



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIELE CASSIANO FELICIANO

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE ESPÉCIES
ENDÊMICAS DO PARANÁ AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO**

Londrina
2023

DANIELE CASSIANO FELICIANO

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE ESPÉCIES
ENDÊMICAS DO PARANÁ AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas.

Coorientador: Profa. Dra. Sara Mataroli de Godoy.

Londrina
2023

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

F314d Feliciano, Daniele Cassiano.

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE ESPÉCIES ENDÊMICAS DO PARANÁ AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO / Daniele Cassiano Feliciano. - Londrina, 2023.
150 f. : il.

Orientador: Claudete de Fátima Ruas.

Coorientador: Sara Mataroli de Godoy.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2023.

Inclui bibliografia.

1. AFLP - Tese. 2. Genética da Conservação - Tese. 3. Genética de Populações - Tese. 4. Habitats isolados - Tese. I. Ruas, Claudete de Fátima . II. de Godoy, Sara Mataroli. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU 574

DANIELE CASSIANO FELICIANO

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE ESPÉCIES ENDÊMICAS DO PARANÁ AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito a obtenção do título de Doutora.

Banca Examinadora

Coorientador: Profa. Dra. Sara Mataroli de
Godoy
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Paulo Maurício Ruas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Lya Carolina da Silva Mariano Pereira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Fernanda Freitas de Oliveira
Universidade Federal do Paraná – UFPR

João Fernandes Marques da Silva
SuperBAC

Londrina, 10 de abril de 2023.

*“Entrega suas preocupações ao Senhor, e Ele
o sustentará; jamais permitirá que o justo
venha a cair.”*

Salmo 55:22

*“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, o senhor Altíssimo, todo poderoso Deus, à Ele toda honra e Glória, que me fez forte até cumprir minha promessa e nunca me desamparou!

Agradeço à Minha família de maneira geral, mas em especial à minha mãe Ana, ao meu pai Reinaldo, à minha irmã Danivia e ao meu irmão Denis, por me apoiarem em todas as decisões que já fiz na vida.

À minha orientadora Dra. Claudete Ruas e ao Dr. Paulo Ruas por estes anos de parceria, amizade, apoio profissional e financeiro para realização deste e de muitos outros trabalhos.

Com muita gratidão, à Dra. Sara Mataroli de Godoy, minha amiga, parceira, orientadora profissional e pessoal, por me ajudar em tudo, por todos estes anos e ao João Fernando por pacientemente tentar me explicar as análises estatísticas.

À Fernanda Freitas, minha amiga de todas as horas, de apoio moral, emocional e incondicional, obrigada por tanto.

Aos amigos do lab “Ruas”, agradeço de coração, a todos que conheci nestes longos anos de estudo, mas especialmente aos meus amigos Bruna e Lucas.

A todos os amigos da pós, professores e colaboradores, em especial a profa. Dra. Daniele Sartori, a profa. Dra. Fernanda Simões e ao Prof. Dr. Leandro Azeredo.

Aos amigos do Herbário, Patrícia, Jaiana, José Roberto, Élson, Thiago e prof. Dr. José Eduardo, pelos mais diversos ensinamentos e apoio.

Ao Robson, técnico da UEL pelo apoio, nas coletas.

Aos meus amigos/irmãos de graduação Thielly Fabian e Dhiego Gomes.

À família Guergoleti!

Aos verdadeiros amigos de Minas Gerais, Claudia Lira, Daniela Vialli, Rosana, Gabriel, *in memoriam* Cristiane e especialmente à Roberta Miranda. Obrigada por me apoiarem e me manterem nas suas orações.

A todos os meus colegas de trabalho da SuperBac, por todo aprendizado e pelo apoio na reta final do doc.

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 espécies endêmicas do Paraná ameaçadas de extinção**. 2023. 149 f. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutora, Londrina.

RESUMO

Nos afloramentos rochosos basálticos, encontra-se uma flora rara, endêmica e ameaçada, que se distribui, de maneira descontínua, pelo Terceiro Planalto Paranaense, Brasil, compondo ambientes que configuram os Campos de Altitude do Sul do Brasil, conhecidos também como Campos de Cima da Serra, do Bioma Mata Atlântica. Ainda que estudos sobre plantas endêmicas forneçam informações locais, eles apontam um olhar crítico a espécies que podem ser extintas a curto prazo, reforçando a notoriedade dos resultados obtidos a partir dos dados genéticos, que quando combinados à estudo da conservação, podem juntos delinear estratégias efetivas de preservação de espécies ameaçadas. Considerando a antropização massiva dos afloramentos rochosos e os riscos de extinção das espécies de ocorrência, foram utilizados marcadores moleculares AFLP, ITS e *rps16-trnK* para avaliar o status genético das espécies *Mimosa hatschbachii*, *Nierembergia hatschbachii*, *Stylosanthes vallsii* e *Eryngium corallinum* e assim, contribuir para o desenvolvimento de estratégias de conservação das espécies. De maneira geral, foram observados baixos índices de diversidade genética, alta estruturação populacional e o fluxo gênico reduzido em todas as espécies. Tais parâmetros se devem em parte ao sistema reprodutivo das espécies e ao isolamento geográfico e ecológico no qual os afloramentos rochosos se encontram. Entretanto, a degradação evidente desses ambientes acentua a perda de diversidade genética e, por essa razão, os dados aqui apresentados ressaltam a necessidade e urgência de planos de conservação de tais afloramentos e suas espécies de ocorrência.

Palavras-chave: AFLP; conservação; habitats isolados; genética de populações; ITS; *rps16-trnK*.

FELICIANO, Daniele Cassiano. **Diversity and genetic structure of endangered endemic species from Paraná**. 2023. 149 p. Thesis presented to the Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, State University of Londrina, as a requirement for obtaining the title of Doctor, Londrina.

ABSTRACT

In the basaltic rocky outcrops, there is a rare, endemic and threatened flora, which is distributed, discontinuously, by the Third Plateau of Paraná State, Brazil, composing environments that configure the Subtropical Highland Grasslands, also known as *South Brazilian highland grasslands*, from the Atlantic Forest Biome. Although studies on endemic plants provide highly specific information, they point a critical look at species that may become extinct in the short term, reinforcing the notoriety of the results obtained from genetic data, which, when combined with conservation study, can together delineate effective strategies for the preservation of endangered species. Considering the massive anthropization of rocky outcrops and extinction risk of the occurrence species, molecular markers AFLP, ITS and *rps16-trnK* were used to evaluate the genetic status of the species *Mimosa hatschbachii*, *Nierembergia hatschbachii*, *Stylosanthes vallsii* and *Eryngium corallinum* and thus contribute for the development of species conservation strategies. In general way, low rates of genetic diversity, high population structure and reduced gene flow were observed in all species. Such parameters are partly due to the reproductive system of the species and the geographic and ecological isolation in which the rocky outcrops are found. In the meantime, the evident degradation of these environments accentuates the loss of genetic diversity, and for this reason, the data presented here highlight the need and urgency of conservation plans for such outcrops and their occurrence species.

Keywords: AFLP; conservation; isolated habitats; ITS; population genetics; *rps16-trnK*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa da área de distribuição de *Mimosa hatschbachii*, conforme dados do CNCFlora (2012). 29
- Figura 2.** Mapa da área de distribuição de *Eryngium corallinum*, conforme dados do CNCFlora (2012). 34
- CAPÍTULO 1 - Perfil genético de *Mimosa hatschbachii* (Fabaceae) uma espécie ameaçada de extinção e endêmica dos afloramentos rochosos da Mata Atlântica**
- Figura 1.** *Mimosa hatschbachii*. A – Folhas. B – Detalhes do folíolo. C – Flores de *M. hatschbachii*. D - *M. hatschbachii* em seu hábitat. E -Fruto. F - Visão geral do hábitat da espécie (afloramento de rocha basáltica). Fotos de D.C. Feliciano e J.R. Ferraz..... 53
- Figura 2.** Mapa da área de ocorrência mostrando a localização e altitude das populações amostradas de *Mimosa hatschbachii* no Estado do Paraná, Brasil. As siglas são equivalente as iniciais dos municípios de coleta, onde: TUR1 e TUR2 são da cidade de Turvo; CAN1, CAN2, CAN3 e CAN4 da cidade de Candói; GUA de Guarapuava; FOZ1, FOZ2 e FOZ3 de Foz do Jordão e MAN da cidade de Mangueirinha. A área distribuição da espécie conforme dados de ocorrência do CNCFlora, estão delimitadas pela área tracejada..... 55
- Figura 3.** Inferência Bayesiana de agrupamento, realizada pelo software BAPS para 11 populações de *Mimosa hatschbachii*, a partir de 813 fragmento de AFLP. A análise designou o melhor resultado para $K = 3$ agrupamentos (marginal likelihood -78734.7146, probabilidade posterior 1)..... 67
- Figura 4.** Minimum Spanning Network, construída com base na distância genética de Nei-Li, mostrando as relações entre os indivíduos das 11 populações de *Mimosa hatschbachii*, a partir de 813 fragmentos de AFLP. As cores de fundo destacam os três grupos genéticos atribuídos pelo software BAPS. 68
- Figura 5.** Relações genealógicas entre ITS e sequências *rps16-trnK* para

	11 populações de <i>Mimosa hatschbachii</i> , estimadas pelo método de parcimônia estatística no software TCS 1.21. A) Rede de ribótipos da região ITS. B) Rede de haplótipos da região <i>rps16-trnK</i> . O tamanho dos círculos corresponde ao número de indivíduos, e as cores dentro dos círculos representam as populações.....	70
Figura 6.	Correlação espacial de 11 populações de <i>Mimosa hatschbachii</i> , a partir de 813 marcados AFLP. A) Correlograma de Mantel. B) Distograma mostrando valores médios de F_{ST} em cada classe de distância.....	74
Figura 7.	Gráfico do BayeScan mostrando 813 fragmentos de AFLP a partir de 11 populações de <i>Mimosa hatschbachii</i> . O valor Alpha para cada fragmento é plotado contra o valor q, que representa a proporção de marcadores de outliers esperados como falsos positivos e a linha vertical indica o valor de corte de 1% usado. Todos os 154 fragmentos AFLP com valor q menor que 1% tem alfa positivo, sugerindo que eles estão potencialmente sob seleção diversificada. Para fins de visualização, os marcadores com valor q menor que 0,00001 são mostrados com o mesmo valor no gráfico.....	74
Figura 8.	Diagrama de Venn representando o particionamento da variância dos loci AFLP sob seleção entre duas matrizes explicativas: ambiental e espacial. O tamanho dos círculos é proporcional à variância explicada por cada matriz, e a sobreposição entre eles indica a variação compartilhada entre as duas matrizes. Asteriscos próximos as frações explicadas indicam que a fração contribui significativamente para a estrutura dos loci.....	76
Figura 9.	Resultados da análise de redundância (A) e análise de redundância parcial (B), baseadas em 47 loci de AFLP potencialmente sob seleção, mostrando o efeito de variáveis ambientais espacialmente estruturadas e não estruturadas na variação dos loci nas populações. Setas e cruzes vermelhas indicam as variáveis correlacionadas com as populações, e as linhas verdes os loci mais relacionados com cada população.	

	Coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{adj.}$), para cada eixo canônico e para o modelo completo, estão indicados em cada gráfico.	77
Figura 10.	Resíduos da análise de redundância mostrando a variação da dispersão multivariada por população. As populações foram organizadas de acordo com a variação do resíduo e as letras em cada população indicam populações similares de acordo com o teste de 'Diferença significativa honesta' de Tukey (Tukey's HSD test).	78
CAPÍTULO 2 - Perfil genético de espécies endêmicas e ameaçada de extinção dos afloramentos rochosos da Mata Atlântica		
Figura 1.	<i>Nierembergia hatschbachii</i>	105
Figura 2.	<i>Stylosanthes vallsii</i>	106
Figura 3.	<i>Eryngium corallinum</i>	108
Figura 4.	Mapa da área de ocorrência mostrando a localização e altitude das populações coletadas de <i>Nierembergia hatschbachii</i> , <i>Stylosanthes vallsii</i> e <i>Eryngium corallinum</i> , no Paraná, Brasil. As siglas são equivalente as iniciais dos municípios de coleta, onde: CAN1, CAN2, CAN3 e CAN4 da cidade de Candói e FOZ1, FOZ2 e FOZ3 de Foz do Jordão.	109
Figura 5.	Agrupamentos por Inferência Bayesiana realizada pelo BAPS para 6 populações de <i>Nierembergia hatschbachii</i> . Foram encontrados 5 <i>clusters</i> distintos com o melhor resultado de $K = 5$ agrupamentos (probabilidade marginal -20915.6035, probabilidade posterior 1), a partir de 404 fragmento de AFLP.	114
Figura 6.	Agrupamentos por Inferência Bayesiana realizada pelo BAPS para 6 populações de <i>Stylosanthes vallsii</i> . Foram formados 3 <i>clusters</i> distintos com o melhor resultado de $K = 3$ agrupamentos (probabilidade marginal -14563.4279, probabilidade posterior 1), a partir de 321 fragmento de AFLP.	115
Figura 7.	Agrupamentos por Inferência Bayesiana realizada pelo BAPS para 6 populações de <i>Eryngium corallinum</i> . Foram formados 3 <i>clusters</i> distintos com o melhor resultado de $K = 3$ agrupamentos	

- (probabilidade marginal -16395.1813, probabilidade posterior 1), a partir de 352 fragmento de AFLP. 116
- Figura 8.** Minimum Spanning Netwok (MSN) mostrando as relações evolutivas entre 6 populações de *Nierembergia hatschbachii*. A MSN foi construída com base nas distâncias de Nei-Li a partir de 404 fragmentos de AFLP. A cor de fundo dos agrupamentos (ABCDE) codifica os seis *clusters* genéticos encontrados pelo BAPS. 117
- Figura 9.** Minimum Spanning Netwok (MSN) mostrando as relações evolutivas entre 6 populações de *Stylosanthes vallsii*. A MSN foi construída com base nas distâncias de Nei-Li a partir de 321 fragmentos de AFLP. A cor de fundo dos agrupamentos (ABC) codifica os três *clusters* genéticos encontrados pelo BAPS. 118
- Figura 10.** Minimum Spanning Netwok (MSN) mostrando as relações evolutivas entre 6 populações de *Eryngium corallinum*. A MSN foi construída com base nas distâncias de Nei-Li a partir de 352 fragmentos de AFLP. A cor de fundo dos agrupamentos (ABC) codifica os três *clusters* genéticos encontrados pelo BAPS. 119
- Figura 11.** Correlação entre a diferenciação genética (F_{ST} par a par, a partir do AFLP) e distância geográfica (Km) de 6 populações de *Nierembergia hatschbachii* ($r = 0,48$, $P = 0,015$). Análise realizada pelo teste de Mantel utilizando o método “Pearson”. Distâncias geográficas no eixo (x); Diferenciação genética no eixo (y). 123
- Figura 12.** Correlação entre a diferenciação genética (F_{ST} par a par, a partir do AFLP) e distância geográfica (Km) de 6 populações de *Stylosanthes vallsii* ($r = 0,27$, $P = 0.142$). Análise realizada pelo teste de Mantel utilizando o método “Pearson”. Distâncias geográficas no eixo (x); Diferenciação genética no eixo (y). 123
- Figura 13.** Correlação entre a diferenciação genética (F_{ST} par a par, a partir do AFLP) e distância geográfica (Km) de 6 populações de *Eryngium corallinum* ($r = 0,88$, $P = 0.044$). Análise realizada pelo teste de Mantel utilizando o método “Pearson”. Distâncias geográficas no eixo (x); Diferenciação genética no eixo (y). 124

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - Perfil genético de *Mimosa hatschbachii* (Fabaceae) uma espécie ameaçada de extinção e endêmica dos afloramentos rochosos da Mata Atlântica

- Tabela 1.** Informações das amostras usadas para inferir a diversidade genética e a estrutura populacional de *Mimosa hatschbachii*. Nome das populações com código de acordo com o local de coleta, número total de amostras por população (N), coordenadas de latitude e longitude, altitude em metros, número do voucher, número de amostras da população disponíveis para análise de AFLP e números de acesso no GenBank das amostras utilizadas na análise das sequências ITS e *rps16-trnK*. O número entre parênteses após os nomes dos marcadores genéticos representa o número total de amostras disponíveis para aquele marcador.....57
- Tabela 2.** Variáveis ambientais e espaciais utilizadas para realizar a Análise de Redundância (RDA), para verificar o efeito do ambiente na estrutura genética adaptativa das populações de *Mimosa hatschbachii*.66
- Tabela 3.** Índices de diversidade genética das 11 populações de *Mimosa hatschbachii*, obtidos a partir dos marcadores AFLP, ITS e *rps16-trnK*.....64
- Tabela 4.** Frequência do ribotipo nDNA ITS nas 11 populações de *Mimosa hatschbachii*.65
- Tabela 5.** Frequência de haplótipos *rps16-trnK* nas 11 populações de *Mimosa hatschbachii*.66
- Tabela 6.** Análise de variância molecular (AMOVA) de 11 populações de *Mimosa hatschbachii*. Variação genética entre e dentro das populações de marcadores AFLP, rDNA ITS e DNA plastidial *rps16-trnK*.71
- Tabela 7.** Estimativa do número de migrantes por geração, entre 11 populações de *Mimosa hatschbachii*, a partir de 813 marcadores AFLP, conforme fórmula proposta por Nielsen e Slatkin (2013).72

Tabela 8.	Diferenciação genética (F_{ST} par a par, a partir do AFLP) entre as 11 populações de <i>Mimosa hatschbachii</i> abaixo da diagonal e distância geográfica (km), acima da diagonal.	73
Tabela 9.	Coeficiente de Mantel e valores de significância para o correlograma de Mantel.	74

CAPÍTULO 2 - Perfil genético de espécies endêmicas e ameaçada de extinção dos afloramentos rochosos da Mata Atlântica

Tabela 1.	Informações das amostras utilizadas para inferir a diversidade genética e a estrutura populacional de <i>Nierembergia hatschbachii</i> , <i>Stylosanthes vallsii</i> e <i>Eryngium corallinum</i> . O nome das populações com código de acordo com o local de coleta, coordenadas de latitude e longitude, altitude em metros e número do voucher por exemplar, estão detalhados abaixo.	110
Tabela 2.	Dados dos fragmentos gerados pelas combinações de primers de AFLP, das três espécies estudadas.	112
Tabela 3.	Índices de diversidade genética das populações de <i>Nierembergia hatschbachii</i> , <i>Stylosanthes vallsii</i> e <i>Eryngium corallinum</i> , obtidos com base nos marcadores AFLP.	113
Tabela 4.	Análise da variância molecular (AMOVA) aplicada aos marcadores AFLP para as populações das três espécies, <i>Nierembergia hatschbachii</i> , <i>Stylosanthes vallsii</i> e <i>Eryngium corallinum</i>	120
Tabela 5.	Estimativa do número de migrantes por geração, das populações das três espécies estudadas: <i>Nierembergia hatschbachii</i> , <i>Stylosanthes vallsii</i> e <i>Eryngium corallinum</i> , a partir de marcadores AFLP, conforme fórmula proposta por Nielsen e Slatkin (2013).	121
Tabela 6.	Os índices de diferenciação genética (F_{ST} par a par, a partir do AFLP) das populações das três espécies <i>Nierembergia hatschbachii</i> , <i>Stylosanthes vallsii</i> e <i>Eryngium corallinum</i> , se encontram abaixo da diagonal e a distância geográfica (km), acima da diagonal	122

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	18	
2.1.	18	
2.2.	21	
2.2.1.	24	
2.3.	26	
2.3.1.	27	
2.3.2.	30	
2.4.	31	
2.4.1.	31	
2.5.	32	
2.5.1.	33	
3.	35	
3.1.	35	
3.2.	35	
4.	36	
5.	47	
6.	100	
7.	141	
8.	142	
9.		
	MATERIAL SUPLEMENTAR	143

1. INTRODUÇÃO

O Brasil abriga a mais vasta variedade de flora do planeta, com mais de 36.000 espécies de angiospermas, representando quase 15% da flora global. Além disso, o país é detentor de dois dos oito hotspots neotropicais de biodiversidade: a Mata Atlântica e o Cerrado (MYERS et al., 2000; GIULIETTI *et al.*, 2005; MAGNUSSON *et al.*, 2016). Contudo, devido à extensa degradação ambiental que esses biomas têm enfrentado, a perspectiva de sobrevivência das espécies não é otimista. A análise do estado de 6.046 espécies da flora brasileira revelou que 2.953 (48%) estão classificadas em alguma categoria de ameaça ("Vulnerável", "Em Perigo" ou "Criticamente em Perigo"), enquanto 554 (9%) estão categorizadas como "Dados Insuficientes" (CNCFLORA, 2012; MARTINELLI; MORAES, 2013; ZAPPI *et al.*, 2015).

Neste estudo, destacamos os Campos de Altitude do Sul do Brasil, inseridos no bioma Mata Atlântica, mais precisamente os que formam os afloramentos rochosos de basalto, do estado do Paraná, com composições químicas diferenciadas (MACHADO, 2003; MAACK, 2012), apresentando uma flora especializada (IGANCI *et al.*, 2011). Estes ambientes, com elevado grau de endemismo, são considerados, por sua formação geológica, um hábitat naturalmente isolado (IGANCI *et al.*, 2011; BARROS *et al.* 2015). Em um estudo, baseado nos registros de coleta das espécies e dados compilados do SpeciesLink, juntamente com a utilização dos parâmetros espaciais de extensão de ocorrência (EOO) e de área de ocupação (AOO) por meio do software GeoCat (Bachman et al. 2011), Ferraz (2016), confeccionou uma lista de espécies endêmicas dos afloramentos rochosos, e muitas delas, a partir de nova reavaliação quanto ao estado de conservação, foram para alguma categoria de ameaça, um fator alarmante quanto a preservação destas áreas.

Os campos sobre afloramentos rochosos são áreas prioritárias para a conservação da flora paranaense, apresentando simultaneamente um elevado número de espécies endêmicas e uma diversidade de ameaças antrópicas, como a redução na qualidade de hábitat devido a mineração, fragmentação e a invasão de espécies exóticas (GIULIETTI *et al.*, 2005; OVERBECK *et al.*, 2007; IGANCI *et al.*, 2011). Consequentemente as espécies endêmicas desses hábitats estão sob algum grau de ameaça, variando de "Em Perigo", como por exemplo *Mimosa hatschbachii* Barneby, *Portulaca hatschbachii* D. Legrand e *Zephyranthes paranaensis* Ravenna, até "Criticamente Em Perigo" como *Erygium Coralinum*, Mathias & Constance e *Dyckia walteriana* Leme (MARTINELLI; MORAES, 2013; MUSEGANTE *et al.*, 2020).

Além disso, estudos recentes realizados em *P. hatschbachii*, mostraram vulnerabilidade genética na espécie, devido ao baixo nível diversidade genética e forte isolamento populacional (FELICIANO *et al.*, 2022), bem como em *Z. paranaensis* (APRÍGIO, 2021) sendo estes índices baixos quando comparados aos de outras espécies endêmicas a outros ambientes (PIÑEIRO *et al.*, 2009; JARAMILLO; ATKINSON; GENTILE, 2011). Ademais, outras espécies também foram documentadas ocorrendo exclusivamente sobre estes afloramentos, como: *Stylosanthes vallsii* Sousa Costa & Van den Berg (DA COSTA VALLS, 2010), *Nierembergia hatschbachii* A.A. Cocucci & Hunz (COCUCCI, 1991) e *Eryngium corallinum* Mathias & Constance (MATHIAS & CONSTANCE, 1958), esta avaliada quanto ao estado de conservação como “ criticamente Em Perigo ” (CR) (MARTINELLI; MORAES, 2013). Sendo assim, a proteção dessas áreas, na forma de Unidades de Conservação (UCs), se faz importante na preservação da diversidade biológica e dos recursos genéticos.

Ainda que os afloramentos rochosos de basalto sejam propensos a desenvolver endemismos, sua vegetação vem sendo impactada pela introdução de gramíneas invasoras, extração do substrato rochoso, práticas de silviculturas e isolamento geográfico (PILAR *et al.*, 2006; IGANCI *et al.*, 2011; FELICIANO *et al.*, 2022), fatores que colocam em risco as espécies existentes nesses ambientes. Sendo assim a potencialização da degradação nestes habitats faz com que ocorra um aumento nas taxas de cruzamentos entre indivíduos aparentados e, conseqüentemente, a redução dos níveis de diversidade genética, aumentando a divergência interpopulacional das espécies, o que influencia negativamente a reprodução e sobrevivência das mesmas (KAGEYAMA *et al.*, 2000; SEBBENN, 2001; CAVALLI; WINGE, 2003; FRANKHAM *et al.*, 2010). Além disso, populações pequenas estão propensas a perda de diversidade por deriva genética, tendo como consequência a estruturação genética entre populações (NIELSEN; SLATKIN, 2013). Dessa forma, uma vez que espécies com ocorrência limitada naturalmente possuem uma área de distribuição menor, é presumível que tais populações apresentem índices mais baixos de diversidade genética e uma maior diferenciação genética em comparação com espécies amplamente distribuídas (WRIGHT, 1978).

Nesse contexto, os marcadores moleculares constituem ferramentas fundamentais para acessar os índices de diversidade e estrutura genética e assim, contribuir para ações de conservação de espécies, especialmente as que se

encontram em perigo de extinção. Dentre os tipos de marcadores moleculares, destacam-se o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), vantajoso por não necessitar de sequenciamento prévio, possuir alta reprodutibilidade e cobrir amplamente o genoma (VOS *et al.*, 1995; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MEUDT; CLARKE, 2007) e o ITS (*nrDNA Internal Transcribed Spacer*) que são espaçadores transcritos internos de DNA nuclear ribossomal, apresentando taxa de evolução maior em comparação às regiões codificadoras das subunidades ribossomais, sendo eficientes na inferência de filogenias bem como a identificação molecular de espécies e em estudos de genética de populações (Sun *et al.*, 1994; Shaw *et al.*, 2007; Godoy *et al.*, 2017; Godoy *et al.*, 2019). Para inferência dos processos históricos, que podem ter moldado a estrutura genética e populacional foi utilizada região de DNA plastidial (*rps16-trnK*), descrito por Shaw e colaboradores (2007). Considerando a versatilidade dos marcadores moleculares e as técnicas da genética da conservação, podemos avaliar o risco de extinção de uma espécie por fatores genéticos, levando em conta os mais diferentes aspectos das dinâmicas populacionais. Assim, a avaliação do *status* genético de populações naturais, permitem (1) elaborar estratégias que diminuam os efeitos da endogamia e a baixa diversidade genética; (2) possibilitar o delineamento da estrutura genética das populações; (3) esclarecer incertezas taxonômicas e detectar eventos de hibridização; (4) estabelecer unidades de manejo de espécies; (5) definir áreas e indivíduos para reintroduções, bem como para compreender o sistema reprodutivo e a biologia das espécies (FRANKHAM *et al.*, 2010).

Uma vez que altos índices de diversidade genética proporcionam rápida resposta a mudanças ambientais, enquanto a baixa diversidade tende a reduzir o *fitness* adaptativo e o potencial evolutivo, o que pode levar as espécies à extinção (JEONG *et al.*, 2010), o presente estudo fez uso da aplicação dos marcadores moleculares AFLP, ITS e *rps16-trnK* para avaliar o *status* genético de *Mimosa hatschbachii*, *Nierembergia hatschbachii*, *Stylosanthes vallsii* e *Eryngium Corallinum* e contribuir com informações para futuros planos de manejo e conservação dessas espécies.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. CAMPOS SULINOS: CAMPOS DE ALTITUDE DO SUL DO BRASIL OU CAMPOS DE CIMA DA SERRA

A flora do sul do Brasil apresenta elevada biodiversidade, com 10.202 espécies de plantas (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2022), que estão distribuídas em diferentes tipos de vegetação, incluindo ecossistemas florestais (Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Densa, Florestas Estacional Decidual e Semidecidual) e com predominância de herbáceas (Campo e Cerrado) (PILLAR *et al.*, 2009; MAACK, 2012; GRAEFF, 2015). De maneira geral, os campos são ecossistemas formados por um estrato herbáceo contínuo, incluindo principalmente gramíneas, ervas não graminóides, subarbustos e arbustos (VELDMAN *et al.* 2015). No sul do Brasil, a vegetação herbácea e sem elementos arbóreos são coletivamente chamados de Campos Sulinos, mas com base em aspectos fitogeográficos, podemos dividi-los em três regiões: Campos dos Pampas, Campos Gerais e Campos de Cima da Serra (OVERBECK *et al.*, 2007; OVERBECK *et al.*, 2022). Entretanto, com base em espécies indicadoras da comunidade vegetal, os Campos Sulinos são divididos apenas em campos localizados no bioma Mata Atlântica e campos do bioma Pampa (CONAMA, 2010; ANDRADE *et al.*, 2019).

Estudos palinológicos indicam que os Campos Sulinos ocupavam áreas extensas do Planalto Sul-Brasileiro em épocas glaciais do Holoceno Inferior e Médio (BEHLING *et al.*, 2004). Atualmente, os campos estão restritos a áreas com influência de pastoreio por herbívoros domésticos, manejo de fogo (RODERJAN *et al.* 2002; OVERBECK *et al.*, 2007) ou sobre afloramentos rochosos e solos rasos (MELO *et al.*, 2007; LONGHI-WAGNER *et al.* 2012). Diversas classificações foram descritas para incluir os campos do Planalto Sul-Brasileiro. O termo estepe foi incorporado no mapa oficial de vegetação e biomas do Brasil (MMA, 2004) e seguida por alguns autores (*e.g.*, RODERJAN *et al.* 2002), porém esse termo é inconsistente com as características do sul do Brasil e indica campos semiáridos sob um clima temperado frio (OVERBECK *et al.*, 2007). A vegetação campestre do sul do Brasil é frequentemente denominada Campos de Altitude (*e.g.*, BIFFI; PAISANI 2021; SILVA; ANDRADES-FILHO, 2021), embora também ocorra em altitudes baixas. Aqui, consideraremos como Campos de Altitude apenas a vegetação campestre localizada nos topos das montanhas da Serra do Mar e da Mantiqueira (VASCONCELOS, 2011).

Por fim, os Campos Sulinos foram divididos em três regiões, sendo os Campos dos Pampas restritos ao sul da América do Sul (incluindo o sul do Rio Grande do Sul, Uruguai e nordeste da Argentina), os Campos Gerais na região centro-leste do Paraná e os Campos de Cima da Serra localizadas ao longo do Planalto Sul-Brasileiro (OVERBECK *et al.*, 2022). No Estado do Paraná, os Campos de Cima da Serra são conhecidos regionalmente como Campos de Guarapuava e Campos de Palmas (MAACK, 2012). Daqui em diante, seguiremos a sugestão de Overbeck e colaboradores (2022) e trataremos os Campos do Planalto das Araucárias (Rio Grande do Sul e Santa Catarina), Campos de Guarapuava e Campos de Palmas coletivamente como Campos de Cima da Serra.

