE, G. H. Plant–pollinator co-evolution: It's time to reconnect with Optimal Foraging Theory and Evolutionarily Stable Strategies. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 19, p. 70-76, 2016.

- RADHAKRISHNAN, R.; ZAKARIA, M. N. M.; ISLAM, M. W.; CHEN, H. B.; KAMIL, M.; CHAN, K.; AL-ATTAS, A. Neuropharmacological actions of *Portulaca oleraceae* L v. sativa (Hawk). **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 2, p. 171-176, 2001.
- RAMBO, B. A flora fanerogâmica dos aparados riograndenses. **Sellowia**, v. 7, n. 8, p. 235-298, 1956.
- RAO, V. R.; HODGKIN, T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 68, n. 1, p. 1-19, 2002.
- RASHED, A. N.; AFIFI, F. U.; DISI, A. M. Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Portulaca oleracea* L. (growing in Jordan) in *Mus musculus* JVI-1. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 2-3, p. 131-136, 2003.
- RECK, M.; BENÍCIO, L. M.; RUAS, E. A.; RODRIGUES, L. A.; RUAS, P. M.; ORTIZ, M. A.; TALAVERA, S.; URTUBEY, E.; STUESSY, T.; WEISS-SCHNEEWEISS, H.; TREMETSBERGER, K.; MICHELAN, V. S.; MATZENBACHER, N. I.; VANZELA, A. L. L.; TERRAB, A.; SAMUEL, R.; RUAS, C. F. Karyotype and AFLP data reveal the phylogenetic position of the Brazilian endemic *Hypochoeris catharinensis* (Asteraceae). **Plant systematics and evolution**, v. 296, n. 3-4, p. 231, 2011.
- REED, D. H.; FRANKHAM, R. Correlation between fitness and genetic diversity. **Conservation biology**, v. 17, n. 1, p. 230-237, 2003.
- RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.
- RODRIGUES, L. A.; RUAS, E. A.; RUAS, P. M.; RECK M.; FIORIN, F. G.; ORTIZ, M. A.; URTUBEY, E.; MATZENBACHER, N. I.; RUAS, C. F. Population genetic structure of the South American species *Hypochoeris lutea* (Asteraceae). **Plant species biology**, v. 31, n. 1, p. 55-64, 2016.
- RUAS, E. A.; RUAS, C. F.; MEDRI, P. S.; MEDRI, C.; MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; RODRIGUES, L. A.; RUAS, P. M. Anatomy and genetic diversity of two populations of *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) from the Tibagi River basin in Parana, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 1, p. 526-536, 2011.
- R STUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development for R**. RStudio, Inc. 2018. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>.
- SANTOS, G. M. et al. Biologia floral e reprodutiva de *Portulaca hatschbachii* D. Legrand (Portulacaceae): Uma espécie endêmica do Terceiro Planalto Paranaense. TCC, Universidade Estadual de Londrina – **dados não publicados**, 2018.
- SCARANO, F. R. Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic rain forest. **Annals of Botany**, London, v. 90, n. 4, p. 517-524, 2002