Interessantemente, alguns autores (*e.g.*, IGANCI *et al.* 2011; PLÁ *et al.*, 2020) incluem algumas espécies do norte do Paraná como endêmicas dos Campos de Cima da Serra (localmente conhecidos como Campos de Lerroville ou Campos das Pedras), enquanto outros ignoram essa distribuição (*e.g.*, KÜLKAMP *et al.*, 2018). As espécies incluídas, *Portulaca hatschbachii* D.Legrand e *Zephyranthes paranaensis* Ravenna, habitam os basaltos e os solos rasos da Formação Serra Geral desde os Campos de Lerroville até os Campos de Guarapuava. Por outro lado, os Campos do norte do Paraná também têm espécies endêmicas restritas como a bromélia *Dyckia walteriana* Leme (MUSEGANTE *et al.*, 2020). Estudos futuros, como os florísticos e análises de comunidade vegetal, poderão fornecer suporte para incluir essas áreas como Campos de Cima da Serra.

Os campos de Cima da Serra estão distribuídos sobre rochas ígneas e seus solos derivados ao longo da Serra Geral (IGANCI *et al.*, 2011; OVERBECK *et al.*, 2022), que se originou cerca de 120–135 milhões de anos atrás (Almeida, 2009). A riqueza da flora dos Campos de Cima da Serra é elevada, sendo estimados 1.161 táxons de plantas (BOLDRINI *et al.*, 2009), das quais 23,5% são consideradas endêmicas (PLÁ *et al.*, 2020). Nesta vegetação, os afloramentos rochosos são habitats chave devido ao elevado número de espécies endêmicas e ao fornecimento de refúgios para espécies ameaçadas de extinção (PLÁ *et al.*, 2020).

Os nichos ecológicos que contemplam os Campos de Cima da Serra da Mata Atlântica são considerados únicos e apenas 0,5% (453 km²) deles se encontram protegidos por Unidades de Conservação (UCs) (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2000). Esses campos protegidos ocorrem entremeados junto às florestas de Araucária dos Parques Nacionais dos Aparados da Serra, da Serra Geral, e de São Joaquim

(norte do RS e SC, respectivamente; OVERBECK *et al.*, 2007). No entanto, não há nenhuma destas Unidades de Conservação, que abrigue ao menos alguma parte dos afloramentos.

Dessa forma, podemos dizer que os Campos de Altitude do Sul do Brasil, podem ser considerados como uma modalidade de refúgio ecológico, ao observarmos a história adaptativa de suas espécies e o seu valor ecológico (endemismo e alta biodiversidade), podendo fornecer indícios sobre sua relação com outros ecossistemas (AVISE, 2000). Ao considerar essa linha de raciocínio, preservando os ecossistemas associados, manteremos os repositórios da biodiversidade desse bioma, que podem ser perdidos ao longo do tempo se estratégias de conservação e manejo não forem adotadas (HIROTA, 2005; HIROTA, 2011).

Diante disso, conhecer a dinâmica das espécies ali presentes, é de grande importância, principalmente a dos campos sobre afloramentos rochosos, pois isso possibilita investigar as relações entre estes e os tipos de vegetações ali estabelecidas, bem como conhecer suas adaptações e sua dinâmica sob diferentes cenários de climas e distúrbios, para então delinear um manejo adequado de conservação destas áreas (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000; CONCEIÇÃO; PIRANI, 2005; PILLAR, 2006; SILVA, 2009).

2.2. GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO: UMA FERRAMENTA PARA DELINEAR ESTUDOS DE RESTAURAÇÃO DE HÁBITATS

Quando abordamos estudos em áreas que abrigam espécies endêmicas, há uma cautela com relação a tratativa dos dados, pois procura-se entender quais seriam as melhores estratégias a serem tomadas para conservação daquele ecossistema e suas espécies que já não são generalistas. Sendo assim, o campo emergente da genética da conservação, que é uma síntese da ecologia da restauração e da genética populacional, busca minimizar os impactos causados pela degradação. A Genética da Conservação direciona atividades que contribuem para 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 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), pois todos estes fatores contribuem ou não para o sucesso ou extinção de espécies.

Logo, ao analisarmos os dados genéticos de uma espécie em questão, é possível compreender a distribuição e a abundância de genótipos e alelos em populações naturais, bem como os fatores que moldam as suas frequências (LEWONTIN, 2004; FREELAND, 2005). Diante disso, os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados, para o melhor entendimento das informações sobre os padrões de fluxo gênico, o grau de isolamento e a distribuição da diversidade genética dentro e entre populações (SUNNUCKS, 2000). Assim também, é por meio dos dados genéticos obtidos pela aplicação de marcadores moleculares, que podemos avaliar o *status* genético de uma espécie, o que nos permite acessar os índices de diversidade e estrutura genética, elucidando os reais riscos de ameaça (FELICIANO *et al.*, 2022).

Ainda sobre os dados genéticos populacionais, a estrutura genética espacial das populações é outro importante parâmetro pois fornece informações que contribuem para a definição de técnicas de manejo e estratégias de amostragem, o que possibilita maximizar a diversidade populacional a ser conservada (SHAPCOTT, 1995; MYAMOTO *et al.*, 2002). De acordo com Diniz-Filho e Telles (2002), uma análise de autocorrelação espacial pode ser útil para definir unidades operacionais

intraespecíficas para conservação da variabilidade genética. O autocorrelograma espacial descreve as fontes de variação na estrutura espacial, mostrando as correlações significativas (dados genéticos e dados em distância geográfica) que determinam em qual classe de distância as populações se tornam geneticamente independentes. Isso significa que, em possíveis planos de restauração, a fim de diminuir os esforços necessários para se recrutar a maior parte da variação genética existente na espécie, pode ser útil priorizar apenas as classes de distância significativas, evitando assim uma redundância do *pool* gênico da amostragem (DINIZ-FILHO; TELLES, 2002; DINIZ-FILHO; TELLES, 2006).

Conseqüentemente, as alterações na distribuição espacial dos indivíduos de uma população podem afetar negativamente o *fitness* populacional, por modificar a taxa e a dinâmica dos cruzamentos (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). 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, que levados à homozigose em determinados *loci*, acaba resultando em genótipos com baixo potencial adaptativo ou com baixa taxa de sobrevivência (FREELAND, 2005). 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; CUNHA, 2012), o tamanho efetivo populacional (N_e) (WRIGHT, 1969) constitui um importante estimador para estratégias de conservação *in situ* das espécies.

A conservação *in situ* – conservação dos habitats e ecossistemas com suas populações naturais (COCHRANE, 2004) – ainda é o melhor método de conservação de espécies. Contudo, a conservação *ex situ* – conservação de uma espécie fora do seu ambiente natural é uma alternativa provisória para a manutenção das mesmas (PRANCE, 2004), e pode fornecer subsídios para as medidas *in situ*, por aumentar o conhecimento das técnicas de regeneração, proteger o material genético e ser fonte de propágulos para os futuros planos de reintroduções (VOLIS; BLECHER, 2010; GODEFROID *et al.*, 2011). Os métodos de conservação *ex situ* incluem uma grande variedade de técnicas, que diferem na intensidade do manejo, no investimento de recursos e laboratórios, e nos níveis potenciais de modificações genéticas da espécie.

Entre eles, estão os bancos de sementes, criopreservação, culturas *in vitro*, casas de vegetação, cultivo em jardins, coleções vivas de material genético (*field gene banks*), entre outros (PRANCE, 2004; VOLIS; BLECHER, 2010).

Para executar uma estratégia efetiva de recuperação das espécies em risco de extinção, é necessário que ocorra uma integração entre a conservação *ex situ* e *in situ*. Isto envolve identificar e combater as ameaças, determinar a estrutura genética da população e estudar a demografia, ecologia e biologia reprodutiva da espécie em questão, principalmente quando o ambiente apresenta características específicas (LLOYD *et al.*, 1992; COCHRANE, 2004; GUERRANT, 2007), como é o caso dos afloramentos rochosos de basalto do estado do Paraná. Um exemplo dessa interação também foi abordado em um estudo da quebra da dormência de três tipos de sementes de espécies endêmicas e ameaçadas de afloramentos rochosos nos EUA. O estudo combinou as estimativas de diversidade genética e o sucesso da quebra de dormência das sementes, obtendo assim bons resultados para reintrodução dessas plantas (ALBRECHT *et al.*, 2012).

O principal objetivo de um programa de reintrodução é formar populações resilientes e autossustentáveis, que apresentem diversidade genética o suficiente para resistir às mudanças evolutivas (GUERRANT, 2007). Após a escolha dos locais de reintrodução com base em atributos biológicos, logísticos, históricos e genéticos, ainda deve-se decidir quantos indivíduos introduzir, qual estágio de propagação introduzir e quais tratamentos de manejo e cuidados posteriores são necessários para garantir que uma população sobreviva, incluindo o monitoramento da reprodução e recrutamento da próxima geração (DINIZ-FILHO; TELLES, 2006; DRAPER *et al.*, 2019). Para isto, o uso de mais de um tipo de técnica aumenta a probabilidade de sucesso do programa, e, quando possível, deve-se utilizar na reintrodução vários estágios de desenvolvimento (sementes, plântulas, jovens e adultos) (GUERRANT, 2012). Assim, as estratégias de conservação de plantas raras e endêmicas, as quais combinam proteção de hábitat com o armazenamento de material genético em bancos de sementes (*ex situ*) e aplicação das técnicas *ex situ*, se faz necessária para manter as coleções que servem como material fonte para a reintrodução de espécies em áreas onde uma espécie foi extinta ou mesmo para reforçar o tamanho e a produção de descendência de pequenas populações (HOWALD, 1996; MAUNDER *et al.*, 2004, GODEFROID *et al.*, 2016). Portanto, a restauração de um ecossistema, bem como a recuperação de uma espécie na natureza consiste num processo complexo,

prolongado e oneroso, pois há necessidade de um período de monitoramento, principalmente para as espécies que demoram a alcançar a maturidade reprodutiva (COCHRANE, 2004).

A reintrodução de plantas é eficiente para conservação de espécies ameaçadas. No entanto, a viabilidade a longo prazo dessas reintroduções ainda é discutida (GODEFROID *et al.*, 2016). Sendo assim, para que a técnica seja eficiente, é necessária uma maior integração com o gerenciamento do hábitat e a consolidação das estratégias da conservação *ex situ* e *in situ* (VOLIS; BLECHER, 2010). Considerando hábitats como os afloramentos rochosos, que não são vistos como detentores de biodiversidade (OVERBECK *et al.*, 2006), se faz cabível a aplicação, a priori, das técnicas de conservação *in situ* (ALBRECHT *et al.*, 2012; SERROTE *et al.*, 2019) das espécies endêmicas e ameaçadas de extinção que estão mais suscetíveis às pressões ambientais (LOYOLA *et al.*, 2014).

Para isso, se faz necessária a aplicação de marcadores moleculares para estimar os parâmetros genéticos, e assim, propor técnicas para reintrodução (COCHRANE, 2004) e definir as áreas prioritárias para futuros planos restauração (DINIZ-FILHO; TELLES, 2002; DINIZ-FILHO; TELLES, 2006), dando visibilidade à flora que se encontra ameaçada e incentivando a comunidade científica e a sociedade em geral a conhecerem os hábitats que precisam ser preservados.

2.2.1. Métodos Para Preservação De Áreas Degradadas

A criação e gestão efetiva das áreas de proteção ambiental é uma das principais formas de promoção da conservação da biodiversidade *in situ* (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Inclui-se nesta abordagem a conservação de espécies ameaçadas de extinção, especialmente em formações altamente modificadas, como é o caso dos Campos de Altitude do Sul do Brasil, que podem ser considerados prioritários para conservação, visto que exibem uma flora específica (IGANCI *et al.*, 2011), e possuem muitas espécies que além de endêmicas aos afloramentos rochosos, se encontram em alguma categoria de ameaça, elevando a importância de preservação dessas áreas (FERRAZ, 2016).

As ações antrópicas que causam a perda e modificação de hábitats, bem como as alterações climáticas, podem refletir em diferentes perturbações sobre as espécies, interferindo na sua capacidade adaptativa e influenciando as taxas de

extinção (MMA, 2007). Nesse sentido, entende-se que alterações em quaisquer dos constituintes da natureza, como relevo, solo, vegetação, clima, recursos hídricos, entre outros, podem modificar a funcionalidade de todo o sistema, causando um desequilíbrio ecológico (SPORL; ROSS, 2004). Conseqüentemente, as áreas exploradas sobre os afloramentos do Paraná, podem ser consideradas ainda mais vulneráveis, devido a redução do tamanho populacional das espécies de áreas degradadas ou mesmo pela redução de áreas aptas para sua ocorrência natural, aumentando os riscos de extinção (GIAM *et al.*, 2010).

Como alternativa para proteção dos afloramentos rochosos de basalto do Paraná, poderíamos enquadrá-los nos atributos das Áreas Estratégicas para Conservação da Biodiversidade, pois estas seriam áreas cujos remanescentes florestais nativos ou outros atributos físicos ou biológicos determinariam fragilidade ambiental, sendo consideradas de relevância, e sua conservação necessária para a garantia da manutenção da biodiversidade no Paraná (SEMA/IAT, 2009). Além de abrigarem flora particular, endêmica e com ocorrência de várias espécies ameaçadas de extinção.

Outra modalidade para a inclusão dos afloramentos em área de proteção, seriam as Áreas Estratégicas para Recuperação, que são aquelas essenciais para a manutenção dos fluxos biológicos, para a formação de corredores ecológicos e manutenção da estabilidade física do ambiente (SEMA/IAT, 2009). Neste caso, podemos ressaltar que os afloramentos já são considerados ilhas terrestres (POREMBSKI, 2007), e sem eles, haveria perda significativa da flora e do hábitat original. Os resultados apresentados por Feliciano e colaboradores (2022) indicam uma adaptação local da espécie *P. hatschbachii* em ambientes específicos, como afloramentos, onde a espécie é endêmica. Isso sugere que, devido a essa adaptação, a conservação efetiva da espécie exigiria a preservação de toda a área onde ela ocorre, implicando na proteção direcionada de cada localidade. No entanto, à medida que mais dados são coletados, revelando ameaças crescentes para diversas espécies, considerar a conservação de pelo menos uma das áreas de distribuição pode ser uma estratégia viável, permitindo a preservação de uma amostra desse ambiente negligenciado.

Neste sentido, devemos identificar as áreas de maior importância biológica, de maior relevância para restauração, e divulgar os dados obtidos à comunidade científica e aos órgãos competentes para que haja a gestão efetiva dessas áreas do

Paraná, por meio da criação de Unidades de Conservação ou mesmo RPPNs (Reserva Natural do Patrimônio Rural), de acordo com o Decreto Estadual 1.529, de 02 de outubro de 2007, com respaldo técnico embasado no planejamento de paisagens sustentáveis. Neste estudo, podemos identificar áreas de maior importância, com maior nível de remanescentes de vegetação nativa e com maiores índices de diversidade genética, fazendo um levantamento de qual área abrange o maior pool gênico das espécies, para que grande parte da amostragem genética possa se manter preservada.

2.3. FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae (Leguminosae) possui distribuição cosmopolita, incluindo aproximadamente 730 gêneros e cerca de 20.000 espécies. Seus representantes possuem elevada importância econômica devido as aplicações em culturas forrageiras, reflorestamento, ornamentação, atributos medicinais, utilização nas indústrias químicas, farmacêutica e cosmética (LEWIS *et al.*, 2005; SOUZA; LORENZI, 2008). Curiosamente, o Pau-Brasil (*Paubrasilia echinata* (Lam.) Gagnon, H. C. Lima & G. P. Lewis), uma espécie nativa da Mata Atlântica, considerada por lei como árvore símbolo do país (Lei 6607 de 07/12/1978), está circunscrito nesta família. Além disso, as mais diversas e importantes culturas, que são imprescindíveis para a economia do país e que têm um papel fundamental na alimentação humana, como o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e a soja (*Glycine Max* L. Merr.), considerados uma fonte de proteína completa (MYERS; KMIECIK, 2017), são encontrados nesta família.

A família Fabaceae, composta por espécies anuais ou perenes, eretas, prostradas, difusas, trepadeiras, lianas, subarbustos, arbustos e árvores de pequeno, médio ou grande porte (LEWIS, 1987), foi dividida em três subfamílias com base principalmente no tipo de simetria floral e de prefloração da corola: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (LEWIS *et al.*, 2005). No entanto, uma nova classificação filogenética da família, reconhece seis subfamílias: Caesalpinioideae DC., Cercidoideae Legume Phylogeny Working Group (stat. Nov.), Detarioideae Burmeister., Dialioideae Legume Phylogeny Working Group (stat. Nov.), Duparquetioideae Legume Phylogeny Working Group (stat. Nov.) e Papilionoideae DC. A subfamília Mimosoideae tradicionalmente reconhecida é um clado distinto, alocado dentro de Caesalpinioideae e é referido informalmente como o clado

mimosoide (LPWG, 2017).

No Brasil, são encontrados cerca de 188 gêneros e 2.100 espécies (LIMA, 2000). Mimosoide possui aproximadamente 78 gêneros e 3270 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais sendo encontradas desde as florestas até regiões desérticas, porém mais bem adaptadas a florestas de terras baixas.

2.3.1. Gênero *Mimosa* L.

O gênero *Mimosa* L., constituído por aproximadamente 530 espécies, circunscrito na família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae, baseia-se nas características do androceu como a primeira classificação mais consistente do grupo, avaliando o número de estames e presença de glândula no ápice do conectivo, como também na presença de endosperma na semente e em caracteres dos frutos (BARNEBY, 1991). As plantas descritas no gênero *Mimosa* L. possuem características notáveis, como o uso em ornamentações, bem como na indústria madeireira, na utilização da extração de compostos secundários com propriedade medicinal (ELIAS, 1981; LORENZI, 1992, 1998), entre outros. As espécies são abundantes nos trópicos e se estendem até as regiões temperadas, ocupando diferentes tipos de ambientes, desde florestas até desertos (BARNEBY, 1991). Devido à riqueza de espécies, o gênero *Mimosa* ainda é subdividido em seções, desta forma, Barneby (1991), dividiu o gênero em cinco seções, baseado principalmente na presença ou ausência de nectários extraflorais na raque foliar, nos tipos de tricomas e em características florais como o número de pétalas e estames, sendo elas: *Mimosa* sessão. *Mimadenia*, *Mimosa* sessão. *Batocaulon*, *Mimosa* sessão. *Calothamnus*, *Mimosa* sessão. *Habbasia* e *Mimosa* sessão. *Mimosa*.

No Brasil, são descritas aproximadamente 345 espécies para o gênero *Mimosa* (BARNEBY, 1991; DUTRA; MORIM 2012), sendo os maiores centros de diversidade para o grupo registrados no centro-oeste brasileiro (BARNEBY, 1991; LEWIS *et al.*, 2005; SIMON *et al.*, 2011). Tais espécies estão distribuídas nas Savanas brasileiras, em áreas de altitudes elevadas como por exemplo na Chapada dos Veadeiros (GO), na Cadeia do Espinhaço (MG), no Distrito Federal e na Chapada dos Guimarães (MT).

O gênero *Mimosa* caracteriza-se por apresentar autoincompatibilidade,

mas há exceções, como por exemplo *Mimosa scabrella* Benth (bracatinga), que tem sua ocorrência nas regiões sul e sudeste do Brasil, com um sistema misto de reprodução (SOBIERAJSKI *et al.*, 2006). Segundo Barneby (1991), os diásporos podem ser levados pelo vento, água ou simplesmente caírem no solo próximo à planta mãe, ou as sementes serem consumidas por aves e, posteriormente, excretadas intactas, o que sugere não haver um mecanismo especializado de dispersão de sementes. Além disso, muitas espécies de *Mimosa* possuem frutos com acúleos e/ou tricomas rígidos que podem atuar como ganchos se fixando nos pelos de pequenos mamíferos e serem carregados por eles (BARNEBY, 1991). Algumas espécies do gênero *Mimosa* são popularmente conhecidas como dormideiras, devido à curiosa capacidade das folhas em se fecharem durante a noite (nictinastismo), ou quando são tocadas (tigmonastismo). Esta última característica faz com que algumas espécies como por exemplo, *Mimosa pudica* L., sejam comercializadas como “pet plants”. Vale ressaltar também que, *Mimosa pigra* L. é uma das espécies mais agressivas como invasoras de culturas (LOWE *et al.*, 2000; SIMON, 2011). Entretanto, outras espécies são consideradas relevantes economicamente, como *Mimosa bimucronata* (DC.) Kuntze, utilizada como cerca viva ou na arborização urbana, e *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth., cuja madeira é utilizada para marcenaria e produção de carvão e lenha. Além disso, outras espécies são utilizadas para reflorestamento de áreas degradadas por apresentarem rápido crescimento, como é o caso de *Mimosa scabrella* Benth (LORENZI, 1992, 1998).

Um alto nível de endemismo é descrito para o gênero *Mimosa*, sendo muito provável que novas espécies ainda venham a ser descobertas (BARNEBY, 1997; MORALES *et al.*, 2014). *Mimosa hatschbachii* Barneby é uma espécie endêmica edáfica do estado do Paraná, incluída no Livro Vermelho da Flora do Brasil como “Em perigo” (EN) de extinção (DUTRA; MORIM, 2012; MARTINELLI; MORAES, 2013). Essa espécie é conhecida a partir de apenas três localidades do Paraná (Guarapuava, Candói e Cantagalo) (Figura 1) (CNCFlora, 2012). Sua área de ocorrência são afloramentos de origem basáltica, que se distribuem descontinuamente ao longo do Terceiro Planalto Paranaense, que também são considerados ilhas terrestres, ou *inselbergs* (POREMBSKI, 2007), devido a particularidade de se encontrarem isolados geograficamente e ecologicamente, o que, para uma espécie já categorizada como “Em perigo”, pode ser considerada ainda mais ameaçada, somado à degradação do hábitat.

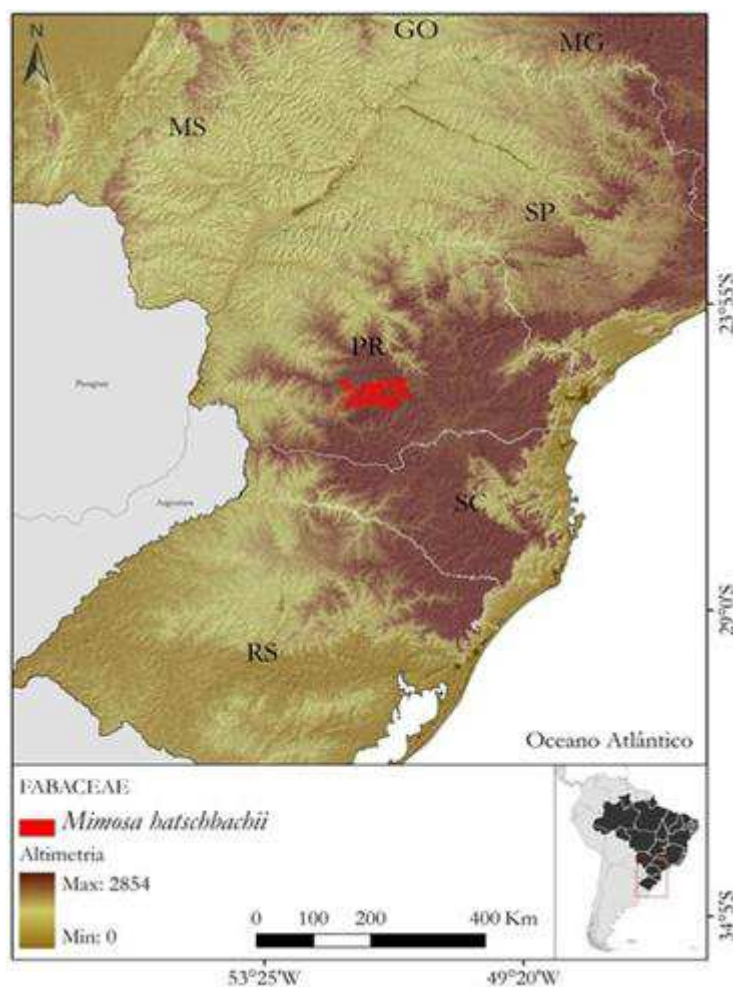


Figura 1. Mapa da área de distribuição de *Mimosa hatschbachii*, conforme dados do CNCFlora (2012).

Ainda que os mecanismos de dispersão descritos para o gênero possam garantir a disseminação das espécies, a extensão de ocorrência (EOO) de *M. hatschbachii* tem sofrido declínio constante, pois a qualidade do hábitat tem sido severamente afetada, tanto pela antropização como pela presença de monoculturas de espécies exóticas, popularmente usadas na região (MARTINELLI; MORAES, 2013). Os ambientes que compõem os Campos de Altitude do Sul do Brasil e encontram-se inseridos no Bioma Mata Atlântica, em altitudes superiores a 600m, sendo importante ressaltar que nenhuma dessas áreas de ocorrência encontra-se inseridas em Unidades de Conservação (UCs), fato este que implica diretamente no *status* de vulnerabilidade de *M. hatschbachii*. Além do endemismo, a especificidade de hábitats, caracterizada na sua maioria por populações pequenas (poucos números de indivíduos), torna a espécie ainda mais suscetível à ameaça de extinção (MENDONÇA; LINS, 2000; SIMON; PROENÇA, 2000; DUTRA; GARCIA, 2014).

2.3.2. Gênero *Stylosanthes* Sw.

O gênero *Stylosanthes* descrito na subfamília Papilionoideae da família Leguminosae ou Fabaceae se destaca entre as leguminosas forrageiras, devido a sua ampla adaptação incluindo resistência às pressões bióticas e abióticas (CAMERON & CHAKRABORTY, 2004). As espécies desse gênero são cultivadas em todo o mundo e utilizadas como pastagens, na recuperação e restauração de terras, na estabilização e regeneração do solo, sendo particularmente aplicadas em regiões com baixa precipitação (BARCELLOS *et al.*, 2001). A maioria das espécies é perene e, devido ao potente sistema radicular, são tolerantes à seca, possuindo grande capacidade de colonização por se adaptar em solos de baixa fertilidade (ANDRADE & KARIA, 2000). O sistema de reprodução dessas plantas é preferencialmente autogâmico, com taxa de polinização cruzada da ordem de 2 % a 6 % em condições naturais (STACE, 1984).

O gênero *Stylosanthes* inclui aproximadamente 50 espécies com muitas subespécies e variedades botânicas ocorrendo nos trópicos e subtropicais, sendo a maioria encontrada nos Neotrópicos (LEWIS *et al.*, 2005). O Brasil é o centro de diversidade do gênero, com cerca de 30 espécies, sendo 12 espécies endêmicas (STACE & EDYE, 1984; SANTOS-GARCIA *et al.*, 2012). Os estados brasileiros do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Paraná são especialmente ricos em espécies e ecótipos, sendo o Paraná, o estado que abriga uma variabilidade considerável de espécies de *Stylosanthes*, por apresentar uma transição entre as regiões climáticas tropicais e subtropicais (COSTA & VALLS, 2010).

A espécie *Stylosanthes vallsii* Sousa Costa & Van den Berg também é uma planta endêmica do Paraná, e recebeu este nome em homenagem ao pesquisador José Francisco Montenegro Valls da EMBRAPA-CENARGEN, reconhecido por seus estudos em gramíneas, em particular as brasileiras tropicais e subtropicais (SOUSA COSTA & C. VAN DEN BERG, 2009). *Stylosanthes vallsii* é morfologicamente semelhante a *Stylosanthes maracajuensis* Sousa Costa & Van den Berg e *Stylosanthes leiocarpa* Vogel e possui área de ocorrência restrita aos municípios de Guarapuava-PR e Cândói-PR. Encontrada em ambientes de 1060 m de altitude, em média, seja como plantas isoladas ou em populações densas, a espécie cresce em solos rasos de origem basáltica, com musgo e gramíneas curtas associadas (SOUSA COSTA & C. VAN DEN BERG, 2009). *Stylosanthes vallsii* também foi avaliada quanto ao seu estado de conservação por Ferraz (2016), seguindo os critérios da International

Union for Conservation of Nature (IUCN, 2001), como por exemplo a distribuição geográfica, a qualidade do habitat, redução do tamanho populacional, tamanho da população (acompanhamento desde 2016), que enquadrou a espécie na categoria “Em Perigo” (EN) de extinção.

As informações sobre sua categorização de risco de extinção baseada na distribuição e/ou status populacional, não foram avaliadas pelo CNCflora.

2.4. FAMÍLIA SOLANACEAE

A família Solanaceae é uma família subcosmopolita com aproximadamente de 150 gêneros e cerca de 3000 espécies. O principal centro de endemismo e diversidade taxonômica, é apontado para a América do Sul, contendo o maior número de espécies e gêneros de Solanaceae (SILVA, 2020; SILVA *et al.*, 2022). No Brasil, são descritos cerca de 31 gêneros e aproximadamente 500 espécies nativas. Destes, 23 gêneros e cerca de 180 espécies nativas fazem parte da flora da região Sul e 16 gêneros e 313 espécies fazem parte da região Sudeste (SOARES, 2008). Diversos membros da família Solanaceae, são considerados importantes fontes alimentares e muito utilizados na medicina popular para o tratamento de uma série de doenças, como as respiratórias, oftalmológicas, ou para obtenção de moléculas para medicamentos da doença de Parkinson, quadros espasmódicos e anti-inflamatórios, sendo também utilizadas nas ornamentações casuais e das vias urbanas (VAZ, 2008; GIACOMIN, 2010; SZABO, 2015).

2.4.1. Gênero *Nierembergia* Ruiz & Pav

O gênero *Nierembergia* Ruiz & Pav. pertence à família Solanaceae Juss., tribo Nicotianeae G. Don. e à subtribo Nierembergiinae Hunz. (D'ARCY, 1991; HUNZIKER, 2001), composto por ervas ou arbustos, eretos ou prostrados, anuais ou perenes, com até 1,6 m de altura, considerado um gênero exclusivamente americano, com 20 espécies na América do Sul e uma no México. A Argentina é considerada o centro de diversificação, com 15 espécies (HUNZIKER, 2001; WAECHTER, 2002). Com base em dados filogenéticos, Olmstead e colaboradores (1999) propuseram a transferência de *Nierembergia*, da subfamília Cestroideae, para a subfamília Petunioideae. Os gêneros *Bouchetia* e *Nierembergia* são morfologicamente muito próximos, principalmente no que se refere à corola, constituindo ambos a subtribo

Nierembergiinae. Há outras características relevantes entre estes dois gêneros como por exemplo a estrutura dos tricomas glandulares que revestem ramos, folhas, cálice e corola, devendo destacar a morfologia das linhas de orientação da corola, que em *Bouchetia anomala* (Miers) Britton & Rusby, por exemplo, conduzem para o nectário e em *Nierembergia* desempenham a função de orientação para a região secretora de óleo, sendo considerado o único gênero da família com a característica (COCUCCI, 1991; ALEMANY, 1985; COSA DE GASTIAZORO, 1991). Logo, quando falamos dos visitantes florais, os mesmos recolhem óleos não voláteis (encontrados na superfície interna do limbo da corola, em uma estrutura denominada elaióforos), ao invés de néctar ou pólen. Algumas espécies do gênero são polinizadas por abelhas fêmeas de espécies dos gêneros *Chalepogenus* e *Tapinotaspis* (COCUCCI, 1991, 1999). Outra característica importante do gênero, pode ser observada nas espécies *N. riograndensis* Hunz. & A.A. Cocucci e *N. linariifolia* Graham, conhecidas pela sua toxicidade, pois possuem substâncias letais para os animais, consistindo em grave problema econômico para a agropecuária (SACCO *et al.*, 1982; BUSCHI & POMILIO, 1987; TOKARNIA *et al.*, 2000; RIET-CORREA & MEDEIROS, 2001; HUNZIKER, 2001).

Nierembergia hatschbachii A. A. Cocucci & Hunz (Fig. 1) circunscrita no gênero *Nierembergia* é endêmica dos Campos de Cima da Serra, tendo seus registros de ocorrência conhecidos em apenas duas localidades (Guarapuava e Cantagalo), no Paraná (REFLORA, herbário virtual). A partir de novas coletas registramos mais seis localidades de ocorrência, no entanto as informações sobre sua categorização de risco de extinção baseada na distribuição e/ou status populacional, não foram avaliadas pelo CNCflora.

2.5. FAMÍLIA APIACEAE

A família Apiaceae Lindl., considerada cosmopolita e abundante em áreas montanhosas temperadas, possui cerca de 450 gêneros e aproximadamente 3.700 espécies, subscritas em quatro subfamílias: Apioideae Lindl., Saniculoideae Drude, Mackinlayoideae G.M. Plunkett & Lowry e Azorelloideae G.M. Plunkett & Lowry (PIMENOV & LEONOV, 1993; PLUNKETT *et al.*, 2004; CORRÊA & PIRANI, 2005; NICOLAS & PLUNKETT, 2014). Esta família é caracterizada por possuir aplicações econômicas relativamente importantes, como por exemplo o uso de suas plantas no

preparo de condimentos, perfumaria, essências de bebidas alcoólicas, além de serem fontes de produção de gomas e resinas para uso medicinal, na fabricação de sedativos, antiespasmódicos, estimulantes, e curiosamente até mesmo como veneno (CORRÊA & PIRANI, 2005).

2.5.1. Gênero *Eryngium* L.

O Gênero *Eryngium*, circunscrito na família Apiaceae Lindl, é composto de espécies herbáceas que colonizam os mais diversos substratos, contemplando ambientes terrícolas, rupícolas e aquáticos, e cuja distribuição percorre as regiões temperadas de todos os continentes (CALVIÑO *et al.*, 2008). *Eryngium* é considerado o maior gênero da família Apiaceae, com aproximadamente 220 espécies, das quais 100 são nativas das Américas (CORRÊA & PIRANI, 2005; CALVIÑO *et al.*, 2008; WÖRZ, 2011). No Brasil, são descritas cerca de 60 espécies que se distribuem por todos os estados, tendo o Paraná registrado a ocorrência de 27 espécies (CORRÊA & PIRANI, 2005; FIASCHI & COTA, 2017). A região Sul é, inclusive, considerada centro de diversidade de *Eryngium* (TURMEL, 1948). O gênero exibe grande variação, apresentando espécies desde ervas prostradas com apenas alguns centímetros, à espécies eretas que podem chegar até 3 metros de altura (MATHIAS *et al.*, 1972; CALVIÑO *et al.*, 2008). As espécies do gênero *Eryngium* podem ser diferenciadas de outros membros de Apiaceae pelas inflorescências do tipo capítulo e por possuírem uma única bráctea por flor, com as inflorescências podendo ser brancas, azuis ou roxas (MATHIAS *et al.*, 1972).

Eryngium corallinum também conhecida pelo nome popular de "caraguatá-coralino" e "eríngio" (MATHIAS *et al.*, 1972) é uma espécie campestre, que se distribui restritamente nos afloramentos de Santa Catarina e Paraná (CNCFlora, 2012) (Figura 2), em altitudes de 900 e 1000 m, no bioma Mata Atlântica (MATHIAS *et al.*, 1972). Considerada uma espécie "Rara, na lista de espécies ameaçadas de extinção da flora do Paraná (SEMA/GTZ, 1995). Dados de coleta revelam que das sete populações identificadas de *E. corallinum*, seis estão localizadas no Paraná, enquanto apenas uma se encontra em Santa Catarina, no extremo de sua distribuição geográfica (CNCFlora, 2012). No Paraná, a espécie tem sido regularmente coletada desde o ano de sua descrição em 1958. No entanto, em Santa Catarina, a população não foi amostrada desde 1964. A vegetação de Campo Erê (localidade tipo de *E. corallinum*),

foi suprimida e convertida em áreas agrícolas, que pode ter extinto estas populações (Ferraz, dados não publicados).

Eryngium corallinum se assemelha à *Eryngium ramboanum* Mathias & Constance, diferindo-se pelas folhas menores e pinatífidas, o caule e pedúnculos mais finos, as sépalas, brácteas e bractéolas menores, e papilas do fruto mais finas (MATHIAS; CONSTANCE, 1958). O habitat de ocorrência, severamente degradado e explorado pela expansão das atividades agrícolas e pecuárias, destacando as monoculturas de soja e plantações de *Pinus* sp, contribuíram para o declínio na extensão de ocorrência (EOO), bem como na área de ocupação (AOO), sendo inferior a 10 km². Tal fato, pode sugerir que *E. corallinum* venha ser extinta em pelo menos um dos locais em que foi registrada, conforme dados de coletadas amostrados (CNCFlora, 2012).

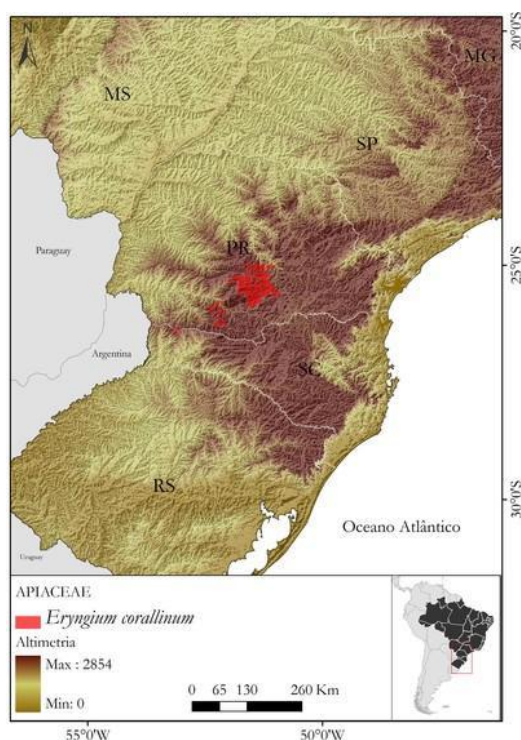


Figura 2. Mapa da área de distribuição de *Eryngium corallinum*, conforme dados do CNCFlora (2012).

3. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS

3.1. GERAL

O presente trabalho tem como objetivo verificar o *status* de conservação genética de populações das espécies endêmicas: *Mimosa hatschbachii* Barneby, *Nierembergia hatschbachii* A.A. Cocucci & Hunz, *Stylosanthes vallsii* Sousa Costa & Van den Berg e *Eryngium corallinum* Mathias & Constance, distribuídas pelo Paraná, a partir da aplicação de marcadores moleculares e assim contribuir para o estabelecimento de possíveis áreas prioritárias de conservação em futuros planos de manejo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar os índices de diversidade e estrutura genética de 11 populações de *M. hatschbachii*, por meio da aplicação dos marcadores AFLP, ITS e *rps16-trnK*;
- Estimar os índices de diversidade e estrutura genética de 6 populações de *N. hatschbachii*, *S. vallsii* e *E. corallinum*, por meio da aplicação dos marcadores AFLP;
- Elucidar os mecanismos evolutivos que possam estar atuando no padrão da distribuição da variabilidade genética das espécies;
- Fornecer informações que possam contribuir para a elaboração de futuros planos de manejo para os afloramentos rochosos do estado do Paraná.

4. BIBLIOGRAFIA

- ALBRECHT, Matthew A. *et al.* Seed germination ecology of three imperiled plants of rock outcrops in the southeastern United States^{1, 2}. **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 139, n. 1, p. 86-95, 2012.
- ALMEIDA, J.A. (2009) Fatores Abióticos. *In: Boldrini. Biodiversidade dos Campos do Planalto das Araucárias*. Brasília, MMA, pp. 19–38.
- APRIGIO, Nicollas Gabriel *et al.* DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL DA ESPÉCIE ENDÊMICA DO PARANÁ ZEPHYRANTHES PARANAENSIS. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 2, p. 12-12, 2021.
- AVISE, John C. *et al.* **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard university press, 2000.
- BARNEBY, Rupert C. *et al.* **Sensitivae Censitae: a description of the genus Mimosa Linnaeus (Mimosaceae) in the New World**. 1991.
- BARROS, Michel JF *et al.* Environmental drivers of diversity in Subtropical Highland Grasslands. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 17, n. 5, p. 360-368, 2015.
- BAWA, Kamaljit S.; ASHTON, Peter S.; NOR, S. Mohd. Reproductive ecology of tropical forest plants: management issues. **Reproductive ecology of tropical forest plants**, p. 2-13, 1990.
- BEHLING, H., PILLAR, V.P., ORLÓCI, L. & BAUERMANN, S.G. Late Quaternary Araucaria forest, grassland (Campos), fire and climate dynamics, studied by high-resolution pollen, charcoal and multivariate analysis of the Cambará do Sul core in southern Brazil. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 203: 277-297, 2004.
- BIFFI, V.H.R & PAISANI, J.L. Reconstrução morfoestratigráfica e evolução de encosta em unidade de relevo de baixa ordem no Quaternário Superior: o caso da Superfície de Cimeira de Pinhão/Guarapuava - Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Geomorfologia** 22: 656-681, 2021.
- BOLDRINI, I.I., EGGERS, L., MENTZ, L.A., MIOTTO, S.T.S., MATZENBACHER, N.I., LONGHI-WAGNER, H.M., TREVISAN, R., SCHNEIDER, A.A. & Setúbal, R.B. (2009) Flora. *In: Boldrini, I. (Ed.) Biodiversidade dos Campos do Planalto das Araucárias*. MMA, Brasília, pp. 39–94.
- BRASIL. Lei 4771/1965. **Código Florestal Brasileiro**. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/ccivil03/leis/L4771.htm>>. Acesso em: 5 mai. 2022.
- 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: 8 jun. 2022.
- 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 Biodiversidad– - DCBio, 2010.

BROQUET, Thomas et al. Genetic bottlenecks driven by population disconnection. **Conservation Biology**, v. 24, n. 6, p. 1596-1605, 2010.

BRZOSKO, E.; WRÓBLEWSKA, A.; RATKIEWICZ, M. Spatial genetic structure and clonal diversity of island populations of la'y's slipper (*Cypripedium calceolus*) from the Biebrza National Park (northeast Poland). **Molecular Ecology**, v. 11, n. 12, p. 2499-2509, 2002.

CARDOZO, A.L., GOLDENBERG, R., FIASCHI, P. & LABIAK, P. *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae) in the state of Paraná, southern Brazil. **Phytotaxa** 507: 1–50, 2021.

CARVALHO P.C.F., PARUELO J. & AYALA W. **Estado Actual y Perspectivas del Bioma Campos. In: Bioma Campos: Innovando para Mantener su Sustentabilidad y Competitividad.** Tradinco, Montevideo, p. 29-40, 2008.

CAVALLI, Suzana Smith et al. Variabilidade genética em populações naturais. **Genética e evolução vegetal**, p. 165-175, 2003.

Cocucci, A.A. 1991. Pollination biology of *Nierembergia* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution** 174: 17–35.

Cocucci, A.A. & Hunziker, A.T. 1993. Estudios sobre Solanaceae XXXV. Novedades en *Nierembergia*. **Lorentzia** 7: 5–15.

CNCFLORA (CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA). In: **Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2.** Disponível em: <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal>>.

CNCFlora. *Eryngium corallinum* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Eryngium corallinum](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Eryngium%20corallinum)>. Acesso em 21 fevereiro 2023.

CONAMA Resolução 423/10. 2010. Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), Brasil. **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. Brasília: Diário Oficial da União.

CONCEIÇÃO, ABEL AUGUSTO; PIRANI, José Rubens. Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: substratos, composição florística e aspectos estruturais. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, p. 85-111, 2005.

CORANDER, Jukka et al. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2008.

- CORANDER, Jukka; MARTTINEN, Pekka. Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. **Molecular ecology**, v. 15, n. 10, p. 2833-2843, 2006.
- COSACOV, A., NATTERO, J. & COCCUCI, A.A. Variation of pollinator assemblages and pollen limitation in a locally specialized system: the oil-producing *Nierembergia linariifolia* (Solanaceae). **Annals of Botany** 102: 723–734, 2008.
- COCHRANE, Anne. Western Australia's ex situ program for threatened species: a model integrated strategy for conservation. **Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild**. Island Press, Washington, p. 40-66, 2004.
- CORANDER, Jukka et al. BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. **Bioinformatics**, v. 20, n. 15, p. 2363-2369, 2004.
- COSTA, N.M.S. & VAN DEN BERG, C. A new species of *Stylosanthes* Sw. (Leguminosae-Papilionoideae) from Paraná, Brazil. **Neodiversity** 4: 9–13. 2009.
- CRAWSHAW, Danielle et al. Caracterização dos campos sul-rio-grandenses: uma perspectiva da ecologia da paisagem. **Boletim Gaúcho de Geografia**, v. 33, n. 1, 2007.
- DA COSTA LC, VALLS JFM. STYLOSANTHES SW. In: Forzza RC, et al., eds. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil vol. 2**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 1090–1091, 2010.
- DE OLIVEIRA, Cícero Diogo Lins et al. Distribuição e Importância das Unidades de Conservação no Domínio Caatinga. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 42, n. 1, p. 425-429, 2019.
- DINIZ FILHO, José Alexandre Felizola; TELLES, Mariana Pires de Campos. Optimization procedures for establishing reserve networks for biodiversity conservation taking into account population genetic structure. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 207-214, 2006.
- DINIZ-FILHO, José Alexandre Felizola; DE CAMPOS TELLES, Mariana Pires. Spatial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations. **Conservation biology**, v. 16, n. 4, p. 924-935, 2002.
- DOYLE, Jeff J.; DOYLE, Jane L. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue**. 1987.
- DRAPER, David; MARQUES, Isabel; IRIONDO, José María. Species distribution models with field validation, a key approach for successful selection of receptor sites in conservation translocations. **Global Ecology and Conservation**, v. 19, p. e00653, 2019.
- DUTRA, Valquiria Ferreira; GARCIA, Flávia Cristina Pinto. Three new species of *Mimosa* sect. *Mimosa* (Leguminosae, Mimosoideae) from the campos rupestres of Minas Gerais, Brazil. **Brittonia**, v. 66, n. 1, p. 33-41, 2014.

DUTRA, V.F. e MORIM, M.P. Mimosa. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>. 2011.FB023084>. Acesso em: 8 jan. 2023.

EHRICH, Dorothee. AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 3, p. 603-604, 2006.

ELIAS, T.S. **Mimosoideae**. In: R.M. Polhill & P.H. Raven (eds.). *Advances in Legume Systematics*. Royal Botanic Garden, Kew, p.143-152, 1981.

EPPERSON, Bryan K. Spatial genetic structure and non-equilibrium demographics within plant populations. **Plant Species Biology**, v. 15, n. 3, p. 269-279, 2000.

EXCOFFIER, Laurent; SMOUSE, Peter E.; QUATTRO, JM1205020. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

EXCOFFIER, Laurent; LAVAL, Guillaume; SCHNEIDER, Stefan. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics**, v. 1, p. 117693430500100003, 2005.

FEDERAL, Senado; DE INFORMAÇÕES, Subsecretaria. DECRETO Nº 5.746, DE 5 DE ABRIL DE 2006. 2006.

FELICIANO, Daniele Cassiano et al. Landscape genetics reveal low diversity and adaptive divergence in *Portulaca hatschbachii* (Portulacaceae): an endangered species endemic to rocky outcrops of the Atlantic Forest. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2022.

FERRAZ, J.R. **Distribuição fitogeográfica e conservação das espécies de plantas vasculares exclusivas do Estado do Paraná, Brasil**. Dissertação (Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina. p. 75. 2016.

FERREIRA, Márcio Elias; GRATTAPAGLIA, Dario. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995.

Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 29 jan. 2023

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to conservation genetics**, Cambridge University Press. 2010.

FRANKS, Steven J. et al. Multi-scale genetic analysis of *Uniolornalateta* (Poaceae): a coastal species with a linear, fragmented distribution. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 9, p. 1345-1351, 2004.

FREELAND, J. R. *Molecular ecology* John Wiley & Sons Ltd. **Chichester, England**, p. 388, 2005.

GIAM, Xingli et al. Future habitat loss and the conservation of plant biodiversity. **Biological Conservation**, v. 143, n. 7, p. 1594-1602, 2010.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Megadiversidade* 1: 52–61. 2005.

GODEFROID, Sandrine et al. How successful are plant species reintroductions?. **Biological Conservation**, v. 144, n. 2, p. 672-682, 2011.

GODEFROID, Sandrine; LE PAJOLEC, Sarah; VAN ROSSUM, Fabienne. Pre-translocation considerations in rare plant reintroductions: implications for designing protocols. **Plant ecology**, v. 217, n. 2, p. 169-182, 2016.

GODOY, Sara Mataroli De et al. 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.

GODOY, Sara Mataroli De et al. Multilocus approach reveals a complex evolutionary history of the invasive mile-a-minute plant, *Mikania micrantha* (Asteraceae), in its natural habitat. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 191, n. 2, p. 188-215, 2019.

GONÇALVES-OLIVEIRA, Rodrigo C. et al. Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): the role of pollination vs. seed dispersal and evolutionary implications. **American Journal of Botany**, v. 104, n. 6, p. 868-878, 2017.

GUERRANT, Edward O. Characterizing two decades of rare plant reintroductions. In: **Plant reintroduction in a changing climate**. Island Press, Washington, DC, p. 9-29, 2012.

GUERRANT JR, Edward O.; KAYE, Thomas N. Reintroduction of rare and endangered plants: common factors, questions and approaches. **Australian Journal of Botany**, v. 55, n. 3, p. 362-370, 2007.

GRAEFF., O. **Fitogeografia do Brasil - Uma Atualização de Bases e Conceitos**. NAU EDITORA, Rio de Janeiro. 552 pp.2015.

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

HIROTA, Márcia M. Monitoramento da cobertura da Mata Atlântica brasileira. **Mata Atlântica: Biodiversidade, ameaças e perspectivas (C. Galindo-Leal & IG Câmara, eds.)**. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo, p. 60-65, 2005.

HOWALD, A. M. Translocation as a mitigation strategy: lessons from California. **Restoring diversity: Strategies for reintroduction of endangered plants**, p. 293-330, 1996.

IGANCI, Joao RV et al. 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, n. 4, p. 378-393, 2011.

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

- JEONG, Ji Hee et al. 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, n. 1, p. 67-76, 2010.
- JOCIENĖ, Lina et al. AFLP-Based Genetic Structure of Lithuanian Populations of Small Balsam (*Impatiens parviflora* DC.) in Relation to Habitat Characteristics. **Forests**, v. 13, n. 8, p. 1228, 2022.
- KAGEYAMA, Paulo Yoshio; GANDARA, Flávio Bertin. Recuperação de áreas ciliares. **Matas ciliares: conservação e recuperação**, 2000.
- KLEIN, R. M. **Aspectos dinâmicos da vegetação do sul do Brasil**. Sellowia, v. 36, n. 36, p. 5-54, 1984.
- KÜLKAMP, Josimar; HEIDEN, Gustavo; IGANCI, João Ricardo Vieira. Endemic plants from the southern Brazilian Highland grasslands. **Rodriguésia**, v. 69, p. 429-440, 2018.
- LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP et al. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, 2017.
- LEIMU, Roosa et al. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation?. **Journal of Ecology**, v. 94, n. 5, p. 942-952, 2006.
- LEME, ELTON MC; RIBEIRO, Otavio B. de C.; MIRANDA, Zenilton De JG. New species of *Dyckia* (Bromeliaceae) from Brazil. **Phytotaxa**, v. 67, p. 9–37–9–37, 2012.
- LEWIS, G. **Legumes of Bahia**. Kew: Royal Botanic Gardens, 369p. 1987.
- LEWIS, Gwilym Peter et al. (Ed.). **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens Kew, 2005.
- 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.
- LLOYD, David G.; SCHOEN, Daniel J. Self-and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. **International journal of plant sciences**, v. 153, n. 3, Part 1, p. 358-369, 1992.
- LONGHI-WAGNER, H.M., WELKER, C.A.D. & WAECHTER, J.L. Floristic affinities in montane grasslands in eastern Brazil. **Systematics and Biodiversity** 10: 537–550, 2012.
- LORENZI, Harri. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 1992.
- LOWE, Sarah et al. **100 of the wor'd's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database**. Auckland: Invasive Species Specialist Group, 2000.
- LOYOLA, Rafael et al. **Áreas prioritárias para conservação e uso sustentável da flora brasileira ameaçada de extinção**. 2014.

MAACK, Reinhard. Geografia Física do Estado do Paraná. 4ª Edição. **Ponta Grossa: Editora UEPG**, 2012.

MACHADO, FÁBIO BRAZ. 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.

MAGNUSSON, William Ernest et al. A linha de véu: a biodiversidade brasileira desconhecida. **Parcerias Estratégicas**, v. 21, n. 42, p. 45-60, 2016.

MARTINELLI, Gustavo; MORAES, Miguel Avila. Livro vermelho da flora do Brasil. 2013.

MARTÍNEZ-NIETO, María Isabel et al. Genetic diversity, genetic structure and phylogeography of the Iberian endemic *Gypsophila struthium* (Caryophyllaceae) as revealed by AFLP and plastid DNA sequences: connecting habitat fragmentation and diversification. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 173, n. 4, p. 654-675, 2013.

MATHIAS, Mildred E.; CONSTANCE, Lincoln. Two New Eryngia (Umbelliferae) from Santa Catarina, South Brazil. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 85, n. 4, p. 255-259, 1958.

MAUNDER, M. (eds.). **Ex situ plant conservation**. California, Island Press. p. 3-20. 2004.

MELO, M.S., MORO, R.S. & GUIMARÃES, G.B. **Patrimônio Natural dos Campos Gerais**. Editora UEPG, Ponta Grossa. 230 pp. 2007.

MENDONÇA, Míriam Pimentel. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Fundação Biodiversitas, 2000.

MEUDT, Heidi M.; CLARKE, Andrew C. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. **Trends in plant science**, v. 12, n. 3, 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.

MMA. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. **Secretaria de Biodiversidade e Florestas (SBF), Ministério do Meio Ambiente (MMA)**. Brasília, 2000.

MM– - Ministério do Meio Ambiente. **Inter-relações entre biodiversidade e mudanças climática– - Recomendações para a integração das considerações sobre biodiversidade na implementação da Convenção– - Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do clima e seu Protocolo de Kyoto**. Brasília, p. 220, 2007.

MORALES, Matías et al. Morphometric and cytogenetic studies in *Mimosa diversipila* (Mimosoideae, Leguminosae) and their taxonomic and evolutionary inferences. **Systematic Botany**, v. 39, n. 3, p. 875-883, 2014.

- MUSEGANTE, Joao Vitor Da R. et al. Geographical distribution of *Dyckia walteriana* (Bromeliaceae), a recently described and endangered species endemic to the Serra Geral formation, southern Brazil. **Phytotaxa**, v. 438, n. 4, p. 263-275, 2020.
- MIYAMOTO, N.; KURAMOTO, N.; YAMADA, H. Differences in spatial autocorrelation between four sub-populations of *Alnus trabeculosa* Hand. -Mazz (Betulaceae). **Heredity**, v. 89, n. 4, p. 273-279, 2002.
- MYERS, Norman et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.
- NATTERO, J., COCCUCI, A.A. & MEDEL, R. Pollinator-mediated selection in a specialized pollination system: matches and mismatches across populations. **Journal of Evolutionary Biology** 23: 1957–1968, 2010.
- NEI, Masatoshi; LI, Wen-Hsiung. 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.
- NEI, Masatoshi. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.
- NIELSEN R.: Slatkin M. **Introduction to Population Genetics, Theory and Applications**, Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press, 2013.
- OLIVEIRA, J. Morales; PILLAR, V. D. Vegetation dynamics on mosaics of Campos and Araucaria Forest between 1974 and 1999 in Southern Brazil. **Community ecology**, v. 5, n. 2, p. 197-202, 2004.
- OLIVEIRA-FILHO, Ary T.; FONTES, Marco Aurélio L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate 1. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 793-810, 2000.
- OVERBECK, Gerhard E. et al. Brazil's neglected biome: the South Brazilian Campos. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 9, n. 2, p. 101-116, 2007.
- OVERBECK, Gerhard Ernst et al. Floristic composition, environmental variation and species distribution patterns in burned grassland in southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 1073-1090, 2006.
- OVERBECK, Gerhard Ernst et al. Placing Brazil's grasslands and savannas on the map of science and conservation. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, p. 125687, 2022.
- PEREIRA-NORONHA, M.R., GOTTSBERGER, I.S. & GOTTSBERGER, G. Biologia floral de *Stylosanthes* (Fabaceae) no Cerrado de Botucatu, estado de São Paulo. **Revista brasileira de biologia** 43: 595–605, 1982.
- PILLAR, V. D. et al. Estado atual e desafios para a conservação dos campos. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre**, p. 24, 2006.
- PILLAR, V. D. Dinâmica da expansão florestal em mosaicos de floresta e campos no sul do Brasil. **Ecossistemas brasileiros: manejo e conservação**, p. 209-216, 2009.

- PLÁ, C. et al. The importance of the Brazilian Subtropical Highland Grasslands evidenced by a taxonomically verified endemic species list. *Phytotaxa* 452 (4): 250-267 (ERRATUM). **Phytotaxa**, v. 454, n. 2, p. 159–160-159–160, 2020.
- 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
- POREMBSKI, Stefan. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. **Brazilian Journal of Botany**, v. 30, p. 579-586, 2007.
- PRANCE, G.T. Introduction. In: Guerrant, E.O.Jr. e Havens, K.; Maunder, M. (eds.). **Ex situ plant conservation**. California, Island Press. 2004.
- QIN, Haining et al. Threatened species list of China's higher plants. **Biodiversity science**, v. 25, n. 7, p. 696, 2017.
- RAMALHO, M. & ROSA, J.F. Ecologia da interação entre as pequenas flores de quilha de *Stylosanthes viscosa* Sw. (Faboideae) e as grandes abelhas *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) *cearensis* Ducke, 1910 (Apoidea, Hymenoptera), em duna tropical. **Biota neotropica** 10: 93–100, 2010.
- REFLORA - HERBÁRIO VIRTUAL. Disponível em: <https://reflora.ibri.gov.br/reflora/herbarioVirtual/> Acesso em 30/1/2023.
- RODERJAN, Carlos Vellozo et al. As unidades fitogeográficas do estado do Paraná, Brasil. **Ciência & Ambiente**, v. 24, n. 1, p. 75-92, 2002.
- SCARANO, Fabio R. Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic rainforest. **Annals of Botany**, v. 90, n. 4, p. 517-524, 2002.
- SCHLUETER, Philipp M.; HARRIS, Stephen A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 2, p. 569-572, 2006.
- SCHÖNSWETTER, Peter; TRIBSCH, Andreas. Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). **Taxon**, v. 54, n. 3, p. 725-732, 2005.
- SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE/DEUTSCHE GESSELLSCHAFT TECHNISCHE ZUSAMMENARBEIT (SEMA/GTZ). Lista Vermelha de Plantas Ameaçadas de Extinção no Estado do Paraná, Curitiba, PR, p.139, 1995.
- SEBBENN, Alexandre Magno; ETTORI, L. C. Conservação genética ex situ de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltroforum dubium* em teste de progênes misto. **Revista do Instituto Florestal**, v. 13, n. 2, p. 201-211, 2001.
- SEMA/IAT. Resolução n. 005 de 2009. **Estabelece e define o mapeamento das Áreas Estratégicas para a Conservação e a Recuperação da Biodiversidade no Estado do Paraná e dá outras providências**. Disponível em: Resolução Sema IAT 05 2009 Áreas Prioritárias | PDF | Conservação (ética) | Biodiversidade (scribd.com).
- SERROTE, Caetano Miguel Lemos; REINIGER, Lia Rejane Silveira; STEFENON, Valdir Marcos. **Simulações em Genética de Populações e Conservação de Recursos Florestais**. Paco Editorial, 2016.

SHAPCOTT, Alison. The spatial genetic structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). **Heredity**, v. 74, n. 1, p. 28-38, 1995.

SHAW, Joey et al. 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, 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**. 2009. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado. Curitiba: UFPR, p. 146, 2009.

SILVA, D.S. & ANDRADES-FILHO, C.O. Uso do fogo nos campos de altitude do sul do Brasil: análise do licenciamento ambiental a partir de geotecnologias. **Revista Brasileira de Meio Ambiente** 9: 146-164, 2021.

SIMON, M. F.; PROENÇA, C. Phytogeographic patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high-altitude centers of endemism? **Biological Conservation**, v. 96, n. 3, p. 279-296, 2000.

SIMON, Marcelo F. et al. The evolutionary history of *Mimosa* (Leguminosae): toward a phylogeny of the sensitive plants. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 7, p. 1201-1221, 2011.

SOBIERAJSKI, G. da R.; KAGEYAMA, Paulo Yoshio; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em nove populações de *Mimosa scabrella* Benth (Leguminosaceae). **Scientia Forestalis**, n. 71, p. 37-49, 2006.

SOLÉ-CAVA, A. M.; CUNHA, H. A. A genética e a conservação da natureza. **Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos**, p. 217-228, 2012.

SUNNUCKS, Paul. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in ecology & evolution**, v. 15, n. 5, p. 199-203, 2000.

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

VELDMAN, J.W., BUISSON, E., DURIGAN, G., FERNANDES, G.W., STRADIC, S.L., MAHY, G., NEGREIROS, D., OVERBECK, G.E., VELDMAN, R.G., ZALOUMIS, N.P., PUTZ, F.E. BOND, W.J. Toward an old-growth concept for grasslands, savannas, and woodlands. **Frontiers in Ecology and the Environment** 13: 154-162. 2015.

VOLIS, Sergei; BLECHER, Michael. Quasi in situ: a bridge between ex situ and in situ conservation of plants. **Biodiversity and conservation**, v. 19, n. 9, p. 2441-2454, 2010.

VOS, Pieter et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic acids research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WRIGHT, S. Evolution and Genetics of Population. V. 4. **Variability Within and Among Natural Populations**. Chicago: Univ. Chicago Press. 590 p. 1978.

WRIGHT, Sewall. **Evolution and the genetics of populations: Vol. 2. The theory of gene frequencies**. 1969.

WYSE JACKSON, P. S.; AKEROYD, J. R. Guidelines to be followed in the design of plant conservation or recovery plans. **Council of Europe, Strasbourg, France**, 1994.

WU, Fu Qin et al. Genetic diversity and population structure of an extremely endangered species: the world's largest Rhododendron. **AoB Plants**, v. 7, 2015.

ZAPPI, Daniela C. et al. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1085-1113, 2015.

5. CAPÍTULO 1

ARTIGO ORIGINAL

Perfil genético de *Mimosa hatschbachii* (Fabaceae) uma espécie ameaçada de extinção e endêmica dos afloramentos rochosos da Mata Atlântica

Daniele Cassiano Feliciano^{1*}, Sara Mataroli de Godoy¹, Claudete de Fátima Ruas¹.