- SCHAAL, B. A.; HAYWORTH, D. A.; OLSEN, K. M.; RAUSCHER, J. T.; SMITH, W. A. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 4, p. 465-474, 1998.
- SCHLUETER, P. M.; HARRIS, S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. **Molecular Ecology Resources**, v. 6, n. 2, p. 569-572, 2006.
- SCHÖNSWETTER, P.; TRIBSCH, A. Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). **Taxon**, v. 54, p. 725–732, 2005.
- SEBBEN, A. M. **Estrutura Genética de Populações de Jequitibá-Rosa [*Cariniana legalis*] (Mart.) O. Ktze por caracteres quantitativos e isoenzimas**. 2001. Tese de Doutorado. Tese de doutorado, Piracicaba, SP, Universidade de São Paulo, 2001.
- SEBBENN, A. M.; ETTORI, L. C. Conservação genética *ex situ* de *Essenbeckis leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltophorum dubium* em teste de progênie misto. **Revista do Instituto Florestal**, v. 13, n. 2, p. 201-211, 2001.
- SERROTE, C. M. L.; REINIGER, L. R. S.; STEFENON, V. M. **Simulações em Genética de População e Conservação de Recursos Florestais**. Jundiaí: Paco Editorial, 116p. 2016.
- SHAN, F.; CLARKE, H.; YAN, G.; PLUMMER, J. A.; SIDDIQUE, K. H. Development of DNA fingerprinting keys for discrimination of *Cicer echinospermum* (PH Davis) accessions using AFLP markers. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 55, n. 9, p. 947-952, 2004.
- SHAPCOTT, A. The spatial genetics structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). **Heredity**, Oxford, v. 74, n. 1, p. 28-38, Jan. 1995.
- SHARMA, I. K.; CLEMENTS, M. A.; JONES, D. L. Observations of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa* R. Br. (Orchidaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, n. 7, p. 651-663, 2000.
- SHAW, J.; LICKEY, E. B.; SCHILLING, E. E.; SMALL, R. L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 3, p. 275-288, 2007.
- SILVA, A. R. **Aspectos fitossociológicos e pedológicos em remanescente florestal e florística em afloramento rochoso no Município de Campo Mourão, Paraná, Brasil**. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2011.
- SILVA, P. A. H. **Cerrados, campos e araucárias: a teoria dos refúgios florestais e o significado paleogeográfico da paisagem do Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa-Paraná**. 146p. 2009. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

- SILVA, S. M. M.; MARTINS, K.; MESQUITA, A. G. G.; WADT, L. H. O. Parâmetros genéticos para a conservação de *Hymenaea courbaril* L. na amazônia sul-ocidental. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 1, 2014.
- SIMOPOULOS, A. P.; TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; REITER, R. J. Purslane: a plant source of omega-3 fatty acids and melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 39, n. 3, p. 331-332, 2005.
- SIMPSON, M. G. Plant systematics. In: _____. **Plant systematics**, 2ed, Academic Press, Amsterdam, p. 573-584, 2010.
- SKREDE, I.; BORGES, L.; BROCHMANN, C. Genetic structuring in three closely related circumpolar plant species: AFLP versus microsatellite markers and high-arctic versus arctic-alpine distributions. **Heredity**. v. 102, p. 293 –302, 2009.
- SMALL, R. L.; LICKEY, E. B.; SHAW, J.; HAUKE, W. Amplification of noncoding chloroplast DNA for phylogenetic studies in lycophytes and monilophytes with a comparative example of relative phylogenetic utility from Ophioglossaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, p. 509-522, 2005.
- SMOUSE, P. E.; SORK, V. L. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 197, n. 1/3, p. 21-38, Aug. 2004.
- SOLÉ-CAVA, A. M.; CUNHA, H. A. A genética e a conservação da natureza. **Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holo**, p. 217-228, 2012.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; MILLIGAN, B. G. Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications. In: SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; DOYLE, J. J. **Molecular Plants Systematics**. Chapman and Hall, New York, p. 117-150, 1992.
- SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S. The dynamic nature of polyploid genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, New York, v. 92, p. 8089-8091. 1995.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, Oxford, v. 14, p. 348-352, 1999.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97, p. 7051-7057, 2000.
- SORK, V. L.; NANSON, J.; CAMPBELL, D. R.; FERNANDEZ, J. F. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 14, n. 6, p. 219-224, June 1999.
- SOUZA, L. B.; RUAS, E. A.; RODRIGUES, L. A.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M. AFLP marker analysis revealing genetic structure of the tree *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae) in the southern Brazilian Tropical Rainforest. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 4, p. 533-539, 2013.

SPECIES LINK. 2002. Disponível em: **rede speciesLink** <<http://www.splink.org.br>>. Acesso em: 1 dez. 2018.

SPIELMAN, D.; BROOK, B. W.; FRANKHAM, R. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 42, p. 15261-15264, 2004.

SZPIECH, Z. A.; ROSENBERG, N. A. On the size distribution of private microsatellite alleles. **Theoretical Population Biology**, v. 80, n. 2, p. 100-113, 2012.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Reading: Addison-Wesley, 216p. 1971.

STEBBINS, G. L. Polyploidy in plants: unsolved problems and prospects. In: LEWIS, W. H. **Polyploidy: biological relevance**. New York: Plenum. p. 495 -519, 1980.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v.15, p.199-203. 2000.