¹ *General Biology Department, Biological Science Center, Universidade Estadual de Londrina, PoBox 10011, 86057-970 Londrina, PR, Brazil*

*Corresponding author. E-mail address: daniele.cassiano@uel.br (D. C. Feliciano)

Running title: Diversidade genética da espécie ameaçada *Mimosa hatschbachii*

Artigo a ser submetido na revista:
Botanical Journal of the Linnean Society
Impact Factor
2.828
5-year Impact Factor
3.922

RESUMO

Mimosa hatschbachii é uma espécie endêmica, em perigo de extinção, associada aos afloramentos rochosos de basalto do Paraná, cuja a estrutura e diversidade genética é pouco conhecida. Presume-se que o fluxo gênico entre suas populações seja prejudicado pelo efeito do isolamento dos afloramentos rochosos, também conhecidos como “ilhas terrestres”. Além disso, esse ambiente se encontra fortemente degradado por diversas ações antrópicas, sem qualquer cuidado de preservação. Neste trabalho estimamos os índices de diversidade genética de *M. hatschbachii* por meio dos marcadores AFLP, ITS e *rps16-trnK*, a fim de verificar o *status* genético. Para tanto, foram coletadas 11 populações, sob toda a área de ocorrência da espécie. Através dos dados obtidos pelos marcadores, *M. hatschbachii* apresenta baixa diversidade, alta estruturação genética e presença de seleção diversificadora atuando nas populações. O fato é que, o isolamento somado a perda de diversidade, seja pela degradação ou efeitos da endogamia, podem comprometer ainda mais o risco de extinção da mesma.

Palavras-chave: AFLP – genética da conservação – genética de populações – ITS – *rps16-trnK*.

INTRODUÇÃO

Mimosa L. é um gênero da Família Fabaceae (subfamília Caesalpinioideae), com aproximadamente 530 espécies distribuídas pelas regiões tropicais do mundo. Algumas espécies do gênero possuem uma característica notável, sendo sensíveis ao toque (tigmonastismo). Outras espécies, entretanto, atuam como invasoras quando se encontram fora do seu hábitat, pois apresentam alta adaptabilidade à diferentes tipos de solo, com rápido desenvolvimento e grande eficiência no uso de recursos, como luz, água e nutrientes (Barneby, 1997). O gênero também possui um alto nível de endemismos (Barneby, 1997; Morales *et al.*, 2014), como pode ser observado, dentre outras espécies, em *Mimosa hatschbachii* Barneby (Fabaceae: Caesalpinioideae), cuja distribuição é restrita aos Campos de Altitude do Sul do Brasil, mais precisamente os que se encontram sobre os afloramentos rochosos basálticos do estado do Paraná (CNCFLORA, 2012). Devido à essa distribuição restrita e em ambientes isolados, a espécie encontra-se “Em perigo de Extinção” (Martinelli & Moraes, 2013). Não obstante, como muitas outras espécies endêmicas dos Campos de Altitude do Sul do Brasil, pouco se sabe sobre *M. hatschbachii*, cujas informações estão limitadas a etiquetas de materiais de herbário.

Os afloramentos rochosos onde *M. hatschbachii* ocorre são ecossistemas formados por rochas ácidas, do tipo Palmas e Chapecó, distribuídos pelo Terceiro Planalto Paranaense (Brasil), e se encontram inseridos no bioma Mata Atlântica (Bellieni *et al.*, 1986; Iganci *et al.*, 2011). Grande parte das suas áreas têm sido utilizada na pecuária, de maneira que a sua vegetação nativa acaba sendo suprimida pela presença de espécies invasoras formadoras de pastagens, como *Pennisetum americanum* e *Urochloa* spp. (Boldrini & Eggers, 1996; Medeiros *et al.*, 2000; Nabinger *et al.*, 2000). Também a extensiva extração de seu substrato rochoso (pedra brita) para utilização na construção civil, pavimentação asfáltica, entre outros, tem submetido as espécies locais a um declínio na qualidade de habitat. Além disso, os afloramentos

rochosos encontram-se isolados geograficamente e ecologicamente, sendo considerados “ilhas terrestres” (inselbergs), o que somado às suas condições topográficas de maiores declives e a zonas de alta vulnerabilidade ambiental pressiona a vegetação local a se adaptar a microclimas seletivos, propiciando o desenvolvimento de endemismos (Porembski *et al.*, 1994; Porembski & Barthlott, 2000; Porembski, 2007).

A descontinuidade e isolamento ecológico desses afloramentos submete as espécies a forte deriva genética, tornando-as mais suscetíveis à perda da diversidade genética, a qual constitui a matéria prima para a adaptação e sobrevivência das espécies frente às variações no ambiente, e consiste em um dos parâmetros mais importantes para o desenvolvimento de estratégias de conservação (Frankham, Ballou & Briscoe, 2010; Jordan *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017). Contudo, além dos níveis de diversidade genética, compreender os processos que moldam a distribuição espacial dessa diversidade e detectar a existência de adaptação local, têm se mostrado fundamentais, pois permitem delinear estratégias mais eficientes de conservação *in situ* e *ex situ*, maximizando a diversidade a ser conservada (Escudero, Iriondo & Torres, 2003; Soares *et al.*, 2008; Telles *et al.*, 2014; Razgour *et al.*, 2019; Wang, 2020; Guan *et al.*, 2021; Wambugu & Henry, 2021; Feliciano *et al.*, 2022). Espécies endêmicas, cujas populações se encontram isoladas, como ocorre com *M. hatschbachii*, tendem a apresentar níveis de diversidade genética reduzidos e alta estruturação no espaço, uma vez que o potencial de polinização é limitado, o que acaba favorecendo maiores taxas de cruzamento biparental e autofecundação (Cavalli & Winge, 2003; Gonçalves-Oliveira *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2018; Godoy *et al.*, 2018; Stone *et al.*, 2019; Ruas *et al.*, 2020; Feliciano *et al.*, 2022).

Desta maneira, estudos voltados para caracterização da diversidade genética e dinâmica populacional das espécies que ocorrem nesses afloramentos são imprescindíveis para o estabelecimento de futuros planos de manejo e conservação dessas áreas, bem como para a proteção das espécies de ocorrência, particularmente as que já se encontram em risco de

extinção como por exemplo, *Portulaca hatschbachii* D. Legrand, *Dyckia walteriana* Leme, *Eryngium corallinum* Mathias & Constance, e *M. hatschbachii* (Martinelli; Moraes, 2013; Feliciano *et al.*, 2022).

Posto isso, e considerando o risco de extinção no qual *M. hatschbachii* se encontra e o grau de degradação do seu habitat, este trabalho teve como objetivos: (1) estimar os índices de diversidade genética e o padrão de distribuição espacial desta, em populações da espécie; (2) investigar a presença de estrutura genética adaptativa e os possíveis fatores atuando nesse processo. Para acessar o status genético da espécie, foram aplicados marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), os quais têm sido eficientemente utilizados para esse propósito (Manel *et al.*, 2012; Shryock *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019; Pometti *et al.*, 2019; Xiong *et al.*, 2020; Lazzaro *et al.*, 2021; Feliciano *et al.*, 2022), além dos marcadores ITS (nrDNA Internal Transcribed Spacer) (Sun *et al.*, 1994) e *rps16-trnK* (cpDNA *rps16-trnK* (Intergenic Spacer) (Shaw *et al.*, 2007).

MATERIAL E MÉTODOS

ESPÉCIE DE ESTUDO: *MIMOSA HATSCHBACHII*

Mimosa hatschbachii é um subarbusto perene (Barneby, 1991), e endêmico dos Campos de Altitude do sul do Brasil, crescendo sobre afloramentos rochosos de basalto ou em solos rasos derivados desses substratos rochosos. Possui folhas verdes, opacas, alternadas ao longo dos ramos, bipinadas (Fig. 1A); pecíolos pubescentes, com pinas (cada um com aproximadamente 2–3 cm de comprimento) localizadas em pares ao longo da raque; os folíolos maiores têm 1–2 milímetros de comprimento, 0,3–0,9 milímetros de largura, oblonga ou elíptico-oblonga, ápice obtuso, dispostas em 6–10 pares pina (Fig. 1B); as folhas possuem "fechamento" durante a noite ou quando tocadas (tigmonastismo), observados nas dormideiras (Barneby, 1991).

As flores de *M. hatschbachii* estão organizadas em inflorescências glomerulares e são, principalmente, hermafroditas, com cálice gamossépalo, membranáceo e campanulado, corola gamopétala e tubulosa, androceu diplostêmone, com 8 estames rosas curtamente monadelfos e gineceu composto por um ovário sésstil, ovado e um estilete filiforme (Barneby, 1991) (Fig. 1C-D). A biologia reprodutiva de *M. hatschbachii* é pouco conhecida. Os estudos sugerem a dependência das espécies do gênero *Mimosa* à agentes dispersores de pólen (Seijo & Neffa, 2004; Wyatt & Lipow 2021). Além disso, a baixa formação de frutos em ambientes naturais é relacionada a um sistema de autoincompatibilidade pós-zigótica, que resulta em aborto de sementes geradas por autopolinização (Seijo & Neffa, 2004). A antese de *M. hatschbachii* é diurna e o pólen é o único recurso oferecido aos visitantes florais, que pertencem as ordens Coleoptera, Hymenoptera (*Apis melifera* e *Trigona* sp.) e Lepidoptera (Bawa, 1990; Stone *et al.*, 2003). A eficiência de cada visitante floral como polinizador efetivo não é conhecida. O período reprodutivo de *M. hatschbachii* ocorre entre agosto e fevereiro e os seus craspédios (Fig. 1E) não apresentam agentes especializados de dispersão, sendo os artículos

monospermicos dispersos próximos à planta-mãe (Caccavari, 1986a; Caccavari, 1986b; Barneby, 1991; Ferraz comunicação pessoal).

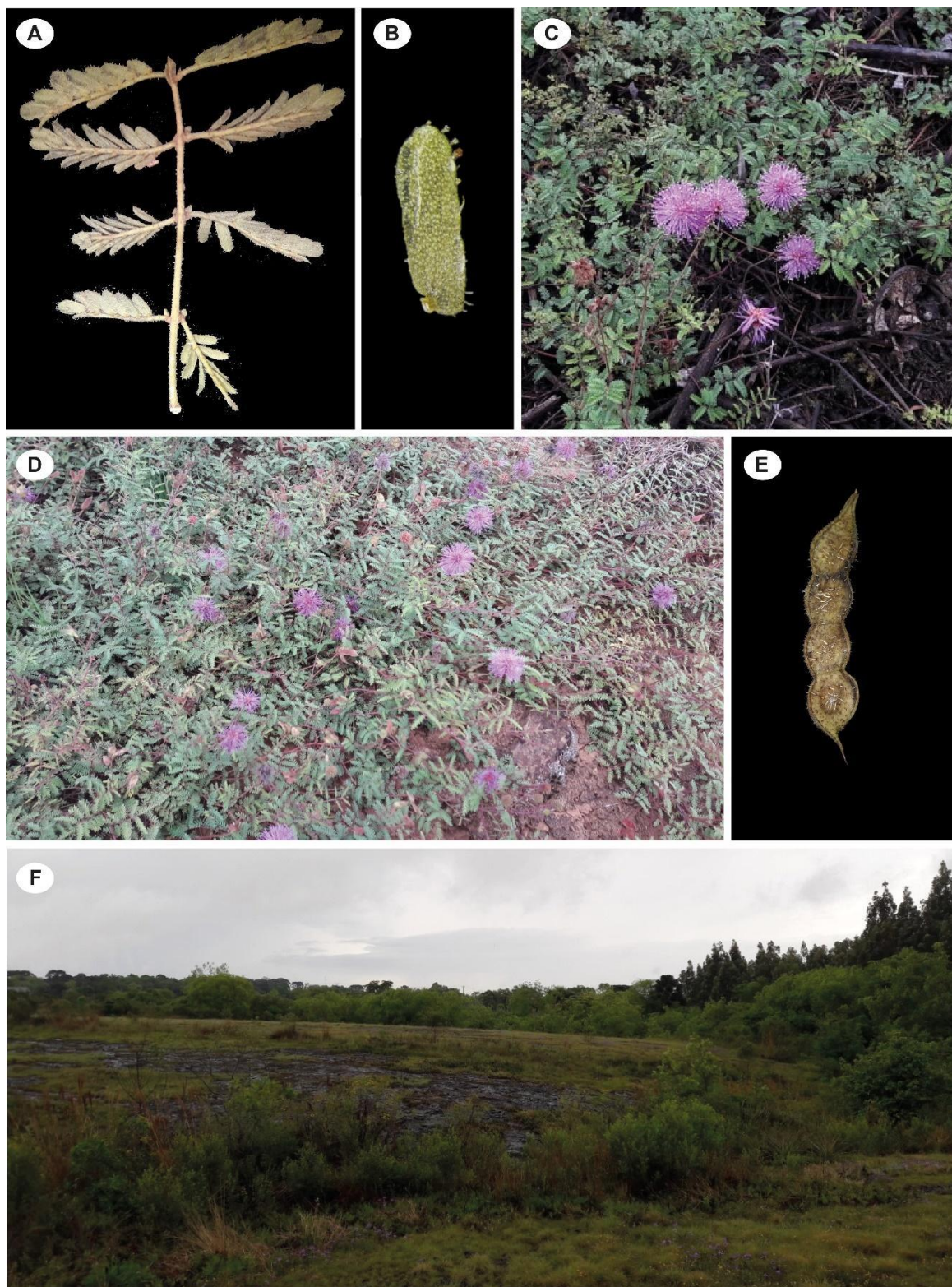


Figura 1. *Mimosa hatschbachii*. A – Folhas. B – Detalhes do folíolo. C – Flores de *M. hatschbachii*. D - *M. hatschbachii* em seu hábitat. E – Fruto. F – Visão geral do hábitat da espécie (afloramento de rocha basáltica). Fotos de D.C. Feliciano e J.R. Ferraz.

Mimosa hatschbachii está listada no Livro Vermelho da Flora do Brasil como “Em Perigo” de extinção (Martinelli & Moraes, 2013) principalmente devido ao declínio na qualidade do seu hábitat, causado por mineração, competição com espécies exóticas invasoras, como por exemplo *Megathyrus maximus* e *Pinus taeda*, fragmentação e pisoteio do gado. O agravamento do risco de extinção dessa espécie é potencializado por sua distribuição em áreas não protegidas pela legislação ambiental do Brasil e exclusivamente particulares, algumas delas anteriormente exploradas por mineradoras e agora abandonadas sem nenhuma perspectiva ou plano de recuperação ambiental (DNPM, 2008; Carvalho *et al.*, 2008; CONAMA, 2010; Iganci *et al.*, 2011; MMA, 2018; Feliciano *et al.*, 2022).

CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE OCORRÊNCIA E AMOSTRAGEM

A estratégia de amostragem das populações de *M. hatschbachii* consistiu na coleta de 330 indivíduos da espécie, distribuídos em 11 afloramentos rochosos distintos (Fig. 2). Desses, sete afloramentos constituem áreas previamente registradas como de ocorrência da espécie (Fig. 2 – área tracejada), a partir das quais 210 indivíduos foram amostrados. Os outros 120 indivíduos foram coletados em quatro afloramentos que, até o momento, não apresentavam registro de ocorrência para *M. hatschbachii*.

Os afloramentos rochosos nos quais *M. hatschbachii* se distribui são constituídos por flora característica, sendo circundados por vegetação natural (Floresta Ombrófila Mista) ou por paisagens antrópicas, como: reflorestamentos de *Pinus* spp., monoculturas agrícolas, pastagens (Fig. 1F) e rodovias (Feliciano *et al.*, 2022). Observa-se composições heterogêneas, que circundam as formações, onde os afloramentos rochosos constituem *patches* de tamanho limitado (Iganci *et al.*, 2011).

As populações amostradas abrangem toda a área de distribuição da espécie (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** 2) e encontram-se em formações fitogeográficas

distintas, sendo TUR1 e TUR2 (município de Turvo) situadas em ambientes alto montanos, envolvendo a Floresta Ombrófila Densa e Campos (Estepe Ombrófila), rodeados de silvicultura típica da região, como as florestas de Eucaliptos e Pinus. Já as populações CAN3 e CAN4 (município de Candói) estão nas formações montanas da Floresta Ombrófila Mista, entremeadas com as plantações de soja, milho, entre outras, enquanto as populações GUA (município de Guarapuava), CAN1 e CAN2 (município de Candói) encontram-se situadas em formações de Campos Naturais, formando mosaicos com fragmentos de Floresta Ombrófila Mista, silviculturas e monoculturas, bem como as populações de FOZ1, FOZ2, FOZ3 (município de Foz do Jordão) e MAN (município de Mangueirinha).

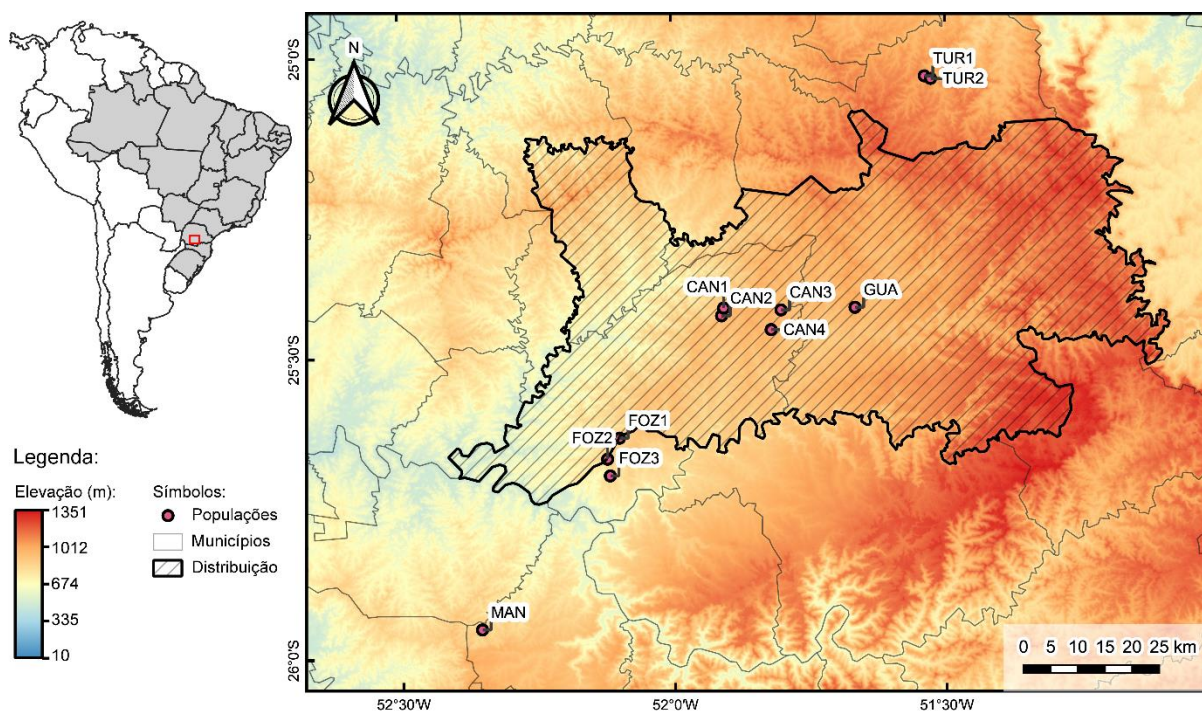


Figura 2. Mapa da área de ocorrência mostrando a localização e altitude das populações amostradas de *Mimoso hatschbachii* no Estado do Paraná, Brasil. As siglas são equivalente as iniciais dos municípios de coleta, onde: TUR1 e TUR2 são da cidade de Turvo; CAN1, CAN2, CAN3 e CAN4 da cidade de Candói; GUA de Guarapuava; FOZ1, FOZ2 e FOZ3 de Foz do Jordão e MAN da cidade de Mangueirinha. A área distribuição da espécie conforme dados de ocorrência do CNCFlora, estão delimitadas pela área tracejada.

Em cada afloramento (população), foram coletadas folhas jovens de 30 plantas, com distância mínima entre elas de 15 m. Após coletadas, as folhas foram armazenadas em sílica gel até a completa secagem do material para posterior extração do DNA total. As exsiccatas foram confeccionadas para confirmação taxonômica da espécie e depositadas no Herbário da

Universidade Estadual de Londrina. Os vouchers de depósito, bem como as coordenadas geográficas, altitude e municípios de origem das populações se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Informações das amostras usadas para inferir a diversidade genética e a estrutura populacional de *Mimosa hatschbachii*. Nome das populações com código de acordo com o local de coleta, número total de amostras por população (N), coordenadas de latitude e longitude, altitude em metros, número do voucher, número de amostras da população disponíveis para análise de AFLP e números de acesso no GenBank das amostras utilizadas na análise das sequências ITS e *rps16-trnK*. O número entre parênteses após os nomes dos marcadores genéticos representa o número total de amostras disponíveis para aquele marcador.

População (código)	N	Coordenadas	Elevação (m)	Voucher*	AFLP (²⁶⁶)	Número de acesso - GenBank	
						ITS (⁸²)	<i>rps16-trnK</i> (⁸⁸)
Turvo (TUR1)	30	25° 2'7.33"S; 51°32'15.29"W	1028	FUEL 56166	16	OQ302353 - OQ302360 (⁸)	OQ302369 - OQ302376 (⁸)
Turvo (TUR2)	30	25° 2'22.96"S; 51°31'34.35"W	1033	FUEL 56165	18	OQ302361 - OQ302368 (⁸)	OQ302377 - OQ302384 (⁸)
Candói (CAN1)	30	25°25'12.07"S; 51°54'24.51"W	934	FUEL 56156	29	OQ302332 - OQ302339 (⁸)	OQ302385 - OQ302392 (⁸)
Candói (CAN2)	30	25°25'58.60"S; 51°54'38.37"W	943	FUEL 56155	19	OQ302325 - OQ302331 (⁷)	OQ302393 - OQ302400 (⁸)
Candói (CAN3)	30	25°25'25.24"S; 51°48'5.99"W	953	FUEL 56167	29	OQ302303 - OQ302310 (⁸)	OQ302401 - OQ302408 (⁸)
Candói (CAN4)	30	25°27'22.66"S; 51°49'11.68"W	936	FUEL 56168	27	OQ302317 - OQ302324 (⁸)	OQ302409 - OQ302416 (⁸)
Guarapuava (GUA)	30	25°25'12.06"S; 51°39'58.15"W	983	FUEL 56154	23	OQ302311 - OQ302316 (⁶)	OQ302417 - OQ302424 (⁸)
Foz do Jordão (FOZ1)	30	25°38'6.82"S; 52° 5'57.81"W	886	FUEL 56169	30	OQ302287 - OQ302294 (⁸)	OQ302425 - OQ302432 (⁸)
Foz do Jordão (FOZ2)	30	25°40'12.02"S; 52° 7'17.56"W	868	FUEL 56170	24	OQ302347 - OQ302352 (⁶)	OQ302433 - OQ302440 (⁸)
Foz do Jordão (FOZ3)	30	25°41'52.23"S; 52° 7'0.50"W	838	FUEL 56157	27	OQ302295 - OQ302302 (⁸)	OQ302441 - OQ302448 (⁸)
Mangueirinha (MAN)	30	25°57'7.53"S; 52°21'15.60"W	844	FUEL 56159	24	OQ302340 - OQ302346 (⁷)	OQ302449 - OQ302456 (⁸)

*FUEL, Herbário da Universidade Estadual de Londrina.

EXTRAÇÃO DE DNA E APLICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES AFLP, ITS E *RPS16-TRNK*

O DNA total foi extraído utilizando tampão CTAB 2% (*Cetyltrimethylammonium Bromide*), segundo o protocolo de Doyle & Doyle (1987) com modificações propostas por Feliciano *et al.* (2022). Cerca de 150 mg de folhas, por amostra, foram trituradas em Mixer Mill MM 400 (Retsch, Haan, Germany) e incubadas a 60 °C por 1h em 1,5 ml de tampão CTAB (2% CTAB, 5 mM EDTA pH 8,0, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,4 M NaCl, 2,5% PVP360, 2% beta-mercaptoetanol e 8 µg proteinase K). Após a incubação, as amostras receberam choque térmico em banho de gelo por 5 min, e depois foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min. Após a centrifugação, as amostras passaram por duas lavagens com clorofórmio/álcool-isoamílico (24:1) e, em seguida, foram precipitadas em álcool isopropílico (2/3 do volume recuperado). O DNA total foi armazenado em TE 0,1 mM (Tris-EDTA buffer).

A técnica de AFLP foi realizada seguindo o protocolo de Vos *et al.* (1995), com modificações propostas por Godoy *et al.* (2019). As reações de restrição, de aproximadamente 500 ng de DNA, e ligação dos adaptadores aos fragmentos foram realizadas conjuntamente. O mix de restrição/ligação foi preparado com 1 U de enzima de restrição *MseI* (*New England Biolabs*, Hitchin, Hertfordshire, UK); 5 U de enzima de restrição *EcoRI* (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA); tampão *MseI* 10X; 2 U de T4 DNA ligase (*SibEnzime*, Academtown, Sibéria); tampão T4 DNA ligase 5X; adaptadores *EcoRI* (5 µM) e *MseI* (50 µM); NaCl (0,5 M); BSA (1 mg/mL); DTT (5 mM) e água para um volume final de 30 µL. 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. Em seguida, as amostras foram diluídas 4X em água ultrapura, de acordo com a intensidade do arraste observado em gel de agarose 1%.

Para as reações de amplificação pré-seletiva foram utilizados 3,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (*Promega*, Madison, WI, USA); 4,8 µM dos primers pré-seletivos *EcoRI* e *MseI*, constituídos pelas sequências de bases dos respectivos adaptadores e uma base adicional “A” para *EcoRI* e “C” para *MseI*; 3,0 µL da restrição-ligação diluída e água ultrapura para completar o volume de 10 µL. O programa da amplificação pré-seletiva consistiu em 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. O padrão de arraste da amplificação pré-seletiva foi verificado em gel de agarose 1% e as amostras diluídas 8X em água ultrapura. Um screening inicial foi realizado, utilizando oito combinações de primers seletivos *EcoRI/MseI* com duas ou três bases adicionais aos primers pré-seletivos, sendo a resolução dos fragmentos visualizada em gel de poliacrilamida 7%. As quatro combinações mais polimórficas e reprodutíveis foram selecionadas e aplicadas a todas as amostras. Os primers *EcoRI* das combinações escolhidas foram marcados com fluorescência para posterior resolução em sistema de eletroforese automatizada: (6-FAM) *EcoRI*-AGC / *MseI*-CTAG; (VIC) *EcoRI*-ATC / *MseI*-CTTC; (NED) *EcoRI*-ACC / *MseI*-CTC; (PET) *EcoRI*-ACG / *MseI*-CTA.

As reações seletivas, marcadas com fluorescência, foram preparadas com 3,5 µL GoTaq® Green Master Mix (*Promega*, Madison, WI, USA); 5 µM de *primer MseI*; 1 µM de *primer EcoRI* marcado (6-FAM, NED, VIC ou PET); 2,5 µL da reação de pré-amplificação diluída e água ultrapura para completar um volume final de 10 µL. O programa de amplificação consistiu em 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 (com decréscimo de 1 °C por ciclo) 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 uma extensão final de 60 °C por 30 min.

A resolução dos produtos das amplificações seletivas foi realizada a partir do preparo de um mix para cada amostra, contendo 2 µL de reação proveniente de cada par de primers (6-FAM, NED, VIC e PET) e 2 µL de água ultrapura, com volume final de 10 µL. Em

seguida, 1 μL dessa mistura foi adicionado a 0,2 μL de *size standard* GS-600LIZ (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) e 8.8 μL de formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). A eletroforese capilar em sistema automatizado ABI 3500 xL Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) ocorreu após desnaturação das amostras a 95 °C por 3 min, seguida de choque térmico em gelo. O protocolo de AFLP foi repetido, desde a extração do DNA, em 15% da amostragem total, como forma de verificar a reprodutibilidade da técnica, sendo as amostras escolhidas aleatoriamente. Para evitar interpretações equivocadas, as amostras que, após a eletroforese capilar, não apresentaram padrão satisfatório de picos nos eletroferogramas, foram retiradas da matriz de dados (Tabela 1).

As ampliações das regiões ITS (ITS1-5.8S-ITS2), foram realizadas utilizando 5 ng de DNA; 7,5 μl de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA); 0,6 μl (10 μM) de primers forward (17SE) e reverse (26SE) (Sun *et al.*, 1994) 0,6 μl de DMSO (dimetilsulfoxide) e água ultrapura para um volume final de 15 μl . Para *rps16-trnK*, foram utilizados 5 ng de DNA (10 μl); 12,5 μl de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA); 1,0 μl (10 μM) de primers forward (F) e reverse (R) (Shaw *et al.*, 2007) e água ultrapura (0,5 μl) para um volume final de 25 μl . As condições de ciclagem para ITS foram as seguintes: 1 ciclo de 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 58 °C por 1 min e 72 °C por 2 min e uma extensão final de 72 °C por 5 min. Para *rps16-trnK* as condições foram: 1 ciclo de 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 50 °C por 1 min (rampa de 0,3°C/s ou 70% slow e 72 °C por 3 min e uma extensão final de 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 1% e, em seguida, purificados com o kit *illustra™ ExoProStar™ 1-Step* (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). 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, Foster City, California, USA) e o ABI 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

ANÁLISE DOS DADOS DE AFLP, ITS E *RPS16-TRNK*

O software GeneMaPPer[®] v.4.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foi utilizado para analisar os eletroferogramas e realizar o score dos fragmentos, gerados a partir do AFLP. Todas as amostras foram analisadas sob os mesmos parâmetros, sendo os picos definidos com base numa unidade de fluorescência relativa mínima de 50 RFU, light smooth e detecção automática de bins com 1 pb. Fragmentos com tamanho variando de 75 a 450 pares de bases, provenientes das quatro combinações de primers, foram combinados em uma única matriz binária de presença (1) e ausência (0).

A chamada de bases e montagem de sequências contigs para as regiões ITS e *rps16-trnK*, foram realizadas pelos softwares Phred v.071220.c (Ewing & Green 1998; Ewing *et al.*, 1998) e Phrap v.1.090518 (Green, 1999), seguida de inspeção visual utilizando o pacote Chromaseq v.1.53 (DR Maddison & Maddison, 2021) do sistema modular para análise evolutiva Mesquite v.3.70 (WP Maddison & Maddison, 2021). O alinhamento das sequências foi realizado pelo MUSCLE v.3.8.31 (Edgar, 2004).

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA

Os parâmetros de diversidade genética para os dados de AFLP, como o número e percentual de loci polimórficos (LP e PLP) e diversidade gênica (HJ) (análogo ao H_e de Nei) (Nei, 1978), foram estimados no software AFLP-SURV v.1.0 (Vekemans, 2002). Além disso, foram obtidos os números de fragmentos privados (FP), inferido pelo software FAMD (Schlueter & Harris, 2006), e índice de raridade (DW), estimado por meio do pacote AFLPDAT (Ehrich, 2006) no ambiente R v. 4.2.1 (R Core Team, 2022). A diversidade genética foi inferida utilizando abordagem Bayesiana com prior de distribuição das frequências de alelos não uniforme, dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Zhivotovsky, 1999), que mostra estimativas das frequências de alelos nulos, mesmo quando há desvios moderados do equilíbrio

(Bonin, Ehrich & Manel, 2007). Uma vez que o índice DW estima a razão entre a frequência de um dado fragmento de AFLP na população e a frequência global marcador desse fragmento em todo o conjunto de dados, o mesmo pode ser utilizado como uma medida de divergência genética populacional, onde valores de DW mais altos indicam maior proporção de fragmentos raros, e valores menores, menor proporção destes nas populações (Schönswetter & Tribsch, 2005). Os índices de diversidade ribotípica/haplotípica (Hd), bem como a inferência de possíveis eventos de expansão populacional, medidos por meio do teste D de Tajima (Tajima, 1989), foram estimados por meio do software Arlequin v.3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2005), para ambas as regiões ITS e *rps16-trnK*.

Os indivíduos de *M. hatschbachii* foram designados aos possíveis grupos genéticos existentes na amostragem, por meio da análise Bayesiana “mixture” no software BAPS v.6.0 (Corander *et al.*, 2008), baseando nos valores de marginal likelihood. Foram testados valores de $K = 1$ a $K = 15$ possíveis agrupamentos, utilizando o prior “Clustering with linked loci” indicado para dados de AFLP (Corander & Tang, 2007). Esta abordagem Bayesiana permite uma demonstração refinada da estrutura genética populacional, mesmo a baixos níveis de diferenciação genética (Latch *et al.*, 2006; Wilkinson *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2014; Dejacó *et al.*, 2016), tratando tanto o número de populações, quanto a frequência alélica dentro delas, como variáveis aleatórias, sem considerar informações populacionais como prior (Corander *et al.*, 2004). A partir da análise “mixture”, foi realizada uma análise “admixture”, para verificar a possível mistura genotípica ancestral entre os clusters identificados (Corander & Marttinen, 2006). Esta análise contou com 2.000 interações, tendo 100 indivíduos referência por população e 20 interações para cada indivíduo.

O software Arlequin v. 3.5.1.3 (Excoffier; Laval & Schneider, 2005) foi utilizado para verificar a distribuição da variação genética, dentro e entre populações, por meio da análise da variância molecular (AMOVA) (Excoffier; Smouse & Quattro, 1992) tanto para os dados de

AFLP como para os dados de ITS, e a significância foi obtida por meio de 10,100 permutações. Ainda no mesmo software, foram estimados os índices de diferenciação genética F_{ST} global (AFLP e ITS) e F_{ST} par a par (apenas para os dados de AFLP). A partir dos valores de F_{ST} par a par, estimativas de fluxo gênico foram calculadas por meio da fórmula “ $Nm = (1 - F_{ST}) / (8 F_{ST})$ ”, proposta por Nielsen & Slatkin (2013), a qual estima-se o número de migrantes entre pares de populações por geração.

Para verificar as relações entre as populações de *M. hatschbachii*, foi construída uma Minimum Spanning Network (MSN) por meio do pacote poppr (Kamvar, Tabima & Grünwald, 2014; Kamvar, Brooks & Grünwald, 2015) implementado no ambiente R v. 4.2.1 (R Core Team, 2022), utilizando-se a distância genética de Nei-Li (Nei & Li, 1979). No gráfico plotado pela análise, é possível observar as amostras que apresentam maior relação genética entre si, sendo aquelas cujos ramos são mais espessos e escuros. As relações genealógicas entre as sequências de ITS e *rps16-trnk* foram estimadas pelo método estatístico de parcimônia (Templeton *et al.*, 1992) implementado no software TCS v1.21 (Clement *et al.*, 2000), sendo os indels considerados como quinto estado de caráter.

CORRELAÇÃO ESPACIAL E ESTRUTURA GENÉTICA ADAPTATIVA

Uma vez que a relação entre os dados geográficos e genéticos não se apresentou linear (Figura suplementar S1) e, portanto, conclusões acerca dos resultados obtidos a partir do teste de Mantel não seriam acuradas, o correlograma de Mantel foi utilizado para examinar a autocorrelação espacial das populações de *M. hatschbachii* em diferentes classes de distância. Para manter um número constante de pares de populações, sete classes de distância, com intervalos desiguais, foram determinadas (Diniz-Filho *et al.*, 2013). A matriz de distância geográfica (Km) foi obtida por meio do software QGIS 2.14.0 (QGIS Development Team, 2016) e a matriz de diferenciação genética (F_{ST} par a par) gerada pelo software Arlequin 3.5.1.3.

(Excoffier *et al.*, 2005). O correlograma de Mantel foi realizado no ambiente R v. 4.2.1 (R Core Team, 2022), utilizando o pacote *vegan* v.2.5-2 package (Oksanen *et al.*, 2018).

Foi realizada uma análise Bayesiana hierárquica no software Bayescan v2.1 (Foll & Gaggiotti, 2008) para detectar possível assinatura de seleção natural. Este método estima, diretamente, a probabilidade posteriori de um determinado locus (fragmento) estar sob seleção e é amplamente utilizado para marcadores dominantes (Krauss *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016; Pometti *et al.*, 2019; Vidaller *et al.*, 2020; Xiong *et al.*, 2020). A seleção é estimada pela decomposição de coeficientes F_{ST} locus-população em um componente específico da população ancestral hipotética (beta), compartilhado por todos os loci, e um componente específico do locus (alfa), compartilhado por todas as populações. Desvios da neutralidade de um locus são assumidos quando o componente específico do locus é necessário para explicar os padrões de diversidade. Se os valores de alfa forem significativamente diferentes de zero, é provável que o locus apresente pressão seletiva atuando como força purificadora (alfa negativo) ou força diversificadora (alfa positivo) (Foll & Gaggiotti, 2008). Foram realizadas 40 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. False Discovery Rate (FDR), definida como a proporção esperada de falsos positivos entre os marcadores sob seleção, foi utilizada para controlar o efeito de testes múltiplos e um q-value (FDR mínimo para o locus ser considerado sob seleção) de 1% foi estabelecido como valor de corte.

Para verificar como os processos espaciais contribuem para a estruturação dos loci sob seleção, foi utilizada uma análise de particionamento da variância através do coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{adj.}$) obtido a partir da Análise de Redundância (RDA). Este método permite verificar a contribuição única e compartilhada de diferentes grupos de variáveis explicativas em uma matriz de variáveis resposta (Borcard *et al.*, 1992). A matriz de loci sob

seleção foi utilizada como matriz de variáveis resposta, no entanto, os dados de presença-ausência de bandas de AFLP foram transformados utilizando a transformação de Hellinger, o que permite a utilização de dados biológicos em análises euclidianas (Legendre & Gallagher, 2001) e cálculo preciso de estimativas de R^2_{adj} em matrizes de dados discretos inflados com zero, como dos marcadores AFLP (Peres-Neto *et al.*, 2006).

Duas matrizes foram utilizadas como variáveis explicativas, a primeira com variáveis ambientais e a segunda com variáveis espaciais (Tabela 2). A matriz de variáveis ambientais foi obtida a partir do WorldClim v.2.1 (Fick & Hijmans, 2017), representando tendências anuais (e.g. temperatura média anual, precipitação anual), sazonalidade (e.g. variação anual de temperatura e precipitação) e fatores limitantes ou extremos (e.g. temperatura dos meses mais quentes ou mais frios e precipitação dos meses mais úmidos ou mais secos). Além destas variáveis, também foram incluídas nesta matriz a altitude de cada população, além de variáveis fitogeográficas e de tipos de solos, obtidos junto com o Instituto Água e Terra (IAT) do estado do Paraná (<https://www.iat.pr.gov.br/Pagina/Dados-e-Informacoes-Geoespaciais-Tematicos>). Para evitar redundância na matriz ambiental, variáveis altamente colineares foram excluídas (Blanchet, Legendre, & Borcard, 2008). Colinearidade foi detectada a partir do coeficiente de correlação par a par de Pearson e pelo fator de inflação da variância (VIF). Foram excluídas variáveis com VIF superior a 10 e uma variável do par quando a correlação de Pearson foi superior a 0,85.

Tabela 2. Variáveis ambientais e espaciais utilizadas para realizar a Análise de Redundância (RDA), para verificar o efeito do ambiente na estrutura genética adaptativa das populações de *Mimosa hantschbachii*.

VARIÁVEIS AMBIENTAIS					
VARIÁVEIS NUMÉRICAS					
Código	Variável	Média	Min	Max	S
Alt.	Altitude	929,82±66,57	836	1032	
BIO1	Annual Mean Temperature	17,03±0,18	16,83	17,42	X
BIO2	Mean Diurnal Range (Mean of monthly (max temp - min temp))	11,97±0,43	11,33	12,66	
BIO3	Isothermality (BIO2/BIO7) (×100)	60,1±0,7	58,6	61,02	X
BIO4	Temperature Seasonality (standard deviation ×100)	302,11±14,56	283,64	325,53	
BIO5	Max Temperature of Warmest Month	26,48±0,58	25,8	27,4	
BIO6	Min Temperature of Coldest Month	6,55±0,34	5,7	6,9	
BIO7	Temperature Annual Range (BIO5-BIO6)	19,93±0,87	18,9	21,6	
BIO8	Mean Temperature of Wettest Quarter	20,55±0,31	20,15	21,15	
BIO9	Mean Temperature of Driest Quarter	16,71±1,14	13,32	17,45	X
BIO10	Mean Temperature of Warmest Quarter	20,55±0,31	20,15	21,15	
BIO11	Mean Temperature of Coldest Quarter	13,27±0,14	12,88	13,43	
BIO12	Annual Precipitation	1740,45±56,94	1678	1876	
BIO13	Precipitation of Wettest Month	195,91±5,8	189	206	X
BIO14	Precipitation of Driest Month	107±7,91	94	121	
BIO15	Precipitation Seasonality (Coefficient of Variation)	21,62±2,37	18,43	26,01	
BIO16	Precipitation of Wettest Quarter	507,82±12,03	492	537	
BIO17	Precipitation of Driest Quarter	366,18±18,85	340	408	
BIO18	Precipitation of Warmest Quarter	507,82±12,03	492	537	
BIO19	Precipitation of Coldest Quarter	375,45±17,72	351	409	X
VARIÁVEIS DO SOLO					
1° nível	Neossolo, Latossolo				
Grande grupo	Latossolos Vermelhos Distroférricos, Latossolos Vermelhos Distróficos, Neossolos Litólicos Eutróficos, Neossolos Litólicos Húmicos				

Família Associação Latossolo Bruno Distrófico Típico + Cambissolo Háptico Tb Distrófico Típico; Álico (Lbd7), Latossolo Vermelho Distroférico Típico (Lvdf8), Associação Latossolo Vermelho Distroférico Típico + Cambissolo Háptico Tb Distrófico Típico (Lvdf9), Associação Neossolo Litólico Eutrófico Chernossólico + Nitossolo Vermelho Eutrófico Típico (Rle8), Associação Neossolo Litólico Húmico Típico + Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico Câmbico (Rlh10), Associação Neossolo Litólico Húmico Típico + Nitossolo Vermelho Distroférico Típico; Álico(Rlh3) X

Textura Argilosa, média

VARIÁVEIS FITOGEOGRÁFICAS

Domínio Estepe Gramíneo Lenhosa, Floresta Ombrófila Mista

Vegetação campo subtropical, fl. subtrop. peren.; fl. subtrop. subperen.

VARIÁVEIS ESPACIAIS

Código	Variável	Média	Min	Max	S
MEM1	dbMEM1	-0,02±1,03	-1,64	1,45	X
MEM2	dbMEM2	-0,11±1,13	-2,03	0,87	X
MEM3	dbMEM3	-0,14±1,1	-2,68	1,55	X

S, variáveis selecionadas para aplicação do modelo.

Para a criação da matriz de variáveis espaciais, previamente foi testada a presença de tendências lineares nos dados, utilizando as coordenadas das populações como variáveis explicativas em uma RDA, cuja significância foi verificada por meio de um teste de permutação similar à ANOVA, com 999 permutações (Borcard, Gillet & Legendre, 2018). Também foi utilizada a análise de mapa de autovetores de Moran baseado em distância (dbMEM - distance-based Moran's Eigenvector Map), utilizada para criar variáveis espaciais com padrões mais complexos do que os lineares representados pelas coordenadas (Borcard & Legendre, 2002; Dray *et al.*, 2006). Uma representação destas variáveis pode ser vista na figura suplementar S2.

As duas matrizes passaram por um processo de seleção em dois passos, com o objetivo de manter apenas as variáveis que contribuem para a estruturação genética das populações da espécie. O processo de seleção em dois passos seguiu a metodologia descrita por Feliciano e colaboradores (2022). Após a seleção das variáveis, a análise de particionamento da variância foi realizada apenas com as variáveis selecionadas, gerando as frações da variância

explicadas por cada matriz, pela interação entre elas, e a fração não explicada por nenhuma variável utilizada no modelo. A significância de cada fração foi testada por modelos de RDA e RDA parcial e testes permutacionais similares à ANOVA. A homogeneidade multivariada dos resíduos de cada população foi comparada, utilizando o teste betadisper seguido pelo teste de 'Diferença significativa honesta' de Tukey, como forma de verificar possíveis padrões nos dados não explicados pelas matrizes utilizadas (Anderson, 2006). Os testes foram realizados no R v.4.2.1 (R Core Team, 2022), com os pacotes poppr v.2.9.3 (Kamvar *et al.*, 2014, 2015), vegan v.2.6-2 (Oksanen *et al.*, 2022), tidyverse v.1.3.2 (Wickham *et al.*, 2019), usdm v.1.1-18 (Naimi *et al.*, 2014), Hmisc v.4.7-0 (Harrell, 2022), corrplot v.0.92 (Wei & Simko, 2021), adespatial v.0.3-20 (Dray *et al.*, 2022), VennDiagram v.1.7.3 (Chen, 2022), rcompanion v.2.4.16 (Mangiafico, 2022).

RESULTADOS

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA

Dos 330 indivíduos amostrados, 64 não apresentaram padrões satisfatórios de picos nos eletroferogramas, sendo retirados das análises. Os 266 indivíduos de *M. hatschbachii* restantes geraram 813 fragmentos de AFLP, a partir das quatro combinações de primers seletivos, dos quais 99,14% foram polimórficos. Na totalidade de fragmentos gerados, 161 (159 polimórficos – 98,76 %) a partir da combinação de primers *EcoRI*-AGC (6-FAM) / *MseI*-CTAG; 151 (147 polimórficos – 97,35%), a partir de *EcoRI*-ATC (VIC) / *MseI*-CTTC; 242 (241 polimórficos – 99,59%) a partir de *EcoRI*-ACC (NED) / *MseI*-CTC; e 259 (259 polimórficos – 100,00%), a partir de *EcoRI*-ACG (PET) / *MseI*-CTA.

O percentual médio de fragmentos polimórficos (PLP) foi de 35,44%, tendo a população TUR1 apresentado o menor percentual (29,80%) e GUA o maior (41,00%). Um total de 95 fragmentos privados (FP) foi encontrado, sendo a população MAN a que apresentou maior número desses fragmentos (20), enquanto TUR2 apresentou o menor número (3). As estimativas dos índices de raridade (DW) mostraram a mesma tendência dos fragmentos privados, sendo maior na população MAN (DW = 1939,43) e menor na população TUR2 (DW = 916,29). A diversidade genética total (H_T) foi de 0,13, com os índices populacionais de diversidade genética (H_j) variando de 0,10 (TUR1 e TUR2) a 0,13 (CAN3, GUA e FOZ1). Na Tabela 3 encontram-se todos os índices estimados para cada uma das populações.

Tabela 3. Índices de diversidade genética das 11 populações de *Mimosa hatschbachii*, obtidos a partir dos marcadores AFLP, ITS e *rps16-trnK*.

População	AFLP						ITS				<i>rps16-trnK</i>			
	N	LP	PLP	HJ	FP	DW	n	Nhap	Hd	D	n	Nhap	Hd	D
TUR1	16	242	29.80	0.10	5	1222.73	8	4	0.75	1.45	8	1	0.00	0.00
TUR2	18	251	30.90	0.10	3	916.29	8	2	0.25	-1.05	8	3	0.75	0.00
CAN1	27	295	36.30	0.12	4	1047.66	8	2	0.57	1.44	8	2	0.73	0.33
CAN2	29	297	36.50	0.12	5	990.79	7	3	0.52	-1.24	8	4	0.75	0.00
CAN3	23	283	34.80	0.13	6	1501.00	8	3	0.61	0.93	8	3	0.75	0.00
CAN4	24	300	36.90	0.12	15	1913.08	8	3	0.46	-0.45	8	2	0.54	1.17
GUA	30	333	41.00	0.13	13	1595.83	6	2	0.33	0.00	8	3	0.71	0.00
FOZ1	27	312	38.40	0.13	14	1443.18	8	2	0.43	0.33	8	4	0.75	0.00
FOZ2	24	267	32.80	0.12	5	1255.47	6	1	0.00	-	8	5	0.86	-0.45
FOZ3	19	292	35.90	0.12	5	984.79	8	4	0.75	0.41	8	4	0.79	0.00
MAN	29	297	36.50	0.11	20	1939.43	7	2	0.48	0.56	8	3	0.61	0.00
Média	24.18	288.09	35.44	0.12	8.64	1346.39	7.45	2.55	0.47	-	8	3	0.66	-

N, número de indivíduos analisados para os dados da AFLP; LP, número de fragmentos polimórficos; PLP, proporção de fragmentos polimórficos; HJ, índice de diversidade genética (análogo ao H_e – Nei, 1978); FP, fragmentos privados; DW, índice de raridade (estimado como marcadores ponderados por frequência); N, número de indivíduos analisados para dados de ITS e *rps16-trnK*; Nhap, número de ribótipos e haplótipos por população; Diversidade Hd, ribotípica e haplotípica; D, teste de neutralidade de Tajima (Tajima, 1989).

As sequências de ITS, geradas para 82 indivíduos, produziram um alinhamento de 675 pares de bases (pb), e apresentaram apenas um indel (inserção/deleção) de 1 pb, culminando em sequências cujos comprimentos variaram de 674 – 675 pb. No total, foram identificados sete ribótipos distintos, formados a partir de três sítios segregantes e o indel. O ribótipo R1 foi estimado ser o mais ancestral da amostragem, se distribuindo em um maior número de indivíduos e populações, não tendo sido encontrados apenas em TUR2 e CAN3 (Tabela 4). Em contrapartida, os ribótipos R6 e R7 foram exclusivos das populações MAN e TUR2, respectivamente. Os índices de diversidade ribotípica (Hd) variaram de 0 (FOZ2) à 0,75 (TUR1), entretanto, a diversidade nucleotídica foi extremamente baixa, não ultrapassando 0,001 em todas as populações. Valores positivos e negativos de D de Tajima foram estimados para 10 das 11 populações (FOZ2 apresentou apenas um ribótipo), entretanto, nenhum foi significativo estatisticamente.

Tabela 4. Frequência do ribótipo nDNA ITS nas 11 populações de *Mimosa hatschbachii*.

	R1	R2	R3	R4	R5	R6*	R7*	Nhp
TUR1	2	1	4	-	1	-	-	4
TUR2	-	7	-	-	-	-	1	2
CAN1	4	4	-	-	-	-	-	2
CAN2	5	1	-	-	1	-	-	3
CAN3	-	2	1	-	5	-	-	3
CAN4	6	1	1	-	-	-	-	3
GUA	5	-	-	1	-	-	-	2
FOZ1	2	6	-	-	-	-	-	2
FOZ2	6	-	-	-	-	-	-	1
FOZ3	1	4	2	1	-	-	-	4
MAN	2	-	-	-	-	5	-	2
Nih	33	26	8	2	7	5	1	

Nhp, número de ribótipos por população; **Nih**, número de indivíduos por ribótipo; *, ribótipo de ocorrência exclusiva na população.

Já o sequenciamento da região *rps16-trnK* gerou 88 sequências, com tamanhos variando de 874 – 954 pb e alinhamento com 961 pb de comprimento, como resultado de seis eventos de inserção-deleção, que totalizaram 24 pb. Os indels e os três sítios segregantes encontrados na região *rps16-trnK* deram origem a 17 haplótipos distintos, sendo H1 o

possivelmente mais ancestral da amostragem, uma vez que só não esteve presente na população CAN4 (Tabela 5). Dos 17 haplótipos amostrados, dez foram exclusivos às suas respectivas populações. Assim como para os dados de ITS, os haplótipos de *rps16-trnK* apresentam valores de diversidade nucleotídica inferiores a 0.001, com diversidade haplotípica (Hd) variando de 0.54 (CAN4) a 0.86 (FOZ) (Tabela 3). O teste para presença de expansão populacional, *D* de Tajima, não foi significativo para nenhuma das populações.

Tabela 5. Frequência de haplótipos *rps16-trnK* nas 11 populações de *Mimosa hatschbachii*.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	Nhp
TUR1	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
TUR2	3	-	-	2	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
CAN1	2	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
CAN2	2	-	-	1	-	-	-	-	-	4*	1*	-	-	-	-	-	-	4
CAN3	3	2	-	-	-	-	-	-	3*	-	-	-	-	-	-	-	-	3
CAN4	-	-	-	-	-	3	5*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
GUA	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4*	2*	-	3
FOZ1	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2*	-	-	-	1*	4
FOZ2	1	3	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1*	-	-	-	5
FOZ3	3	-	-	1	-	-	-	3*	-	-	-	1	-	-	-	-	-	4
MAN	2	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	3
Nih	30	11	2	4	6	7	5	3	3	4	1	2	2	1	4	2	1	

Nhp, número de ribótipos por população; **Nih**, número de indivíduos por ribótipo; *, ribótipo de ocorrência exclusiva na população.

No programa BAPS, a análise bayesiana de agrupamento sem mistura (*mixture*) foi realizada para as 11 populações de *M. hatschbachii*, que agrupou os indivíduos em três *clusters* geneticamente distintos (Fig. 3), sendo o melhor marginal *likelihood* estimado (-55776.5455) para $K = 3$, com probabilidade posterior máxima ($p = 1$). Dentre os três *clusters* observados, o primeiro é composto pelas populações de TUR1 e TUR2, o segundo *cluster* pelas populações de CAN1, CAN2, CAN3, CAN4 e GUA e o terceiro *cluster* formado pelas populações de FOZ1, FOZ2, FOZ3 e MAN. A análise *admixture*, realizada no mesmo programa, mostrou apenas oito indivíduos, provenientes das populações CAN3, GUA e FOZ3, com algum percentual de ancestralidade em grupos genéticos distintos, entretanto, esses foram baixos,

evidenciando um forte isolamento entre os clusters e homogeneidade das amostras dentro de cada população (Fig. 3).

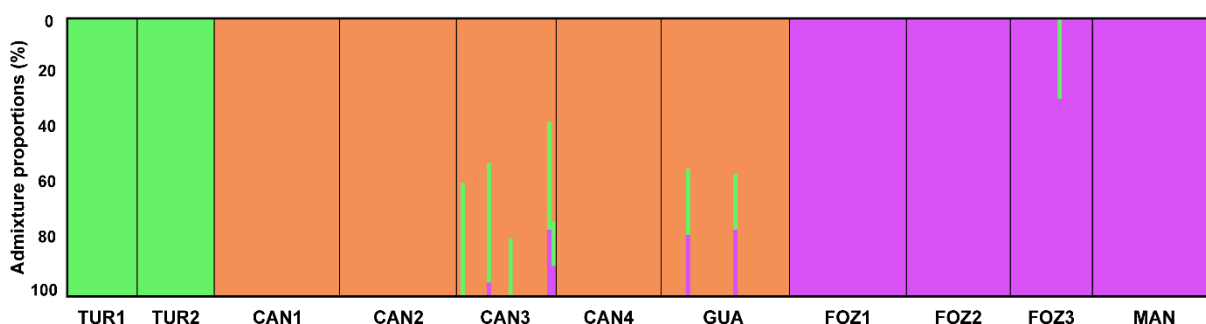


Figura 3. Inferência Bayesiana de agrupamento, realizada pelo software BAPS para 11 populações de *Mimosa haitchbachii*, a partir de 813 fragmento de AFLP. A análise designou o melhor resultado para $K = 3$ agrupamentos (marginal likelihood -78734.7146, probabilidade posterior 1).

A Minimum Spanning Network, construída pela distância de Nei-Li (Fig. 4), a partir dos dados de AFLP, evidenciou os mesmos três agrupamentos encontrados pelo BAPS, dos quais o grupo A é formado apenas pelos indivíduos de TUR1 e TUR2, compondo um único braço da árvore. Já o grupo B, é formado por um braço com 6 ramificações, sendo que: um dos ramos é composto pelos indivíduos das populações de CAN1 e CAN2; no segundo ramo, temos os indivíduos de CAN4; no terceiro, os indivíduos de GUA; no quarto ramo, os indivíduos de CAN3; no quinto ramo podemos observar alguns indivíduos de CAN2 (6), CAN1 (7), GUA (2), FOZ1 (3) e MAN (1); o sexto ramo é composto apenas por três indivíduos de GUA, três de CAN1 e um de FOZ1. No grupo C, podemos observar 3 ramificações: uma compoendo os indivíduos de FOZ1 (16), FOZ2 (18) e MAN (27), mas um de indivíduo CAN2 também foi evidenciado neste ramo; no outro ramo, temos uma mistura de diferentes indivíduos de diferentes populações, sendo CAN1 (5), CAN3 (3), FOZ1 (4), FOZ2 (2); no último ramo, temos os indivíduos de FOZ3 (19), FOZ1 (3), FOZ2 (1), CAN2 (1), CAN1 (1) e GUA (1). É possível observar, ainda, que os agrupamentos se formam de acordo com a posição geográfica das populações (Fig. 2), estando o grupo A mais ao norte da amostragem, B mais ao centro e C compreendendo as populações mais ao sul da área de distribuição.

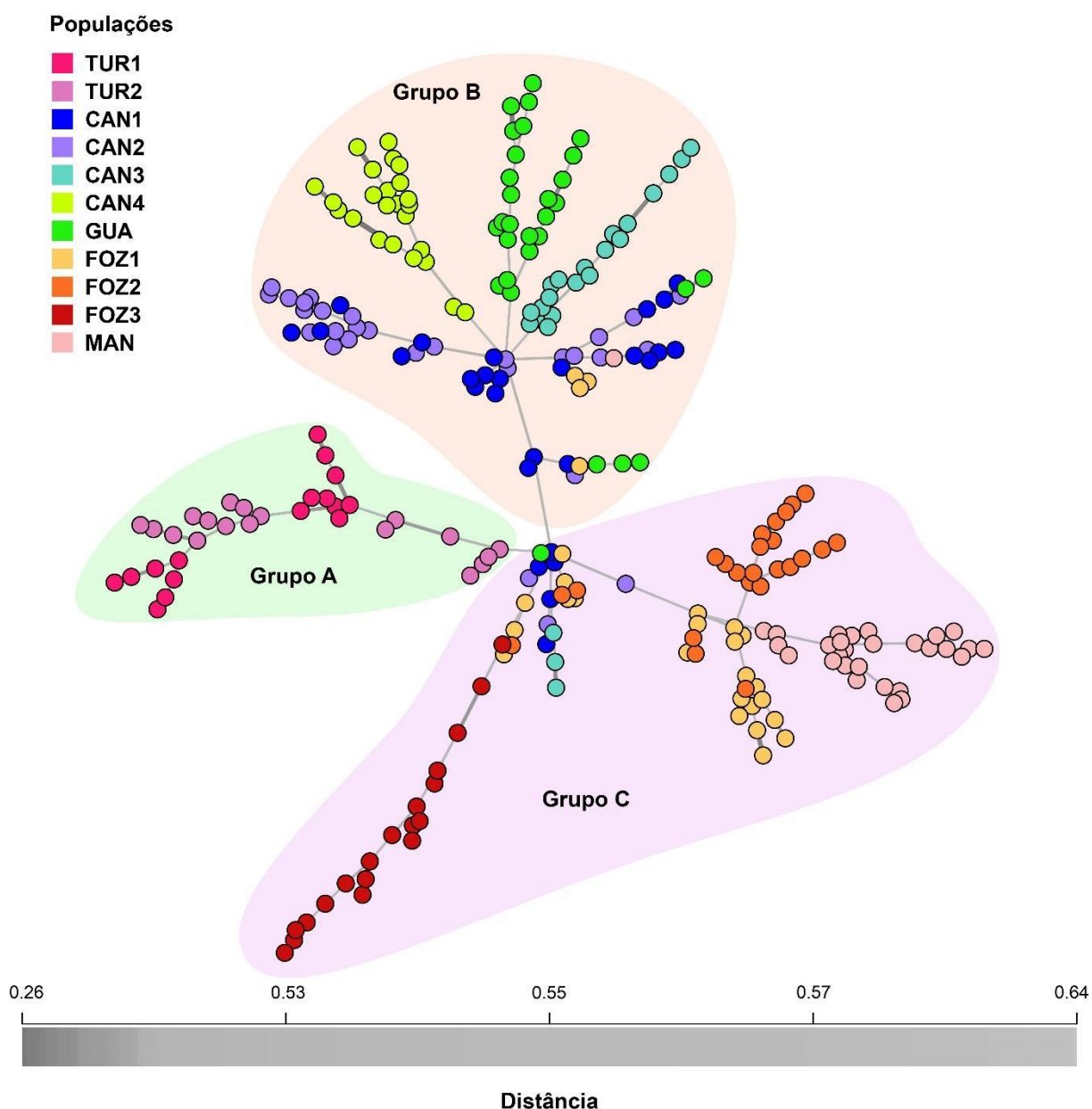


Figura 4. Minimum Spanning Network, construída com base na distância genética de Nei-Li, mostrando as relações entre os indivíduos das 11 populações de *Mimosa hantschbachii*, a partir de 813 fragmentos de AFLP. As cores de fundo destacam os três grupos genéticos atribuídos pelo software BAPS.

A análise de Parcimônia Estatística, realizada a partir dos dados de ITS, produziu uma rede única com confiabilidade de 95% na conectividade entre os ribótipos, englobando todas as amostras de *M. hantschbachii*. Apenas um loop, entre os ribótipos R3 e R5, não pode ser resolvido parcimoniosamente (Fig. 5A). Este loop indica que diferentes mutações em um único ponto podem ter originado o mesmo ribótipo. A partir do ribótipo mais ancestral (R1) derivaram, com apenas um passo mutacional, os ribótipos R2, R4 e R5. Os ribótipos R3, R6 e

R7 se apresentaram mais distantes do ribótipo ancestral, entretanto, com apenas um passo mutacional.

Assim como os dados de ITS, as sequências de *rps16-trnK* produziram uma única rede haplotípica com 95% de confiabilidade na conectividade dos haplótipos (Fig. 5B). A partir do haplótipo mais ancestral (H1), derivaram diretamente cinco haplótipos (H2, H3, H4, H5 e H6). A partir do haplótipo H2 derivaram os haplótipos H17 e H15 com sete e quatro passos mutacionais, respectivamente. Um loop foi observado entre o haplótipo H6 e um haplótipo não amostrado (missing haplotype). Ambos os conjuntos de dados ITS e *rps16-trnK* não apresentaram padrão claro de distribuição geográfica de seus haplótipos.