SWOFFORD, D. L. **PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), version 4.0 b10**. 2003.

TEMPLETON, A. R.; CRANDALL, K. A.; SING, C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, v. 132, n. 2, p. 619-633, 1992.

THORNE, R. F.; REVEAL, J. L. An updated classification of the class Magnoliopsida (“Angiospermae”). **The Botanical Review**, v. 73, n. 2, p. 67-181, 2007.

TINNERT, J.; HELLGREN, O.; LINDBERG, J.; KOCH-SCHMIDT, P.; FORSMAN, A. Population genetic structure, differentiation, and diversity in *Tetrix subulata* pygmy grasshoppers: roles of population size and immigration. **Ecology and Evolution**, v.6, p. 7831-7846, 2016.

TREMETSBERGER, K.; STUESSY T. F.; KADLEC, G.; URTUBEY, E.; BAEZA, C. M.; BECK, S. G.; VALDEBENITO, H. A.; RUAS, C. F.; MATZENBACHER, N. I. AFLP phylogeny of South American species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). **Systematic Botany**, v. 31, n. 3, p. 610-626, 2006.

TREMETSBERGER, K.; URTUBEY, E.; TERRAB, A.; BAEZA, C. M.; ORTIZ, M. A.; TALAVERA, M.; KÖNIG, C.; TEMSCH, E. M.; KOHL, G.; TALAVERA, S.; STUESSY, T. F. Pleistocene refugia and polytopic replacement of diploids by tetraploids in the Patagonian and Subantarctic plant *Hypochaeris incana* (Asteraceae, Cichorieae). **Molecular Ecology**, v. 18, p. 3668– 3682, 2009.

TURNER, B. L. Chromosome numbers and their phyletic interpretation. In: BEHNKE, H. D.; MABRY, T. J. **Caryophyllales**. Evolution and Systematics. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 27-43, 1994.

VASCONCELOS, M. F. D. O que são campos rupestres e campos de altitude nos topos de montanha do Leste do Brasil? **Brazilian Journal of Botany**, v. 34, n. 2, p. 241-246, 2011.

VEKEMANS, X. AFLP-SURV version 1.0. Laboratoire de Genetique et Ecologie Vegetale. **Universite Libre de Bruxelles, Belgium**, 2002. Disponível em: <<http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/aflp-surv.html>>. Acesso em: 8 set. 2017.

VON POELLNITZ, K. Versuch einer monographie der Gattung *Portulaca* L. **Feddes Repertorium**, v. 37, n. 14-20, p. 240-320, 1934.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERA, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WANG, J. The One-Migrant-per-Generation Rule in Conservation and Management. **Conservation Biology**, v. 18, p. 332-343, 2004.

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

WICKRAMASINGHE, P.; HARRISON, D. K.; JOHNSTON, M. E. Reproductive biology and intergeneric breeding compatibility of ornamental *Portulaca* and *Calandrinia* (Portulacaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 57, n. 8, p. 697-707, 2010.

WOLF, P. G.; SIPES, S. D.; WHITE, M. R.; MARTINES, M. L.; PRYER, K. M.; SMITH, A. R.; UEDA, K. Phylogenetic relationships of the enigmatic fern families Hymenophyllopsidaceae and Lophosoriaceae: Evidence from rbcL nucleotide sequences. **Plant Systematics and Evolution**, v. 219, n. 3-4, p. 263-270, 1999.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v.16, n.2, p.97-159. 1931.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v.28, n.2, p.114-138. 1943.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v.15, p.323-354. 1951.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations: Vol. 2. The theory of gene frequencies. University of Chicago Press, Chicago. P 520, 1969.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations**, v.4. Variability Within and Among Populations. Chicago: University of Chicago, 580p. 1978.

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Thearaceae) in Korea based on allozyme studies. Botanical Bulletin of Academia Sinica, Shanghai, v. 37, n. 1, p. 141-146, 1996.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética da *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 130f. 2002. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ). Piracicaba, 2002.

ZULOAGA, F.O; MARRONE, O; BELGRANO, M.L. **Catálogo de las plantas Vasculares del Cono Sur**. St. Louis, Mo., U.S.A.; Missouri Botanical Garden Press. p. 2796-2816, 2008.