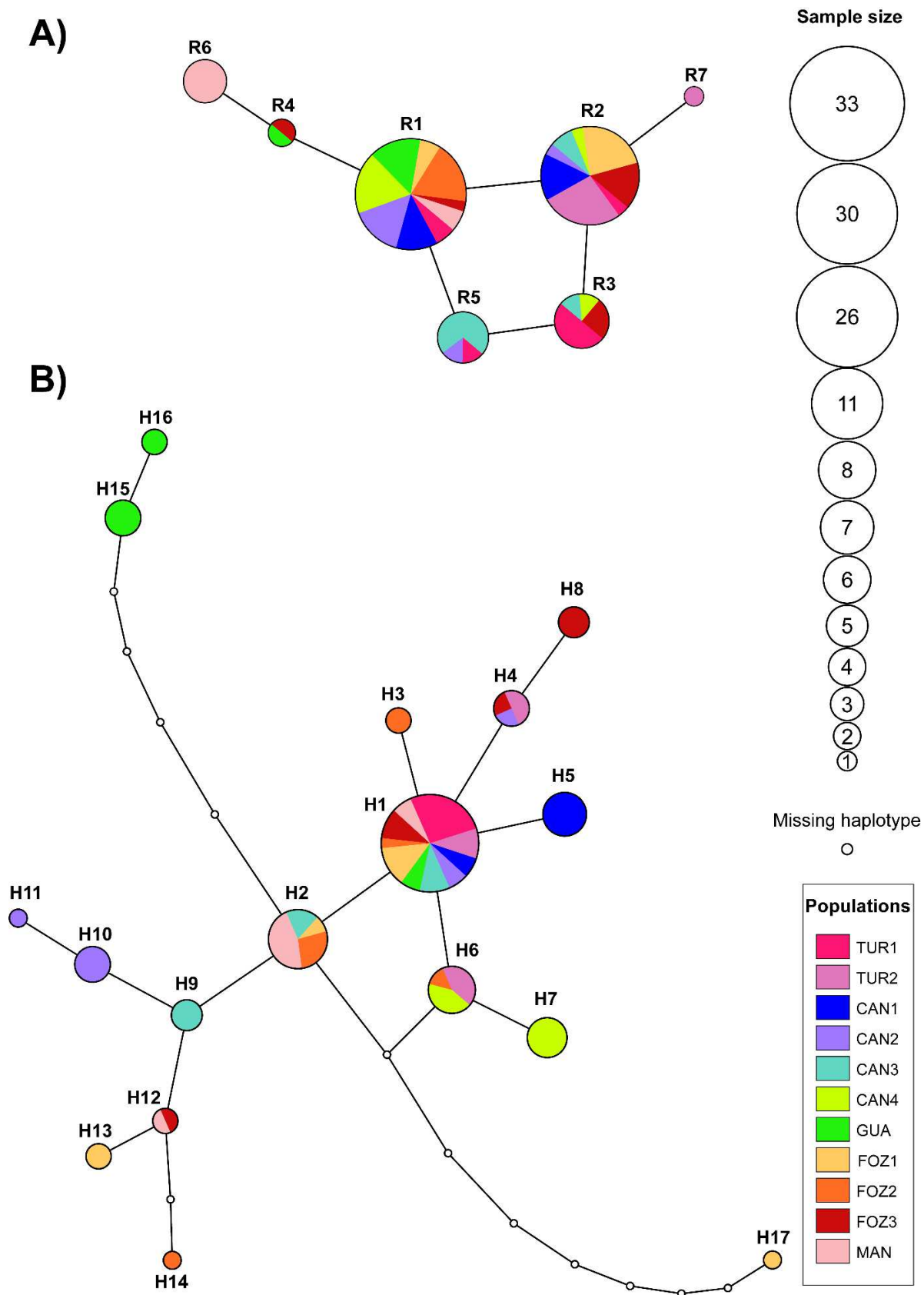


Figura 5. Relações genealógicas entre ITS e sequências *rps16-trnK* para 11 populações de *Mimosa hatschbachii*, estimadas pelo método de parcimônia estatística no software TCS 1.21. A) Rede de ribótipos da região ITS. B) Rede de haplótipos da região *rps16-trnK*. O tamanho dos círculos corresponde ao número de indivíduos, e as cores dentro dos círculos representam as populações.

A partir da análise de variância molecular (AMOVA), baseada nos dados de AFLP, o índice de diferenciação genética (F_{ST}), foi de 0,17, sendo considerado alto de acordo com Hartl & Clark (2006). Tais autores classificam valores de F_{ST} menores que 0,05 como indicativo de baixa diferenciação, valores entre 0,05 a 0,15 como diferenciação moderada, valores entre 0,15 a 0,25 como alta diferenciação e valores acima de 0,25 como diferenciação muito alta entre populações. Foi observado, ainda na AMOVA, que a maior parte da variação genética se encontra dentro das populações (83,10%) e não entre elas (16,90%) (Tabela 4). Quando analisados apenas os fragmentos de AFLP que não estão sob processo de seleção, o F_{ST} se mostra levemente reduzido ($F_{ST} = 0,13$), em contrapartida, na análise realizada apenas com os fragmentos sob processo de seleção a diferenciação genética entre as populações aumenta consideravelmente ($F_{ST} = 0,36$), bem como a variação intrapopulacional diminui (63,61%). As AMOVA's realizadas para os dados de ITS e *rps16-trnK* ($F_{ST} = 0,42$ e $F_{ST} = 0,44$, respectivamente), corroboram a alta diferenciação identificada pelos dados de AFLP, e mostram a maior percentual de variação genética dentro das populações (57,62%) e do que entre elas (42,38%).

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) de 11 populações de *Mimosa hatschbachii*. Variação genética entre e dentro das populações de marcadores AFLP, rDNA ITS e DNA plastidial *rps16-trnK*.

Fonte da Variação	d.f.	SS	VC	PV (%)	F_{ST}
AFLP – Todo o conjunto dedados					
Entre as populações	10	3026,84	10,4	16,90*	0,17*
Dentro das populações	255	13081,60	51,3	83,10*	
Total	265	16108,50	61,73		
AFLP – somente Loci sob seleção					
Entre as populações	10	819,60	3,17	36,39*	0,36*
Dentro das populações	255	1413,78	5,54	63,61*	
Total	265	2233,38	8,72		
AFLP – sem Loci sob seleção					
Entre as populações	10	2165,24	7,09	13,44*	0,13*
Dentro das populações	255	11643,75	45,67	86,56*	
Total	265	13809	52,75		
ITS					
Entre as populações	10	21,13	0,24	42,38*	0,42*
Dentro das populações	71	23,16	0,33	57,62*	

Total	81				
<i>rps16-trnK</i>					
Entre as populações	10	54,93	0,59	43,66*	0,44*
Dentro das populações	77	58,75	0,76	56,34*	
Total	87				

d.f., graus de liberdade; SS, soma dos quadrados; VC, componentes de variância; PV, percentual de variação; F_{ST} , índice de fixação.

* $P < 0,01$ (teste de significância usando 10 100 permutações).

As estimativas de migrantes entre as populações, de maneira geral, ficaram abaixo de 0,6 migrante por geração, exceto em alguns pares de populações, como: CAN1 X CAN2 ($N_m = 6,06$), CAN2 X FOZ1 ($N_m = 1,12$), CAN1 X GUA ($N_m = 1,07$), CAN1 X FOZ1 ($N_m = 1,26$), FOZ2 X FOZ1 ($N_m = 1,66$), FOZ2 X FOZ3 ($N_m = 1,20$).

Tabela 7. Estimativa do número de migrantes por geração, entre 11 populações de *Mimosa hatschbachii*, a partir de 813 marcadores AFLP, conforme fórmula proposta por Nielsen e Slatkin (2013).

	TUR1	TUR2	CAN1	CAN2	CAN3	CAN4	GUA	FOZ1	FOZ2	FOZ3	MAN
TUR1	-										
TUR2	0,92	-									
CAN1	0,35	0,45	-								
CAN2	0,34	0,43	6,06*	-							
CAN3	0,43	0,57	0,72	0,70	-						
CAN4	0,33	0,37	0,69	0,74	0,60	-					
GUA	0,46	0,57	1,07*	0,95	0,91	0,70	-				
FOZ1	0,37	0,41	1,26*	1,12*	0,69	0,70	0,84	-			
FOZ2	0,41	0,43	0,70	0,66	0,67	0,57	0,65	1,66*	-		
FOZ3	0,37	0,44	0,67	0,61	0,62	0,43	0,65	0,95	1,20*	-	
MAN	0,31	0,32	0,64	0,65	0,45	0,49	0,58	0,90	0,66	0,63	-

* Valores superiores a 1 migrante por geração

As estimativas de distâncias F_{ST} par a par foram todas significativas ($p < 0,01$), sendo as populações com maior distância genética entre si TUR1 e MAN (0,29), e com menor distância CAN2 e CAN1 (0,02). Com base nas distâncias geográficas, as populações mais distantes entre si são TUR2 e MAN (130,91 Km), enquanto as mais próximas são TUR1 e TUR2 (1,24 Km).

Tabela 8. Diferenciação genética (F_{ST} par a par, a partir do AFLP) entre as 11 populações de *Mimosa hatschbachii* abaixo da diagonal e distância geográfica (km), acima da diagonal.

	TUR1	TUR2	CAN1	CAN2	CAN3	CAN4	GUA	FOZ1	FOZ2	FOZ3	MAN	$F_{ST} \bar{x}$
TUR1	-	1,24	56,55	57,88	50,56	54,60	44,52	87,24	91,61	93,70	130,56	0,24
TUR2	0,12	-	56,95	58,27	50,77	54,80	44,41	87,62	91,98	94,04	130,91	0,21
CAN1	0,26	0,22	-	1,48	10,58	9,62	24,20	30,70	35,10	37,31	74,09	0,15
CAN2	0,27	0,23	0,02	-	11,01	9,48	24,63	29,35	33,74	35,91	72,72	0,15
CAN3	0,22	0,18	0,15	0,15	-	4,05	13,63	38,00	42,16	43,87	80,63	0,17
CAN4	0,28	0,25	0,15	0,14	0,17	-	15,97	34,37	38,45	40,06	76,75	0,19
GUA	0,21	0,18	0,10	0,12	0,12	0,15	-	49,63	53,48	54,74	90,79	0,15
FOZ1	0,25	0,23	0,09	0,10	0,15	0,15	0,13	-	4,45	7,15	43,42	0,14
FOZ2	0,24	0,22	0,15	0,16	0,16	0,18	0,16	0,07	-	3,12	39,00	0,16
FOZ3	0,25	0,22	0,16	0,17	0,17	0,22	0,16	0,12	0,09	-	36,88	0,17
MAN	0,29	0,28	0,16	0,16	0,22	0,20	0,18	0,12	0,16	0,16	-	0,19

Todos os valores são significativos a um $P < 0,01$ com base em um teste com 10.100 permutações.

CORRELAÇÃO ESPACIAL E ESTRUTURA GENÉTICA ADAPTATIVA

O correlograma de Mantel mostrou um padrão de correlação entre as classes de distância do “tipo exponencial”, onde é observada uma alta e significativa ($r = 0,58$, $p < 0,01$) correlação na primeira classe de distância (até 10,1 km), seguida de um decréscimo e estabilização dessa correlação (classe 5, 53,8 km), indicando a existência de patches de similaridade genética nas populações amostradas (Diniz-Filho *et al.*, 2013) (Fig. 6-A). No distograma (Fig. 6-B) é possível observar que os pares de populações distribuídas na primeira classe de distância apresentam valor médio de $F_{ST} = 0,10$. Nas classes de distância seguintes, os valores médios de F_{ST} aumentam, até que atingem um platô (classe 5 = 53,8 km; $F_{ST} = 0,21$), a partir de onde pouco se alteram (Fig. 6-B).

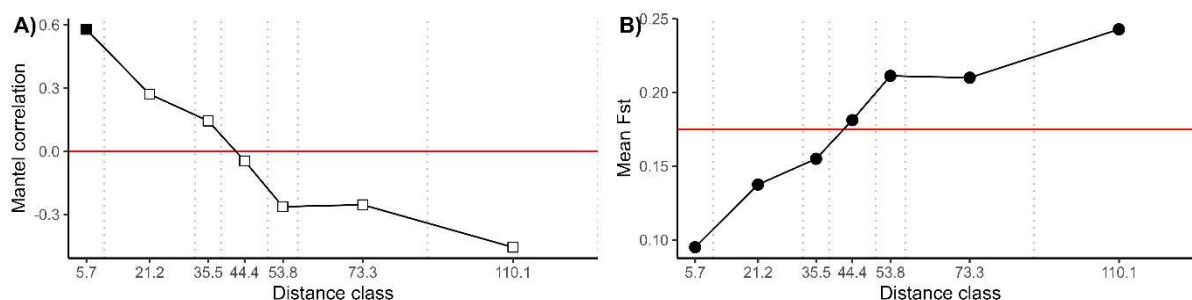


Figura 6. Correlação espacial de 11 populações de *Mimosa hatschbachii*, a partir de 813 marcados AFLP. A) Correlograma de Mantel. B) Distograma mostrando valores médios de F_{ST} em cada classe de distância.

Tabela 9. Coeficiente de Mantel e valores de significância para o correlograma de Mantel.

Classe	Limites (km)	Distância média (km)	Nº de pares por classe	Mantel r	P corrigido	F _{ST} médio
D.cl.1	1,24 – 10,10	5,7	16	0,58	0,000	0,10
D.cl.2	10,10 – 32,22	21,2	16	0,27	0,067	0,14
D.cl.3	32,22 – 38,72	35,5	16	0,14	0,161	0,16
D.cl.4	38,72 – 50,10	44,4	16	-0,05	0,363	0,18
D.cl.5	50,10 – 57,42	53,8	16	-0,26	0,122	0,21
D.cl.6	57,42 – 89,2	73,3	16	-0,25	0,240	0,21
D.cl.7	89,2 – 130,91	110,1	14	-0,46	0,014	0,24

Análise Bayesiana realizada pelo software BayeScan encontrou 47 loci (6% dos 813 fragmentos amostrados) sob possível processo de seleção. Todos os fragmentos apresentaram q-value menor que 0,01 (menos de 1% de falsos positivos) e valores alpha positivos, indicando que os mesmos se encontram sob seleção adaptativa (Fig. 7).

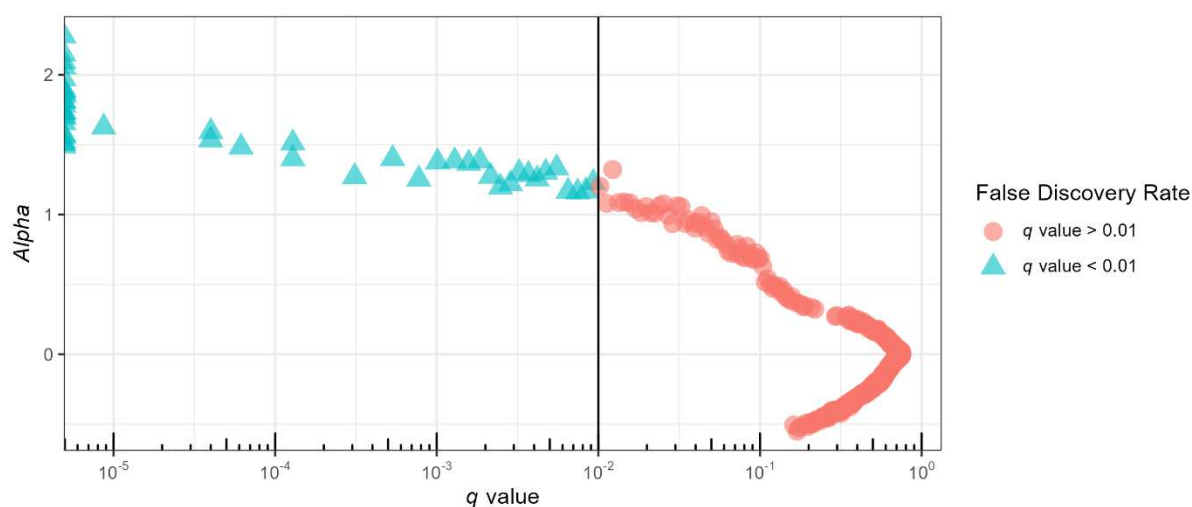


Figura 7. Gráfico do BayeScan mostrando 813 fragmentos de AFLP a partir de 11 populações de *Mimosa hatschbachii*. O valor Alpha para cada fragmento é plotado contra o valor q, que representa a proporção de marcadores de outliers esperados como falsos positivos e a linha vertical indica o valor de corte de 1% usado. Todos os 154 fragmentos AFLP com valor q menor que 1% tem alfa positivo, sugerindo que eles estão

potencialmente sob seleção diversificada. Para fins de visualização, os marcadores com valor q menor que 0,00001 são mostrados com o mesmo valor no gráfico.

Para realização da análise de redundância (RDA), das 20 variáveis numéricas utilizadas na matriz explicativa ambiental, 15 foram eliminadas por apresentar colinearidade com as variáveis restantes (Figura S3). Já o processo de seleção em duas etapas indicou que as variáveis ambientais restantes ($P < 0,001$), as coordenadas geográficas ($P < 0,001$) e as variáveis dbMEM ($P < 0,001$) contribuem para a estruturação da variação genética adaptativa, sendo as variáveis ambientais selecionadas a família do solo (LBd7, LVdf8, LVdf9, RLe8, RLh10, RLh3), precipitação do mês mais húmido (BIO13), temperatura média do trimestre mais seco (BIO9), temperatura média anual (BIO1), precipitação do trimestre mais frio (BIO19) e isotermalidade (BIO3 – razão entre a variação de temperatura diária média e a variação de temperatura anual). As três variáveis espaciais não lineares foram selecionadas (dbMEM1, dbMEM2 e dbMEM3), portanto a matriz explicativa espacial foi composta pelas variáveis dbMEM, além das coordenadas geográficas, representando tendências lineares. A descrição de todas as variáveis utilizadas se encontra na Tabela 2.

O conjunto total de variáveis selecionadas explicou 34,3% ($R^2_{adj.} = 0,3433$, $P < 0,001$) da variância observada nos loci sob seleção e, de acordo com o particionamento da variância, toda essa variação é explicada pela matriz ambiental. As variáveis espaciais explicaram 24,8% ($R^2_{adj.} = 0,2479$, $P < 0,001$) da variância, totalmente compartilhada com as variáveis ambientais, indicando que toda variação espacialmente estruturada pelos loci sob seleção pode ser explicada por variáveis ambientais e que 9,5% ($R^2_{adj.} = 0,0954$, $P < 0,001$) da variância explicada pelas variáveis ambientais não possui estrutura espacial (Fig. 8).

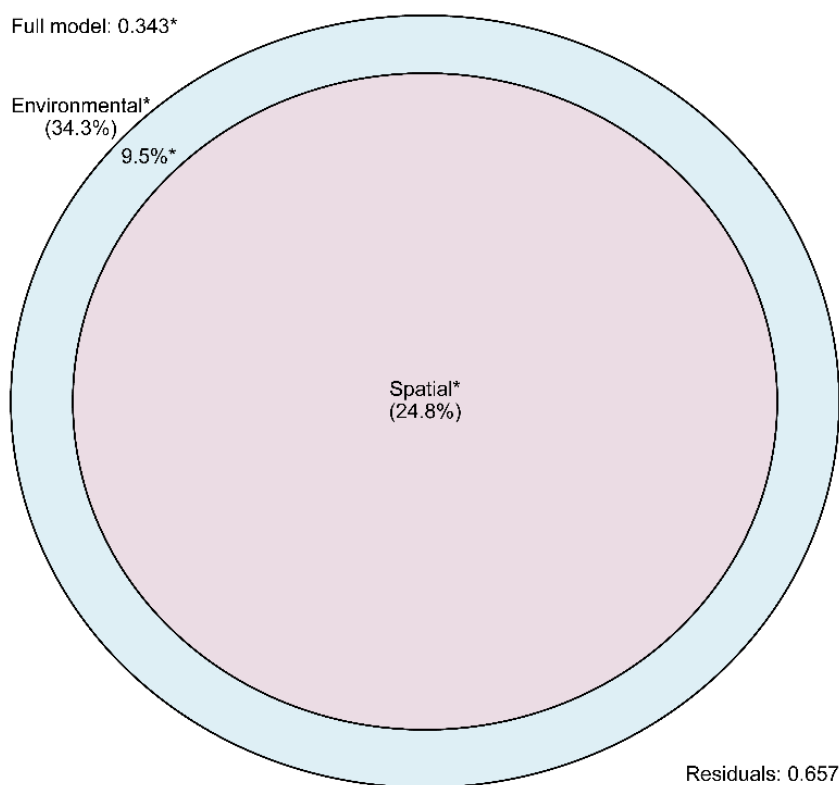


Figura 8. Diagrama de Venn representando o particionamento da variância dos loci AFLP sob seleção entre duas matrizes explicativas: ambiental e espacial. O tamanho dos círculos é proporcional à variância explicada por cada matriz, e a sobreposição entre eles indica a variação compartilhada entre as duas matrizes. Asteriscos próximos as frações explicadas indicam que a fração contribuiu significativamente para a estrutura dos loci.

Como forma de verificar como as variáveis contribuem para a estruturação encontrada, triplots das RDA e RDA parcial, representantes das duas frações encontradas, foram construídos. O gráfico do modelo completo (Fig. 9-A) indicou uma separação das populações TUR1 e TUR2 das demais populações, apresentando uma maior correlação com valores maiores de precipitação do mês mais húmido (BIO13). As populações MAN, FOZ1, FOZ2 e FOZ3 apresentaram maior relação com maiores valores de temperatura anual média (BIO1), temperatura média do trimestre mais seco (BIO9) e precipitação do trimestre mais frio (BIO19), mas as populações FOZ2 e FOZ3 tendem a apresentar valores levemente maiores de BIO9, enquanto FOZ1 e MAN de BIO19. Formando uma terceira nuvem de pontos, as populações CAN1, CAN2, CAN3, CAN4 e GUA tendem a apresentar maior isothermalidade, indicando que a temperatura ao longo do ano a que estas populações estão sujeitas é mais

constante do que das demais populações. O gráfico da RDA parcial (Fig. 9-B) indicou que os 9,55% da variação não espacial encontrada pode estar relacionada com o tipo de solo predominante do entorno de cada população, ou então com alguma outra variável correlacionada com o tipo de solo.

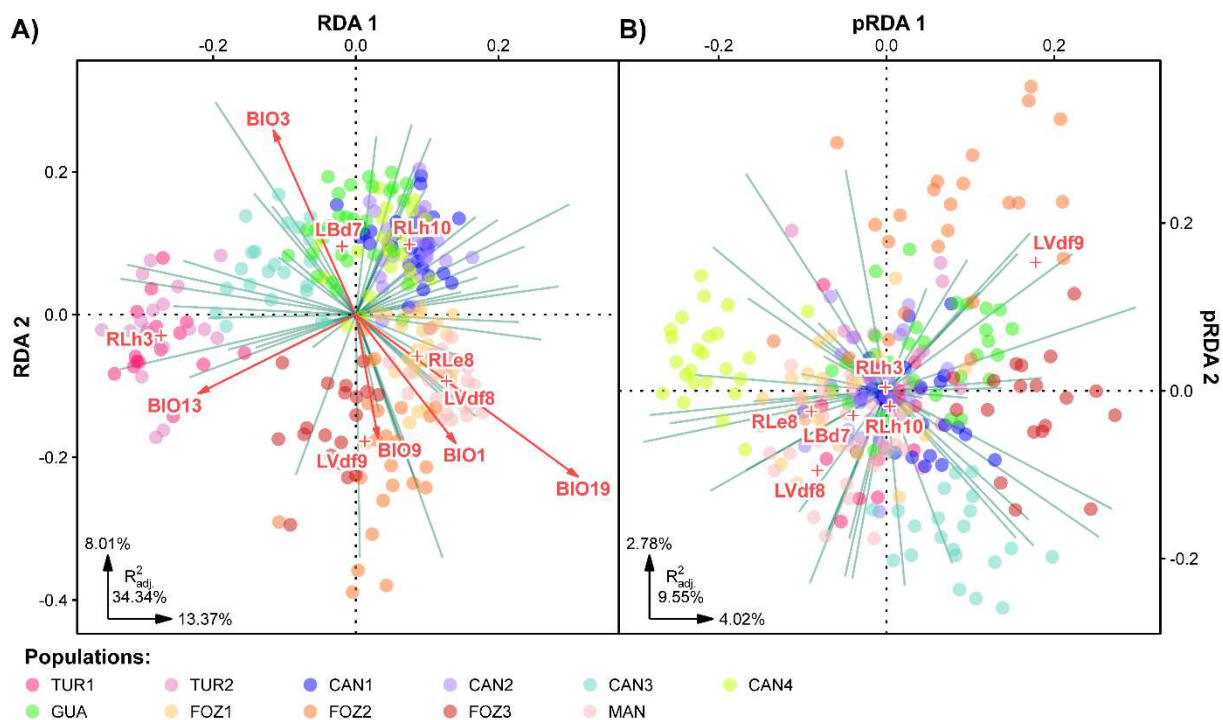


Figura 9. Resultados da análise de redundância (A) e análise de redundância parcial (B), baseadas em 47 loci de AFLP potencialmente sob seleção, mostrando o efeito de variáveis ambientalmente estruturadas e não estruturadas na variação dos loci nas populações. Setas e cruzes vermelhas indicam as variáveis correlacionadas com as populações, e as linhas verdes os loci mais relacionados com cada população. Coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}), para cada eixo canônico e para o modelo completo, estão indicados em cada gráfico.

Como uma boa parte da variância ficou sem explicação (65,7%), fizemos uma análise dos resíduos em busca de padrões que possam ajudar a explicar o que pode levar a diferenciação das populações. A análise indicou que existe uma diferença na dispersão multivariada dos resíduos de cada população, enquanto o teste de 'Diferença significativa honesta' de Tukey indicou a formação de possíveis quatro grupos com dispersões diferentes (Fig. 10). As populações CAN1 e CAN2 foram as que apresentaram menor variação, indicando que os seus indivíduos não variam muito ao remover o efeito exercido pelas variáveis ambientais, enquanto as populações GUA e FOZ2 são as que apresentam maior variação entre

os indivíduos. É possível notar na figura a formação de duas nuvens de pontos para a população FOZ2, indicando uma possível subdivisão nesta população.

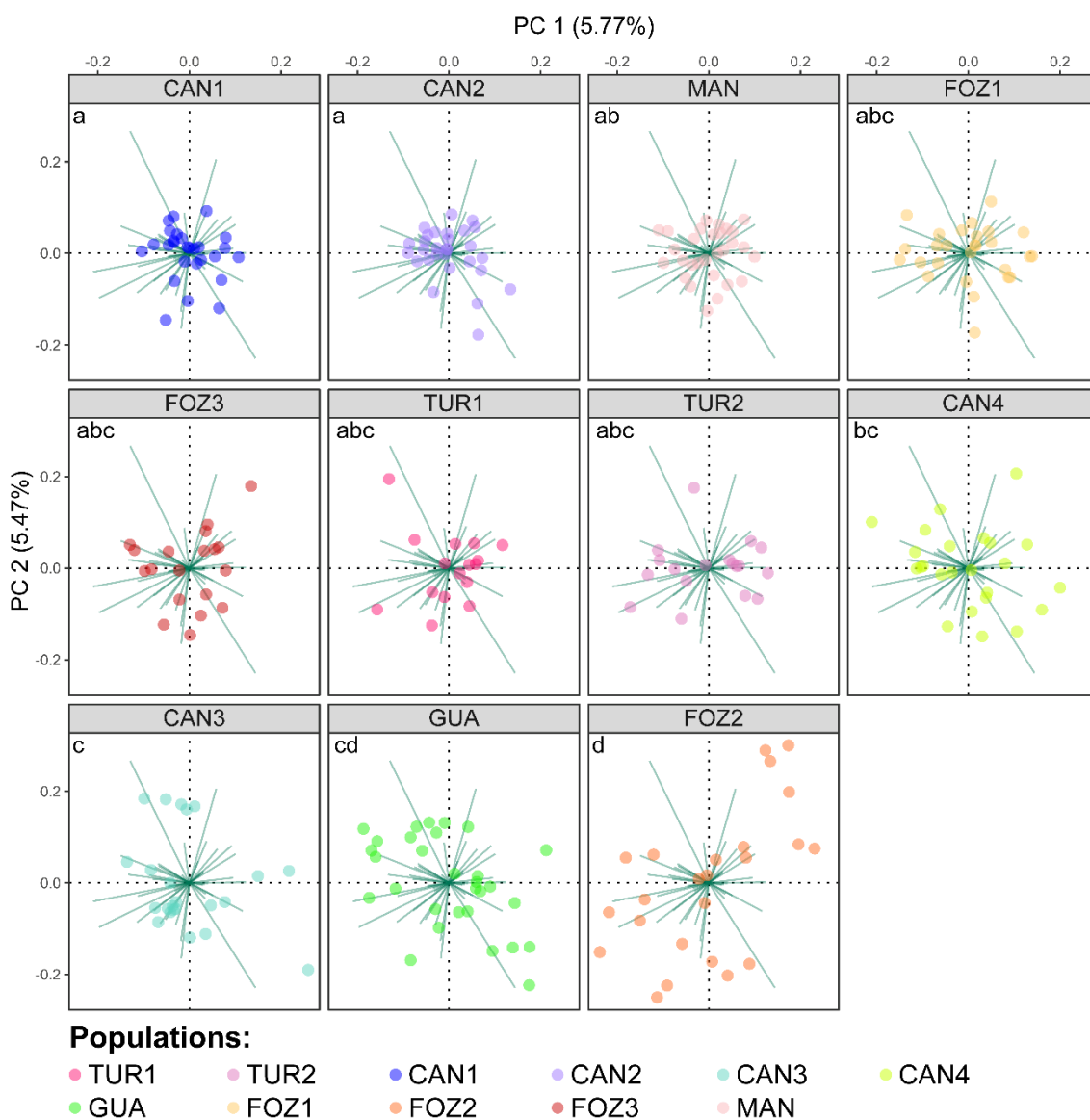


Figura 10. Resíduos da análise de redundância mostrando a variação da dispersão multivariada por população. As populações foram organizadas de acordo com a variação do resíduo e as letras em cada população indicam populações similares de acordo com o teste de 'Diferença significativa honesta' de Tukey (Tukey's HSD test).

DISCUSSÃO

A tratativa histórica do Brasil relacionada à proteção das áreas florestais, aponta para uma consciência conservacionista mais voltada à defesa da Floresta Amazônica e Mata Atlântica, do que ao Cerrado, à Caatinga, ao Pantanal e aos Campos Sulinos, que também são áreas naturais e igualmente importantes e, por este motivo, estes habitats acabaram sofrendo um atraso no quesito proteção legal (Crawshaw *et al.*, 2007, Carvalho *et al.*, 2008). Portanto, quando nos referimos aos Campos de Altitude do sul do Brasil, os que estão sob o domínio do bioma Mata Atlântica (Lei 11.428/061), mais precisamente os que estão sobre os afloramentos rochosos do Paraná, que abrigam uma flora particular, com alto nível de endemismo, deveríamos falar de um ambiente protegido pela referida Lei. No entanto, há uma escassez de estudos voltados para estes afloramentos e, os que existem, evidenciam seu negligenciamento, culminando numa lacuna de informações sobre a biodiversidade contida neste ecossistema, o que agrava ainda mais o risco de ameaça das espécies ali existentes, tão relevantes quanto as espécies de formações florestais (Overbeck *et al.*, 2007; Conama, 2010; Iganci *et al.*, 2011; Feliciano *et al.*, 2022). Por essa razão, estudos genético-populacionais são extremamente importantes para o desenvolvimento de medidas efetivas de conservação, norteando as melhores alternativas de prevenção das perdas desta flora tão peculiar.

Diante disso, o presente estudo fornece informações sobre a diversidade genética e estrutura populacional de *M. hatschbachii*, fundamentais para o entendimento do seu *status* genético, permitindo assim a elucidação dos processos evolutivos que têm moldado suas populações, e o estabelecimento de estratégias de conservação da espécie. *Mimosa hatschbachii* é endêmica de um habitat negligenciado, com distribuição restrita e ameaçada de extinção, o que coloca em sobreaviso a possibilidade de ser extinta em pouco tempo, uma vez que suas populações apresentaram baixos índices de diversidade genética, com uma diversidade total (H_T) de 0,12 (AFLP). Os índices observados no presente estudo são menores do que os

estimados, a partir de marcadores AFLP, para outras espécies endêmicas que também estão sob condições de isolamento geográfico, com baixa capacidade de distribuição, e em ambientes degradados como por exemplo, *Portulaca hatschbachii* (Portulacaceae) $H_T = 0,16$ (Feliciano *et al.*, 2022) e *Zephyranthes paranaensis* (Amaryllidaceae) $H_T = 0,17$ (Aprígio, 2021), de ocorrência nos mesmos afloramentos, bem como *Gypsophila struthium* (Caryophyllaceae) $H_T = 0,16$, uma planta endêmica e restrita dos afloramentos de gesso Ibérico (Martínez-Nieto *et al.*, 2013).

Em contrapartida *Rhododendron protistum* (Ericaceae), uma planta endêmica considerada altamente ameaçada, com apenas duas populações existentes em uma pequena área no sul da província de Yunnan, na China, apresentou níveis de diversidade genética maiores ($H_T = 0,24$; Wu *et al.*, 2015) do que *M. hatschbachii*, que possui uma área de ocorrência maior. O estudo sugere que algumas espécies raras e ameaçadas de extinção são capazes de manter os níveis de diversidade genética mesmo em pequenos tamanhos populacionais (Wu *et al.*, 2015). Entretanto, também é possível que espécies que tenham passado por eventos de gargalo genético recente, tenham seus índices reais de diversidade genética mascarados por valores satisfatórios de diversidade quando em estudos genético-populacionais (Barker *et al.*, 2009; Broquet *et al.*, 2010).

Todavia, em *Impatiens parviflora* (Balsaminaceae), uma espécie de ampla ocorrência, foi observado, com base nos marcadores AFLP, baixa diferenciação genética e baixos índices de diversidade (0,051 - 0,162) entre as populações (Jociené *et al.*, 2022), valores similares aos obtidos em *M. hatschbachii*, exceto pela baixa diferenciação. Espécies com ampla distribuição tendem a ter índices maiores de diversidade, no entanto não há uma regra, pois nem sempre é visto maiores níveis nestas (Jociené *et al.*, 2022), tampouco baixa diversidade para espécies endêmicas e restritas (Hutchinson & Templeton, 1999; Frey *et al.*, 2012; Fernández-Mazuecos *et al.*, 2014; Forrest *et al.*, 2017; Gaudeul *et al.*, 2019). Logo, para espécies

endêmicas e de distribuição limitada espera-se níveis de diversidade genética menores do que espécies amplamente distribuídas, pois estão mais sujeitas a processos evolutivos como a deriva genética, endogamia e seleção natural (Ellstrand & Elam, 1993; Cavalli & Winge, 2003), especialmente quando o hábitat não se encontra preservado e a manutenção da diversidade não pode ser garantida (Franks *et al.*, 2004; Martínez-Nieto *et al.*, 2013). Na verdade, muitos outros fatores influenciam os níveis de diversidade genética, como o sistema reprodutivo, tamanho efetivo populacional, interação dos polinizadores e a capacidade de dispersão das sementes, além de processos evolutivos como gargalo genético, efeito fundador, entre outros (Wright, 1978; Cavalli & Winge, 2003; Leimue *et al.*, 2006; Barrett, 2010; Frankham *et al.*, 2010).

Apesar da insuficiência de dados acerca do mecanismo de reprodução em *M. hatschbachii*, é possível que a espécie apresente produção reduzida de frutos, uma vez que algumas espécies do gênero são conhecidas por produzirem poucos frutos em ambientes naturais, devido a um sistema de autoincompatibilidade pós-zigótica, que resulta em aborto de sementes geradas pela autopolinização, dificultando a expansão da espécie (Barneby, 1991; Seijo & Neffa, 2004). Além disso, a antese de *M. hatschbachii* é diurna e o pólen é o único recurso oferecido (Barneby, 1991), aos visitantes florais (*Apis mellifera* e *Trigona* sp.) (Bawa, 1990; Stone *et al.*, 2003), no entanto, a eficiência de cada visitante floral como polinizador efetivo também não é conhecida. Posto isto, é possível que *M. hatschbachii* também produza frutos em número reduzido, o que somado ao potencial reduzido para expansão em áreas degradadas, como os afloramentos rochosos, impacta negativamente na manutenção da diversidade genética. Um cenário semelhante a esse pode ser observado na espécie *Paeonia decomposita* (Paeoniaceae), endêmica às regiões montanhosas da China, que apresenta distribuição restrita a áreas fragmentadas e tamanho populacional reduzido, onde a baixa produção de sementes dessa espécie e a falta de um mecanismo específico para dispersão de sementes a longa distância, reduz a taxa de regeneração das populações, expondo a espécie a

índices maiores de endogamia e deriva genética, o que contribui para sua categorização como espécie “Em perigo” de extinção (EN) (Qin *et al.*, 2017).

Além dos baixos níveis de diversidade genética, as populações de *M. hatschbachii* exibem ainda, baixo percentual de loci polimórficos, um padrão que pode sugerir que elas tenham passado por evento de gargalo genético, como proposto por Cornuet & Luikart (1996) e Piry, Luikart & Cornuet (1999). Outra evidência de possível gargalo genético é a presença de alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica ($<0,001$) tanto para os dados de ITS como para os dados de *rps16-trnK* (Avise *et al.*, 1987; Grant & Bowen, 1998). Ainda assim, o teste de neutralidade D de Tajima não foi significativo para nenhum dos marcadores (ITS e *rps16-trnK*) em nenhuma das populações amostradas e, portanto, as mesmas estariam em equilíbrio entre mutação e deriva. Entretanto, o poder dos testes estatísticos de neutralidade pode decair a partir da expansão e decorrer do tempo (Mendes *et al.*, 2018). No caso do teste D de Tajima, o mesmo não permite diferenciar eventos de expansão populacional da seleção purificadora, uma vez que, na seleção purificadora, espera-se um excesso de mutantes de baixa frequência, porque a seleção está removendo novas mutações que são deletérias, e na expansão populacional há um excesso de mutantes de baixa frequência porque todas as mutações são raras (Hahn *et al.*, 2002). É fato que, dos sete ribótipos identificados em *M. hatschbachii*, apenas o estiveram presentes em alta frequência, sendo os cinco restantes menos presentes na amostragem. Os dados de *rps16-trnK* também mostram que apenas o haplótipo H1 é frequente na amostragem, estando ausente apenas na população CAN4, evidenciando um excesso de mutantes, o que pode ser compatível com eventos recente de gargalo genético e iria ao encontro da situação dos habitats de ocorrência da espécie, onde a degradação constante proporcionaria a recolonização do afloramento por um número limitado de indivíduos.

Se considerarmos o maior número de fragmentos privados (20) e o maior índice de raridade (DW=1939,43), estimados a partir dos marcadores AFLP, os quais evidenciam

populações há mais tempo estabelecidas, devido maior acúmulo de mutações, podemos sugerir que a população mais ao sul do estado (MAN) seja a mais ancestral (Ehrich *et al.*, 2006; Ortiz *et al.*, 2008; Tremetsberger *et al.*, 2009). A partir de MAN, entretanto, não é possível visualizar um padrão claro de diminuição na distribuição dos fragmentos privados ou índices DW seja no sentido sul-norte, seja no sentido norte-sul. Também os dados de ITS e *rps16-trnK* não mostraram uma tendência em relação à distribuição dos ribótipos e haplótipos e, inclusive, foi de encontro dos dados de AFLP, evidenciando maior número de ribótipos para as populações TUR1 e FOZ3, o que poderia sugerir possível ancestralidade nessas duas. Entretanto, os dados gerados a partir da região ITS e *rps16-trnK* apresentam polimorfismo muito menor, quando comparados com os dados gerados pelos marcadores AFLP, tornando estes últimos mais eficientes nas inferências genético-populacionais (Frey *et al.*, 2012; Fernández-Mazuecos *et al.*, 2014; Salmerón-Sánchez *et al.*, 2014; Forrest *et al.*, 2017; Gaudeul *et al.*, 2019; Aprigio *et al.*, 2021; Feliciano *et al.*, 2022; Jocienè *et al.*, 2022).

A partir das análises de agrupamento Bayesiano (BAPS) e Minimum Spanning Network (MSN), podemos dizer que é possível observar que *M. hatschbachii* apresenta alta estruturação populacional. Ambas as análises evidenciam a formação dos mesmos três *clusters* genéticos (A - TUR1, TUR2), (B - CAN2, CAN1, CAN3, GUA e CAN4), (C - FOZ1, FOZ2, FOZ3 e MAN) com quase nenhuma mistura genética entre si, evidenciando um forte isolamento entre os agrupamentos genéticos e homogeneidade das amostras dentro de cada população. Corroborando os resultados do BAPS e MSN, a análise da variância molecular (AMOVA) mostrou uma alta estruturação genética entre as populações, a partir dos dados de AFLP ($F_{ST} = 0,17$), estando 16,9% da variação genética entre elas, ainda que a maior parte da variação genética se encontre dentro delas (83,1%), o que sugere um padrão de reprodução preferencial por alogamia. Mesmo ITS e *rps16-trnK* sendo menos informativos que os dados de AFLP, a análise da variância molecular para essas sequências também mostrou alta estruturação genética

entre as populações (ITS, $F_{ST} = 0,42$; *rps16-trnK*, e $F_{ST} = 0,44$), evidenciando um padrão de fluxo gênico restrito entre as populações. Quando analisados apenas os marcadores que não se encontram em processo de seleção natural, a estruturação genética diminui consideravelmente ($F_{ST} = 0,13$). Em contrapartida, a análise da variância molecular realizada a partir dos fragmentos de AFLP considerados sob seleção, pelo método Bayesiano (BayeScan), mostrou níveis de estruturação genética muito mais elevados entre as populações ($F_{ST} = 0,36$), evidenciando uma possível ação da seleção natural no processo de diferenciação populacional.

As estimativas de fluxo gênico, obtidas entre os pares de populações (Tabela 7), resultou, de maneira geral, em valores menores que 0,6 migrante por geração, abaixo do necessário para manter a diversidade genética e evitar a depressão por endogamia, como ressaltam Mills & Allendorf (1996) e Wang (2004). Entretanto, alguns pares de populações atingiram o número ideal de migrantes por geração ($Nm = 1$), como por exemplo CAN1 X CAN2 ($Nm = 6,06$), CAN1 X GUA ($Nm = 1,07$), FOZ2 X FOZ1 ($Nm = 1,66$), FOZ2 X FOZ3 ($Nm = 1,20$), as quais pertencem ao mesmo agrupamento genético encontrado pelo BAPS. Já as populações de CAN1 X FOZ1 ($Nm = 1,26$), CAN2 X FOZ1 ($Nm = 1,12$) apresentaram indivíduos misturados na MSN, mesmo não compondo o mesmo *cluster* na análise Bayesiana (BAPS), evidenciando mistura, ou seja, fluxo gênico em populações com menos de 38 km de distância. Uma vez que o fluxo gênico atua no aumento e manutenção da diversidade genética, pois homogeneiza as frequências alélicas, reduzindo os efeitos de deriva genética (Jones & Wang, 2012; Ellstrand, 2014), o fato de 49 dos 55 pares de populações apresentarem número insuficiente de migrantes por geração, causa preocupação quanto ao *fitness* adaptativo de *M. hatschbachii*.

Outro fator a ser discutido, é a descontinuidade dos afloramentos rochosos onde *M. hatschbachii* se encontra distribuída, os quais são de tamanhos limitados e isolados, tanto espacialmente quanto ecologicamente (Porembski, 2007). Estes habitats descontínuos são a

causa da presença dos patches genéticos observados no correlograma de Mantel. O correlograma de Mantel compara o valor médio de F_{ST} entre os pares de populações, presentes em uma dada classe de distância, contra o valor de F_{ST} das demais classes analisadas. Desta maneira, pares de populações que se encontram até 10,1 km de distância apresentam valor médio de F_{ST} significativamente menor que o F_{ST} médio das demais classes de distância, sendo, portanto, as populações dentro dessa classe de distância geneticamente mais similares entre si do que com as populações presentes nas demais classes. A partir desta distância, os valores de F_{ST} dentro de cada classe de distância vão se tornando cada vez maiores, entretanto, a correlação entre o F_{ST} e a distância geográfica deixa de ser significativa, ou seja, à medida que a distância geográfica aumenta os valores de F_{ST} sofrem pouca alteração, atingindo um platô na classe 5 (53,8 km; $F_{ST} = 0,21$). Isso sugere uma dispersão de pólen e sementes reduzidas, que impacta a capacidade de colonização das espécies endêmicas e restritas (Lavergne *et al.*, 2004), havendo uma maior similaridade entre populações vizinhas, devido às trocas alélicas serem mais prováveis, e sugere um possível modelo de estruturação populacional do tipo Stepping-Stone (Kimura & Weiss, 1964). Como consequência disso, a ação dos polinizadores pode ser impactada, pois além da distância, os recursos alimentares disponíveis também são reduzidos nesses ambientes, o que pode aumentar o cruzamento entre indivíduos aparentados (Serrote; Reiniger & Stefenon, 2016). Por essa razão, estratégias de conservação e manejo *in situ* e *ex situ*, com coleta de sementes e reintrodução de germoplasma (Wu *et al.*, 2015), são primordiais para salvaguarda da espécie.

De acordo com o proposto por Diniz-Filho e Telles (2002; 2006), a análise de correlação espacial, pode ser útil para definir unidades operacionais intraespecíficas para conservação da variabilidade genética. Considerando o resultado obtido com o correlograma de Mantel, apenas as populações com distância geográfica menor que 10,1 km apresentam composição genética semelhante, de maneira que populações nas demais classes de distância

são mais dissemelhantes. Portanto, com base nas conclusões de Diniz-Filho e Telles (2002; 2006) sobre a análise de correlação espacial, fica evidente que a identificação de unidades operacionais intraespecíficas é fundamental para a conservação da variabilidade genética em *M. hatschbachii*. A observação do correlograma de Mantel revelou que apenas as populações localizadas a uma distância geográfica inferior a 10,1 km compartilham uma composição genética semelhante, enquanto aquelas em classes de distância superiores mostram maior dissimilaridade genética. Diante disso, recomenda-se que os esforços para preservar a maior parte da variação genética dessa espécie e evitar redundâncias na amostragem do pool gênico se concentrem nas populações cuja distância genética entre si seja superior a 10,1 km, conforme proposto por Diniz-Filho e Telles (2002; 2006). Essa abordagem direcionada pode otimizar os planos de conservação, contribuindo para a eficácia e eficiência na preservação da diversidade genética de *M. hatschbachii*.

Desta maneira, a análise Bayesiana realizada pelo Bayescan identificou 47 (6%) fragmentos de AFLP sob possível processo de seleção diversificadora. Este número é menor do que o encontrado em outras espécies de plantas (Manel *et al.*, 2012; Shryock *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019), inclusive em *Portulaca hatschbachii*, de ocorrência restrita nos mesmos afloramentos rochosos do Terceiro Planalto Paranaense (Feliciano *et al.*, 2022). Apesar disso, a presença desses fragmentos evidencia a ação da seleção diversificadora na estruturação genética, uma vez que esta tende a aumentar a divergência genética entre as populações (Manel *et al.*, 2012; Shryock *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). Isso pode ser particularmente observado na AMOVA, onde o índice F_{ST} mais que dobrou quando analisados apenas os fragmentos sob seleção diversificadora. Ainda que os marcadores AFLP sejam considerados neutros, os valores de F_{ST} , detectados pelo Bayescan, são muito maiores do que os esperados em um cenário de neutralidade, o que nos leva a concluir que os

fragmentos sob seleção, muito provavelmente, estão pegando carona (desequilíbrio de ligação) com regiões gênicas responsáveis pelos processos de adaptação a condições específicas.

O particionamento da variância, realizado para evidenciar a contribuição das variáveis ambientais e espaciais na distribuição dos *loci* sob seleção, permitiu explicar 34,3% da variação total, tendo a variação ambiental englobado toda a variação espacial. Quanto à variação ambiental, 24,8% desta se encontra espacialmente estruturada e, portanto, apenas 9,5% da variação pode ser explicada pelas variáveis ambientais sem influência do espaço. Uma vez que não houve variação explicada unicamente pela matriz espacial, podemos dizer que as variáveis por nós utilizadas foram eficientes em modelar toda estrutura espacial presente na espécie.

Ainda assim, grande parte da variação (65,7%) ficou sem explicação, compondo o resíduo da análise, o que pode ser atribuído a processos neutros e/ou estocásticos ou a existência de variáveis ambientais não estruturadas espacialmente que não foram medidas pelo nosso modelo. Não obstante, as interações bióticas (e.g. competição e predação) e a presença de associações não lineares entre espaço/clima e os *loci* sob seleção, as quais não podem ser detectadas pela RDA, também podem ser a causa do grande percentual de variação não explicada (Borcard *et al.*, 1992; Borcard *et al.*, 2018; Gibson & Moyle, 2020). O grande percentual de resíduo (65,7%) mostra que as populações de *M. hatschbachii* apresentam menor relação com as variáveis ambientais do que a espécie *P. hatschbachii*, isso pode ser devido ao fato, dos indivíduos de *M. hatschbachii* se apresentarem mais diversos intrapopulacionalmente do que os indivíduos de *P. hatschbachii*, cuja homogeneidade intrapopulacional foi bem maior (Feliciano *et al.*, 2022). Nesse cenário, os *loci* sob adaptação seriam menos compartilhados pelos indivíduos, sugerindo que os alelos responsáveis pela adaptação local não foram, ainda, fixados nas populações, ou poderia existir subdivisão populacional.

O resíduo pode indicar, ainda, a presença de competição por recursos entre *M. hatschbachii* e outras espécies (Borcard *et al.*, 1992; Borcard *et al.*, 2018), visto as diferenças no padrão dentro das populações, como evidenciado pelo teste de Tukey. Nele é possível observar que as populações GUA e FOZ2 formam duas nuvens de pontos, indicando uma possível subdivisão nestas populações. O fato é que nas áreas onde foram coletados os indivíduos de FOZ2 e GUA, foram observados muitos indivíduos de *M. paupera*, uma das espécies invasoras do gênero e que coocorre com *M. hatschbachii*, podem estar pressionando seletivamente os indivíduos de *M. hatschbachii*, devido sua alta capacidade de adaptação à diferentes tipos de solo, rápido desenvolvimento e grande eficiência no uso de recursos (Barneby, 1997; Lowe *et al.*, 2000; Simon, 2011).

CONCLUSÃO

Neste estudo, utilizamos os marcadores AFLP, ITS e *rps16-trnK* para estimar os índices de diversidade e estrutura genética de *M. hatschbachii*. Os marcadores foram eficientes e geraram informações importantes acerca do *status* genético e dos processos evolutivos que moldam as populações da espécie. Os dados, mostraram que *M. hatschbachii*, possui alta estruturação e baixos índices de diversidade, o que, para uma espécie que já se encontra categorizada como “Em perigo” de extinção, é alarmante.

O fato de *M. hatschbachii* apresentar baixos índices de diversidade e uma alta estruturação, pode ser explicado devido a degradação e isolamento natural de seu hábitat, os Campos de Altitude do Sul do Brasil, mais precisamente os que estão sobre os afloramentos rochosos, inseridos no bioma Mata Atlântica. Esta descontinuidade natural dos afloramentos, que são caracterizados como ilhas terrestres, contribui para redução do fluxo gênico entre populações, uma vez que a espécie possui reprodução preferencialmente sexuada, dependente da disponibilidade de polinizadores. Somado a isso, o fato de a espécie provavelmente produzir poucas sementes tende a reduzir seu tamanho populacional, contribuindo para a redução da diversidade genética.

Dada a importância da diversidade genética no processo de adaptação evolutiva, os índices encontrados em *M. hatschbachii* são preocupantes, especialmente pelo fato da espécie já se encontrar ameaçada. Por essa razão, ações de conservação devem ser priorizadas, pois os riscos associados à perda de diversidade podem ser muito mais significativos quando observamos a velocidade de degradação que vêm sofrendo os afloramentos de sua ocorrência.

BIBLIOGRAFIA

- Alves FM, Sartori ALB, Zucchi MI, Azevedo-Tozzi AMG, Tambarussi EV, Alves-Pereira A, Souza AP. 2018.** Genetic structure of two *Prosopis* species in Chaco areas: a lack of allelic diversity diagnosis and insights into the allelic conservation of the affected species. *Ecology and Evolution* **8**: 6558–6574.
- Anderson, MJ. 2006.** Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. *Biometrics* **62**: 245–253.
- Aprigio, N. G., Feliciano, D. C., Ferraz, J. R., Da Silva, J. F. M., & De Godoy, S. M. 2021.** Diversidade genética e estruturação populacional da espécie endêmica do Paraná *Zephyranthes Paranaensis*. *Revista Multidisciplinar De Educação E Meio Ambiente*, 2(2), 12-12.
- Avise, JC, Arnold, J, Ball, RM, Bermingham, E, Lamb, T, Neigel, JE, Saunders, NC. 1987.** Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 489-522.
- Barker, J., Frydenberg, J., González, J. et al. 2009.** Bottlenecks, population differentiation and apparent selection at microsatellite loci in Australian *Drosophila buzzatii*. *Heredity* **102**: 389–401.
- Barneby, RC. 1991.** *Sensitivae censitae*: a description of the genus *Mimosa* Linnaeus (Mimosaceae) in the new world. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **65**:1-835.
- Barrett SCH. 2010.** Understanding plant reproductive diversity. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences* **365**: 99-109.
- 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* **17**: 360-368.
- Bawa, KS. 1990.** Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Annual review of Ecology and Systematics*, 21(1), 399-422.
- Blanchet G, Legendre P, Borcard D. 2008.** Forward selection of spatial explanatory variables. *Ecology* **89**: 2623–2632.
- Belliemi G, Comin-Chiaramonti P, Marques LS, Melfi AJ, Nardy AJR, Papatrechas C, Piccirillo EM, Roisenberg A, Stolfa D. 1986.** Petrogenetic aspects of acid and basaltic lavas from the Paraná Plateau (Brazil): geological, mineralogical and petrochemical relationships. *Journal of Petrology* **27**: 915–944.
- Bonin A, Ehrich D, Manel S. 2007.** Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: A toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology* **16**: 3737–3758.
- Borcard D, Gillet F, Legendre P. 2018.** *Numerical ecology with R*. New York: Springer.
- Borcard D, Legendre P, Drapeau P. 1992.** Partialling out the spatial component of ecological variation. *Ecology* **73**: 1045–1055.
- Borcard D, Legendre P. 2002.** All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. *Ecological Modelling* **153**: 51–68.

BRASIL. Lei 4771/1965. Código Florestal Brasileiro (online) <http://www.planalto.gov.br/ccivil03/leis/L4771.htm>.

Buckner, JC, Sanders, RC, Faircloth, BC, & Chakrabarty, P. 2021. The critical importance of vouchers in genomics. *Elife*, 10, e68264.

Caccavari, M. A. 1986. Estudio de los caracteres del polen en las Mimosa-Lepidotae. *Pollen et Spores*, 28(1), 29-42.

Caccavari, M.A. 1986b. Nuevos aportes al conocimiento de las tetrades de Mimosa (Leguminosae, Mimosoideae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, v. 24, n. 3-4, p. 333-342.

Carvalho P.C.F., Paruelo J. & Ayala W. 2008. Estado Actual y Perspectivas del Bioma Campos. In: *Bioma Campos: Innovando para Mantener su Sustentabilidad y Competitividad*. Tradinco, Montevideo, pp. 29-40.

Cavalli SS, Winge H. 2003. Variabilidade genética em populações naturais. In: Freitas LB, Bered F. *Genética e Evolução Vegetal*. Porto Alegre: UFRGS. p.165-175.

Chen H. 2022. VennDiagram: generate high-resolution Venn and Euler plots. R package version 1.7.3. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=VennDiagram>. Accessed 26 February 2023.

Clement, M., Posada, D. C. K. A., & Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular ecology*, 9(10), 1657-1659.

Conama Resolução 423/10. 2010. Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), Brasil. 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*. Brasília: Diário Oficial da União.

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.

Corander J, Tang J. 2007. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Mathematical Biosciences* 205: 19–31.

Corander J, Waldmann P, Marttinen P, Sillanpää MJ. 2004. BAPS 2: Enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* 20: 2363–2369.

Cornuet JM, Luikart G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001–2014.

Crawshaw D., Dall’Agnol M., Cordeiro J.L.P. & Hasenack H. 2007. Caracterização dos campos sul-rio-grandenses: uma perspectiva da ecologia da paisagem. *Boletim Gaúcho de Geografia* 33: 233-252.

Cria (Centro de Referência e Informação Ambiental). 2020. Specieslink - simple search. Available at: <http://www.splink.org.br/index> (Accessed 06 August 2022).

DECRETO N° 5.746, DE 5 DE ABRIL DE 2006 EMENTA: Regulamenta o art. 21 da Lei n° 9.985, de 18 de julho de 2000, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza. Texto - Publicação Original.

Dejaco T, Gassner M, Arthofer W, Schlick-Steiner BC, Steiner FM. 2016. Taxonomist's Nightmare ... Evolutionist's Delight: an integrative approach resolves species limits in jumping bristletails despite widespread hybridization and parthenogenesis. *Systematic Biology* **65**: 947–974.

Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15.

Dray S, Legendre P, Peres-Neto PR. 2006. Spatial modelling: a comprehensive framework for principal coordinate analysis of neighbour matrices (PCNM). *Ecological Modelling* **196**: 483–493.

Dray S, Bauman D, Blanchet G, Borcard D, Clappe S, Guenard G, Jombart T, Larocque G, Legendre P, Madi N, Wagner HH. 2022. adespatial: multivariate multiscale spatial analysis. R package version 0.3-20. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=adespatial>. Accessed 26 February 2023.

Dulmolin-Lapègue, S.; Demesure, B.; Fineschi, S.; Corre, V.L.; Petit, R.J. 1997. Phylogeographic structure of white oaks 40 throughout the European continent. *Genetics*, v.146, n.4, p.1475-1487, 1997.

Escudero, A, Iriondo, JM, Torres, M. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation*, **113(3)**: 351-365.

Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, **32(5)**, 1792-1797.

Ehrich D. 2006. AFLPdat: a 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.

Ellstrand NC. 2014. Is gene flow the most important evolutionary force in plants? *American Journal of Botany* **101**: 737 – 753.

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.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479–491.

Ewing, B., & Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research*, **8(3)**, 186-194.

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.

Feliciano, DC, De Godoy, SM, Da Silva, JFM, Góes, BD, Ferraz, JR, De Oliveira Santos, Ruas, PM & De Fátima Ruas, C. 2022. Landscape genetics reveal low diversity and adaptive

divergence in *Portulaca hatschbachii* (Portulacaceae): an endangered species endemic to rocky outcrops of the Atlantic Forest. *Botanical Journal of the Linnean Society*.

Fernández-Mazuecos M, Jiménez-Mejías P, Rotllan-Puig X, Vargas P. 2014. Narrow endemics to Mediterranean islands: moderate genetic diversity but narrow climatic niche of the ancient, critically endangered *Naufraga* (Apiaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **16**: 190-202.

Fick SE, Hijmans RJ. 2017. Worldclim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* **37**: 4302–4315.

Forrest A, Escudero M, Heuertz M, Wilson Y, Cano E, Vargas P. 2017. Testing the hypothesis of low genetic diversity and population structure in narrow endemic species: the endangered *Antirrhinum charidemi* (Plantaginaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **183**:260–270.

Frankham R, Ballou J, Briscoe D. 2010. *Introduction to conservation genetics*, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press.

Franks, S J, Richards, CL, Gonzales, E, Cousins, JE, & Hamrick, JL. 2004. Multi-scale genetic analysis of *Uniola paniculata* (Poaceae): a coastal species with a linear, fragmented distribution. *American Journal of Botany*, *91*(9), 1345-1351.

Frey DJ, Haag CR, Kozłowski G, Tison JM, Mraz, P. 2012. High genetic and morphological diversity despite range contraction in the diploid *Hieracium eriophorum* (Asteraceae) endemic to the coastal sand dunes of south-west France. *Botanical Journal of the Linnean Society* **169**: 365-377.

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**: 927–939.

Fu Qin Wu, Shi Kang Shen, Xin Jun Zhang, Yue Hua Wang, Wei Bang Sun. 2015. Genetic diversity and population structure of an extremely endangered species: the world's largest *Rhododendron*, *AoB PLANTS*, Volume 7, plu082.

Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, *147*(2), 915-925.

Gao RR, Zhang WP, Wu HT, Zhang RM, Zhou HX, Pan HP, Zhang YJ, Brown JK, Chu D. 2014. Population structure of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), an invasive species from the Americas, 60 Years after Invading China. *International Journal of Molecular Sciences* **15**: 13388–13402.

Gaudeul M, Delahaye T, Muller S. 2019. AFLP markers show low levels of clonal propagation and high genotypic diversity in the rare, southernmost populations of *Linnaea borealis* L. (Caprifoliaceae) in the Western Alps. *Genetica* **147**, 79–90.

Godoy SM, Silva JFM, Ruas PM, Ritter MR, Paula GBN, Maffei EMD, Góes BD, Ruas CF. 2019. Multilocus approach reveals a complex evolutionary history of the invasive mile-a-minute plant, *Mikania micrantha* (Asteraceae), in its natural habitat. *Botanical Journal of the Linnean Society* **191**: 188–215.

Gonçalves-Oliveira RC, Wöhrmann T, Benko-Iseppon AM, Krapp F, Alves M, Wanderley M das GL, Weising K. 2017. Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): the role of pollination vs. seed dispersal and evolutionary implications. *American Journal of Botany* **104**: 868–878.

Grant, W. A. S., & Bowen, B. W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of heredity*, *89*(5), 415-426.

Green P. 1999. *Documentation for PHRAP.* Available at: <http://www.phrap.org/phredphrap/phrap.html>. Accessed 6 April 2022.

Guan, B, Gao, J, Chen, W, Gong, X, Ge, G. 2021. The Effects of Climate Change on Landscape Connectivity and Genetic Clusters in a Small Subtropical and Warm-Temperate Tree. *Frontiers in Plant Science*, 12.

Gutiérrez-López, N., Ovando-Medina, I., Salvador-Figueroa, M., Molina-Freaner, F., Avendaño-Arrazate, C. H., & Vázquez-Ovando, A. 2016. Unique haplotypes of cacao trees as revealed by trnH-psbA chloroplast DNA. *PeerJ*, *4*, e1855.

Hahn, M. W., Rausher, M. D., & Cunningham, C. W. 2002. Distinguishing between selection and population expansion in an experimental lineage of bacteriophage T7. *Genetics*, *161*(1), 11-20.

Hartl DL, Clark AG. 2006. *Principles of Population Genetics*. 4th edn. Sunderland: Sinauer Associates.

Harrell Jr F. 2022. Hmisc: Harrell Miscellaneous. R package version 4.7-0. Available at: <https://cran.r-project.org/package=Hmisc>. Accessed 26 February 2023.

Hutchinson DW, Templeton AR. 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* **53**: 1898–1914.

Iganci JRV, Heiden G, Miotto SV, Pennington RT. 2011. Campos de Cima da Serra: The Brazilian Subtropical Highland Grasslands show an unexpected level of plant endemism. *Botanical Journal of the Linnean Society* **167**: 378–393.

Jocienė, L., Stravinskaitė, K., Krokaitė, E., Janulionienė, R., Rekašius, T., Paulauskas, A., ... & Kupčinskienė, E. 2022. AFLP-Based Genetic Structure of Lithuanian Populations of Small Balsam (*Impatiens parviflora* DC.) in Relation to Habitat Characteristics. *Forests*, *13*(8), 1228.

Jones OR, Wang J. 2012. A comparison of four methods for detecting weak genetic structure from marker data. *Ecology and evolution* **2**: 1048 – 1045.

Jordan R, Hoffmann AA, Dillon SK, Prober SM. 2017. Evidence of genomic adaptation to climate in *Eucalyptus microcarpa*: implications for adaptive potential to projected climate change. *Molecular Ecology* **26**: 6002–6020.

Kamvar ZN, Brooks JC and Grünwald NJ. 2015. Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Frontiers in Genetics* **6**: 208.

Kamvar ZN, Tabima JF and Grünwald NJ. 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* **2**: e281.

Kimura M, Weiss GH. 1964. The steppingstone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* **49**: 561.

Lambdon, P. W., Pyšek, P., Basnou, C., Hejda, M., Arianoutsou, M., Essl, F., ... & Zikos, A. 2008. Alien flora of Europe: species diversity, temporal trends, geographical patterns and research needs. *Preslia*, *80*(2), 101-149.

Latch EK, Dharmarajan G, Glaubitz JC, Rhodes OE. 2006. Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conservation Genetics* **7**: 295–302.

LEI Nº 11.428, DE 22 DE DEZEMBRO DE 2006 Dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, e dá outras providências.

Legendre P, Gallagher ED. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* **129**: 271–280.

Leimu R, Mutikainen P, Koricheva J, Fischer M. 2006. How general are positive relationships between plant population size, fitness, and genetic variation? *Journal of Ecology* **94**: 942–952.

Leray, M, Knowlton, N, Ho, SL, Nguyen, BN, & Machida, RJ. 2019. GenBank is a reliable resource for 21st century biodiversity research. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(45), 22651-22656.

Li, X.; Yang, Y.; Robert, J.H.; Maurizio, R.; Wang, Y.; Shilin, C. 2015. Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews*, v.90, n.1, p.157-166.

Li YL, Xue DX, Zhang BD, Liu JX. 2019. Population genomic signatures of genetic structure and environmental selection in the catadromous roughskin sculpin *Trachidermus fasciatus*. *Genome Biology and Evolution* **11**: 1751–1764.

Maddison DR, Maddison WP. 2019. *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.61.* Available at: <http://www.mesquiteproject.org/>. Accessed 6 April 2022.

Maddison DR, Wheeler TJ, Maddison WP. 2016. *Align: a Mesquite package for aligning sequence data. Version 1.8.* Available at: <https://www.mesquiteproject.org/Align.html>. Accessed 6 April 2022.

Mangiafico S. 2022. rcompanion: Functions to Support Extension Education Program Evaluation. R package version 2.4.16. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=rcompanion>. Accessed 26 February 2023.

Manel S, Gugerli F, Thuiller W, Alvarez N, Legendre P, Holderegger R, Gielly L, Taberlet P; IntraBioDiv Consortium. 2012. Broad-scale adaptive genetic variation in alpine plants is driven by temperature and precipitation. *Molecular Ecology* **21**: 3729–3738.

Martinelli G, Moraes MA. 2013. *Livro vermelho da flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Martínez-Nieto, M. I., Segarra-Moragues, J. G., Merlo, E., Martínez-Hernández, F., & Mota, J. F. 2013. Genetic diversity, genetic structure and phylogeography of the Iberian endemic *Gypsophila struthium* (Caryophyllaceae) as revealed by AFLP and plastid DNA

sequences: connecting habitat fragmentation and diversification. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 173(4), 654-675.

Mendes, C. B., Norenburg, J. L., Solferini, V. N., & Andrade, S. C. 2018. Hidden diversity: Phylogeography of genus *Ototyphlonemertes* Diesing, 1863 (Ototyphlonemertidae: Hoplonemertea) reveals cryptic species and high diversity in Chilean populations. *Plos one*, 13(4), e0195833.

Mills LS, Allendorf FW. 1996. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology* 10: 1509-1518.

Ministério do Meio Ambiente – Brasil. 2000. *Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos*. Brasília: MMA/SBF.

Naimi B, Hamm Na, Groen TA, Skidmore AK, Toxopeus AG. 2014. “Where is positional uncertainty a problem for species distribution modelling.” *Ecography*, 37: 191-203.

Nei M, Li W-H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 5269-5273.

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*, Sunderland: Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press.

Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin PR, O’Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2022. vegan: community ecology package. R package version 2.6-2. Available at: <https://cran.r-project.org/package=vegan>. Accessed 26 February 2023.

Ortiz MA, Tremetsberger K, Terrab A, Stuessy TF, García-Castanõ JL, 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.

Overbeck GE, Müller SC, Fidelis A, Pfdenhauer J, Pillar VD, Blanco CC, Boldrini II, Both R, Forneck ED. 2007. Brazil’s neglected biome: the South Brazilian Campos. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 9: 101-116.

Peterson, AT, Moyle, RG, Nyári, ÁS, Robbins, MB, Brumfield, RT, & Remsen, JV. 2007. The need for proper vouchers in phylogenetic studies of birds.

Peres-Neto PR, Legendre P, Dray S, Borcard D. 2006. Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology* 87: 2614–2625.

Piry S, Luikart G, Cornuet JM. 1999. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90: 502–503.

Pometti CL, Bessega CF, Cialdella AM, Ewens M, Saidman BO, Vilardi JC. 2019. Evidence of local adaptation and stabilizing selection on quantitative traits in populations of the multipurpose American species *Acacia aroma* (Fabaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 191: 128–141.

Porembski S, Martinelli R, Ohlemüller R, Barthlott W. 1994. Vegetation of rock outcrops in Guinea: granite inselbergs, sandstone table mountains, and ferricretes – remarks on species numbers and endemism. *Flora* **189**: 315–326.

Porembski S. 2007. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Brazilian Journal of Botany* **30**: 579–586.

Porembski, S, Barthlott, W. 2000. *Inselbergs: Biotic Diversity of Isolated Rock Outcrops in Tropical and Temperate Regions*. Ecological Studies 146, Berlin.

QGIS Development Team. 2016. QGIS 2.14.0 *geographic information system. Open-source geospatial foundation project*. Available at: <https://www.qgis.org/en/site/> (Accessed 8 July 2022).

Qin HN, Yang Y, Dong SY, He Q, Jia Y, Zhao LN, et al. 2017. Threatened species list of China's higher plants. *Biodivers Sci.*; 25: 696–744.

R Core Team. 2022. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <https://www.R-project.org/>. Accessed 26 February 2023.

Razgour, O, Forester, B, Taggart, JB, Bekaert, M, Juste, J, Ibáñez, C, Manel, S. 2019. Considering adaptive genetic variation in climate change vulnerability assessment reduces species range loss projections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(21), 10418-10423.

Robert Wyatt and Sara R. Lipow. 2021. Reproductive biology of *Mimosa microphylla* and *Albizia julibrissin* (Fabaceae: Caesalpinioideae) with a new explanation for the evolution of polyads, restricted stigmas, and polycarpely in the mimosoid clade. *The Journal of the Torrey Botanical Society* 148(2), 97-108.

Salmerón-Sánchez, E., Merlo, M. E., Medina-Cazorla, J. M., Pérez-García, F. J., Martínez-Hernández, F., Garrido-Becerra, J. A., ... & Mota, J. F. 2014. Variability, genetic structure and phylogeography of the dolomitophilous species *Convolvulus boissieri* (Convolvulaceae) in the Baetic ranges, inferred from AFLPs, plastid DNA and ITS sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 176(4), 506-523.

Schönswetter P, Tribsch A. 2005. Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). *Taxon* **54**: 725 –732.

Scobie, A. R., & Wilcock, C. C. 2009. Limited mate availability decreases reproductive success of fragmented populations of *Linnaea borealis*, a rare, clonal self-incompatible plant. *Annals of Botany*, 103(6), 835-846.

Seijo, J. G., & Solis Neffa, V. G. 2004. The cytological origin of the polyads and their significance in the reproductive biology of *Mimosa bimucronata*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 144(3), 343-349.

Serrote, CML, Reiniger, LRS, Stefenon, VM. 2016. *Simulações em genética de população e conservação de recursos florestais*. Jundiáí: Paco Editorial.

Shryock DF, Havrilla CA, DeFalco LA, Esque TC, Custer NA, Wood TE. 2017. Landscape genetic approaches to guide native plant restoration in the Mojave Desert. *Ecological Applications* **27**: 429–445.

- Soares, TN, Chaves, LJ, de Campos Telles, M P, Diniz-Filho, JAF, & Resende, LV. 2008.** Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* (“baru” tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. *Genetica*, **132**: 9-19.
- Sun Y, Skinner DZ, Liang GH, Hulbert SH. 1994.** Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* **89**: 26–32.
- Stone BW, Ward A, Farenwald M, Lutz AW, Wolfe AD. 2019.** Genetic diversity and population structure in Cary’s beardtongue *Penstemon caryi* (Plantaginaceae), a rare plant endemic to the eastern Rocky Mountains of Wyoming and Montana. *Conservation Genetics* **20**: 1149–1161.
- Stone, GN, Raine, NE, Prescott, M, & Willmer, PG. 2003.** Pollination ecology of acacias (Fabaceae, Mimosoideae). *Australian Systematic Botany*, *16*(1), 103-118.
- Tajima, F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, *123*(3), 585-595.
- Telles, MPDC, Collevatti, RG, Braga, RDS, Castro, TG, Costa, MCD, Silva Júnior, NJD, Diniz Filho, JAF. 2014.** Geographical genetics of *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnaeu, 1855) (Siluriformes, Pimelodidae) in the Amazon basin. *Genet Mol Res.* **9**;13(2):3656-66.
- Templeton, A. R., Crandall, K. A., & Sing, C. F. 1992.** A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, *132*(2), 619-633.
- Tremetsberger K, Urtubey E, Terrab A, Baeza CM, Ortiz MA, Talavera M, König C, Tensch EM, Kohl G, Talavera S, Stuessy TF. 2009.** Pleistocene refugia and polytopic replacement of diploids by tetraploids in the Patagonian and Subantarctic plant *Hypochaeris incana* (Asteraceae, Cichorieae). *Molecular Ecology* **18**: 3668– 3682.
- Vekemans X. 2002.** *AFLP-SURV version 1.0. Laboratoire de Genetique et Ecologie Vegetale.* Universite Libre de Bruxelles, Belgium. Available at: <http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/aflp-surv.html> (Accessed 6 June 2022).
- Vidaller C, Baumel A, Juin M, Dutoit T, Bischoff A. 2020.** Comparison of neutral and adaptive differentiation in the Mediterranean grass *Brachypodium retusum*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **192**: 536–549.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van De Lee T, Hornes M, Frijtera A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, ZabeaUM. 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407-4414.
- Wambugu, PW, Henry, R. 2022.** Supporting in situ conservation of the genetic diversity of crop wild relatives using genomic technologies. *Molecular Ecology*, **31**(8): 2207-2222.
- Wang, S. Q. 2020.** Genetic diversity and population structure of the endangered species *Paeonia decomposita* endemic to China and implications for its conservation. *BMC Plant Biology*, **20**: 1-14.
- Wang J. 2004.** Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. *Conservation Biology* **18**: 332-343.

Wei T, Simko V. 2021. corrplot: Visualization of a Correlation Matrix. R package version 0.92. Available at: <https://github.com/taiyun/corrplot>. Accessed 26 February 2023.

Wilkinson S, Haley C, Alderson L, Wiener P. 2011. An empirical assessment of individual-based population genetic statistical techniques: application to British pig breeds. *Heredity* **106**: 261–269.

Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan LD, François R, Grolemund G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, Pedersen TL, Miller E, Bache SM, Müller K, Ooms J, Robinson D, Seidel DP, Spinu V, Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H. 2019. “Welcome to the tidyverse.” *Journal of Open-Source Software*, 4(43), 1686.

Wright S. 1978. *Evolution and the genetics of populations: variability within and among populations*. v.4. Chicago: University of Chicago.

Wyse Jackson PS, Akeroyd JR. 1994. Guidelines to be Followed in the Design of Plant Conservation or Recovery Plans. *Council of Europe: Strasbourg, France*.

Wu FQ, Shen SK, Zhang XJ, Wang YH, Sun WB. 2015. Genetic diversity and population structure of an extremely endangered species: the world’s largest Rhododendron. *AoB PLANTS* **7**: plu082.

Xiong Y, Xiong J, Yu Q, Zhao J, Lei X, Dong Z, Yang J, Song S, Peng Y, Liu W, Bai S, Ma X. 2020. Genetic variability and structure of an important wild steppe grass *Psathyrostachys juncea* (Triticeae: Poaceae) germplasm collection from north and central Asia. *PeerJ* **8**: e9033.

Zhang, J. Q., Meng, S. Y., & Rao, G. Y. 2014. Phylogeography of *Rhodiola kirilowii* (Crassulaceae): a story of Miocene divergence and Quaternary expansion. *PLoS One*, **9**(11), e112923.

Zhivotovsky LA. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology* **8**: 907–913.

6. CAPÍTULO 2

ARTIGO ORIGINAL

Perfil genético de espécies endêmicas e ameaçada de extinção dos afloramentos rochosos da Mata Atlântica

Daniele Cassiano Feliciano^{1*}, Sara Mataroli de Godoy¹, Claudete de Fátima Ruas¹.

¹ *General Biology Department, Biological Science Center, Universidade Estadual de Londrina, PoBox 10011, 86057-970 Londrina, PR, Brazil*

*Corresponding author. E-mail address: daniele.cassiano@uel.br (D. C. Feliciano)

Running title: Diversidade Genética de três espécies ameaçadas *Nierembergia hatschbachii*, *Stylosanthes vallsii* e *Eryngium corallinum*

Artigo a ser submetido na revista:
Botanical Journal of the Linnean Society
Impact Factor
2.828
5-year Impact Factor
3.922

RESUMO

Os Campos do Sul do Brasil, mais precisamente os Campos de Cima da Serra, são habitats sob forte impacto antrópico no estado do Paraná, Brasil. Estes afloramentos são como patches de tamanho limitados, podendo ser considerados “ilhas terrestres”. Em consequência do seu isolamento ecológico e espacial, os afloramentos rochosos abrigam uma flora rara, endêmica e adaptada, onde ocorrem, por exemplo, as espécies *Nierembergia hatschbachii*, *Stylosanthes vallsii* e *Eryngium corallinum*. Devido à escassez de conhecimentos sobre aspectos genéticos e biológicos destas espécies, o presente estudo teve como objetivo acessar a diversidade e estrutura genética de suas populações naturais, para compreender a dinâmica evolutiva dessas espécies no ambiente. Para isso, dados moleculares foram obtidos pelos marcadores AFLP. No geral foi observado baixa diversidade genética e alta estruturação populacional nas três espécies avaliadas, padrão já encontrado também em outras espécies endêmicas da mesma área, sugerindo que a dispersão via pólen entre os afloramentos é limitada. Assim, como estratégias de conservação, é altamente recomendado que as espécies sejam preservadas *in situ*, pois além da proteção dos indivíduos também haveria a proteção destes habitats, contribuindo para manutenção das interações dos indivíduos e os processos evolutivos, visto que nenhuma destas áreas é prevista em unidades de conservação.

Palavras-chave: AFLP - espécies raras - estruturação genética - fluxo gênico restrito - genética de populações

INTRODUÇÃO

Altos níveis de diversidade genética são primordiais para a manutenção do potencial evolutivo, especialmente as ameaçadas, desempenhando um papel importante no processo de formulação de estratégias de conservação (Milligan *et al.*, 1994; Margules & Pressey, 2000; Rodrigues *et al.*, 2013). As estimativas de diversidade de espécies de ocorrência em habitat degradados, especialmente os isolados e restritos, têm sido abordadas em vários trabalhos (Gaudeul *et al.*, 2004; Aprígio, 2021; Gastauer *et al.*, 2021; Chagas *et al.*, 2022; Ruas *et al.*, 2020; Feliciano *et al.*, 2022), uma vez que o isolamento e a descontinuidade do habitat, afetam potencial de polinização, limitando o fluxo gênico, contribuindo para estruturação das populações e perda de diversidade (Frankham, Ballou & Briscoe, 2010; Ruas *et al.*, 2020; Feliciano *et al.*, 2022).

Os afloramentos rochosos de basalto do Paraná, inseridos no bioma Mata Atlântica, compondo os Campos de Altitude do Sul do Brasil (Overbeck *et al.*, 2007; Iganci *et al.* 2011; Longhi-Wagner *et al.* 2012), recentemente tratados como Campos de Cima da Serra (Overbeck *et al.*, 2022) e considerados habitats isolados de tamanho limitado, também tidos como “ilhas terrestres”, devido ao seu isolamento ecológico e espacial (Porembski, 2007; Burke, 2012). Estas áreas, abrigam uma flora endêmica (Iganci *et al.*, 2011) e ameaçada de extinção, causada pela extração do substrato rochoso e introdução de gramíneas invasoras utilizadas para pastagens (Nabinger *et al.*, 2000), que acabam por recobrir toda a superfície dos afloramentos, competindo com a flora nativa (Feliciano *et al.*, 2022), pouco conhecida, sem contar que todos os afloramentos estão em propriedades privadas, distantes de qualquer Área de Preservação Permanente, Unidades de Conservação ou Parques Estaduais. Lamentavelmente, as áreas de Campos protegidas ocorrem entremeados junto às florestas de Araucária dos Parques Nacionais dos Aparados da Serra, da Serra Geral, e de São Joaquim (norte do RS e SC, respectivamente;

Overbeck *et al.*, 2007) e nenhuma destas Unidades de Conservação contempla, ao menos alguma parte dos afloramentos amostrados.

Visto que a degradação dos habitats naturais, causada pelas ações antrópicas, provoca uma rápida diminuição no número de indivíduos, o que para espécies raras e endêmicas se torna um problema ainda maior, no presente estudo três espécies endêmicas aos afloramento rochosos foram examinadas: *Eryngium corallinum* Mathias & Constance (Mathias; Constance, 1958), categorizada como “Críticamente em Perigo” (CR) no Livro Vermelho da flora do Brasil (Martinelli & Moraes 2013), e *Nierembergia hatschbachii* A.A.Cocucci & Hunz (Cocucci & Hunziker 1993) e *Stylosanthes vallsii* Sousa Costa & Van den Berg (Costa & Van den Berg 2009), cujos estados de conservação sequer foram avaliados. Por essa razão, a diversidade genética e dinâmica populacional destas espécies foi investigada, através da aplicação dos marcadores moleculares AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VOS *et al.*, 1995), visando gerar informações que respaldem órgãos competentes e possa incentivar a concretização dos planos de manejo e conservação dessas áreas, bem como para a proteção das espécies de ocorrência, particularmente as que já se encontram em risco de extinção.

MATERIAL E MÉTODOS

ESPÉCIES DO ESTUDO:

Em um estudo sobre a distribuição fitogeográfica e conservação das espécies de plantas vasculares exclusivas do estado do Paraná, Brasil, realizado por Ferraz e colaboradores em 2016 (dados não publicados), foi possível observar a grande biodiversidade e endemismo exibidos pelos afloramentos rochosos de basalto do Paraná. Neste estudo, uma lista inicial foi compilada a partir da *Lista de espécies da flora do Brasil* (LFB: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>) e do *Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono sur* (Zuloaga *et al.*, 2008), posteriormente, as espécies da lista inicial foram revisadas para confirmar a exclusividade ao Paraná, com base na literatura taxonômica especializada e o banco de dados SpeciesLink (<http://smlink.cria.org.br>). Foi também avaliado, o estado de conservação das espécies da lista final e verificado usando os bancos de dados do Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFLORA: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal>) e da lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (Red List IUCN: <http://www.iucnredlist.org>). As espécies ausentes dos bancos de dados do CNCFLORA e da Red List IUCN foram avaliadas seguindo os critérios da IUCN (2012, 2014) e constam classificadas por este estudo.

NIEREMBERGIA HATSCHBACHII

Nierembergia hatschbachii A é uma erva rizomatosa com 10–25 cm de altura, folhas basais elípticas e apicais linear-lanceoladas, tricomas simples antrorsos distribuídos por toda a planta (exceto na corola), flores hermafroditas brancas e axilares, corola salveforme e estiletos maiores que os estames (Cocucci & Hunziker 1993). Embora seja bem representada em herbários, os frutos e sementes de *N. hatschbachii* são desconhecidos. As flores de *Nierembergia* não possuem nectários, sendo o único gênero da família Solanaceae que oferece óleos não voláteis ao invés de pólen e néctar aos seus visitantes florais (Cocucci, 1991). A biologia reprodutiva de *N. hatschbachii* ainda não foi investigada, mas estudos anteriores

registraram sistema de autoincompatibilidade e abelhas coletoras de óleo como polinizadoras exclusivas em diversas espécies de *Nierembergia* (Coccuci, 1991; Cosacov *et al.*, 2008; Nattero *et al.*, 2010).



Figura 1. *Nierembergia hatschbachii*.

STYLOSANTHES VALLSII

Stylosanthes vallsii Sousa Costa & Van den Berg (Fabaceae) (Fig. 2) é uma espécie endêmica dos Campos de Cima da Serra do Paraná, crescendo em afloramentos rochosos de basalto. Esse subarbusto perene possui ramos prostrados com até 25 cm de comprimento, que se ramificam a partir de uma raiz central engrossada, sendo os indivíduos encontrados isoladamente ou muito adensados (Costa & Van den Berg 2009). As suas flores são papilionadas e organizadas em espigas axilares ou apicais, com cálice esverdeado e lacínios ciliados, pétalas amarelas, sendo o estandarte suborbicular marcado com estrias roxas, asas obovadas e pétalas da quilha falciformes, cada uma com um gancho, estames dimórficos, e fruto do tipo lomento com 1–2 artículos férteis (Costa & Van den Berg, 2009). Não existem

dados de biologia reprodutiva ou de polinização para *S. vallsii*. As características florais do



Figura 2. *Stylosanthes vallsii*.

ERYNGIUM CORALLINUM

Eryngium corallinum Mathias & Constance (Apiaceae) é uma erva perene e endêmica dos Campos de Cima da Serra dos Estados do Paraná e Santa Catarina (Cardozo *et al.* 2021), crescendo em depressões úmidas de afloramentos rochosos de basalto, encontrada em pequenos agrupamentos. Fértil de setembro a abril com dispersão zoocórica (Mathias; Constance, 1958). Das sete subpopulações conhecidas de *E. corallinum*, seis são encontradas no Paraná e apenas uma em Santa Catarina, que representa o limite sul de sua distribuição geográfica. Embora a espécie seja regularmente coletada no Paraná desde o ano de sua descrição (1958), em Santa Catarina a subpopulação não é amostrada desde 1964. Durante expedições realizadas pelo taxonomista José Roberto Ferraz, entre os anos de 2020 e 2021 no município de Campo Erê (Santa Catarina), localidade tipo da espécie, não foi possível recoletar

indivíduos de *E. corallinum*. A vegetação de Campo Erê, assim como grande parte da encontrada na região sul do Brasil, foi suprimida e convertida em áreas de cultivo agrícola o que pode ter contribuído com a redução ou até mesmo extinção de subpopulações, incluindo a de *E. corallinum* (Ferraz, dados não publicados).

Eryngium corallinum é a menor espécie do gênero que ocorre no Paraná, com 13–38 cm de altura, sendo bem caracterizada por suas folhas oblanceoladas pinatipartida-aculeadas, flores inconspícuas organizadas em inflorescências capituliformes, brancas ou verdes e frutos do tipo mericarpo cobertas por excrescências (Mathias & Constance 1958, Cardozo *et al.*, 2021). A biologia reprodutiva e a ecologia da polinização continuam sendo lacunas de conhecimento para essa espécie e para *E. ramboanum* Mathias & Constance, que tem aspectos da morfologia floral similares.

Quanto a sua conservação, *Eryngium corallinum* (Fig. 3) é uma espécie rara e ameaçada de extinção (Hatschbach 1995) e foi classificada como “Criticamente em Perigo” (CR) no Livro Vermelho da flora do Brasil (Martinelli & Moraes 2013). A principal ameaça a essa espécie é a expansão agropecuária, que coloca em risco a sua limitada área de ocupação (< 10 km²) (Martinelli & Moraes 2013).



Figura 3. *Eryngium corallinum*

CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE OCORRÊNCIA E AMOSTRAGEM

Os Campos de Altitude do Sul do Brasil, onde se encontram os afloramentos rochosos de basalto, são áreas que abrigam uma flora considerada rara, e estão distribuídos entremeados aos mais diversos tipos de vegetação, incluindo ecossistemas florestais (Floresta Ombrófila Mista, Florestas Estacional Decidual e Semidecidual) e herbáceos arbustivos (Campo e Cerrado), além de paisagens rurais, com plantações de monoculturas (soja, milho, trigo etc.), silviculturas, estradas e rodovias. Os afloramentos rochosos de basalto que compõe os Campos de Cima da Serra (OVERBECK *et al.*, 2007; OVERBECK *et al.*, 2022) estão inseridos no bioma Mata Atlântica (ANDRADE *et al.*, 2019) e com base em espécies indicadoras da comunidade vegetal (CONAMA, 2010), são considerados uma das principais áreas de endemismo (IGANCI *et al.*, 2011; PLÁ *et al.*, 2020).

Dentre as espécies endêmicas dos Campos de Cima da Serra, foram amostradas as populações de *Eryngium corallinum*, que contemplou toda sua área de distribuição, conforme

os dados do CNCFlora. No entanto, não há descrição das áreas de ocorrência de *Stylosanthes vallsi*, tampouco *Nierembergia hatschbachii* em bancos de dados como o CNCFlora. Foram amostrados um total de 180 espécimes para cada uma das três espécies, constituindo as coletas de *S. vallsi* e *N. hatschbachii* os primeiros registros de ocorrência para essas espécies nos referidos afloramentos (Fig.4).

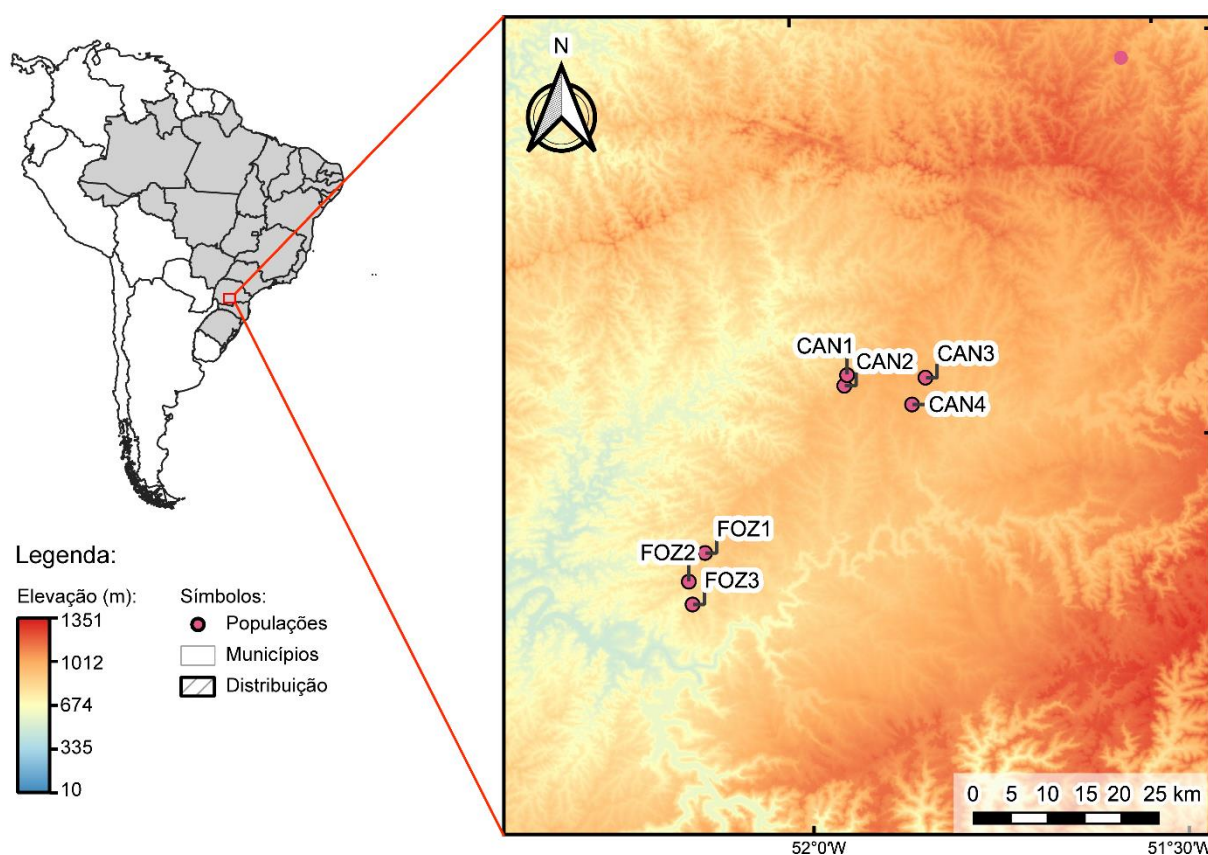


Figura 4. Mapa da área de ocorrência mostrando a localização e altitude das populações coletadas de *Nierembergia hatschbachii*, *Stylosanthes vallsi* e *Eryngium corallinum*, no Paraná, Brasil. As siglas são equivalente as iniciais dos municípios de coleta, onde: CAN1, CAN2, CAN3 e CAN4 da cidade de Candói e FOZ1, FOZ2 e FOZ3 de Foz do Jordão.

Exsicatas foram confeccionadas para confirmação taxonômica da espécie e depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Londrina. Os vouchers de depósito, bem como as coordenadas geográficas, altitude e municípios de origem das populações se encontram na Tabela 1. Em cada afloramento, foram coletadas folhas jovens, com distância mínima entre

elas de 15 m, as quais foram armazenadas em sílica gel até a completa secagem, para posterior extração do DNA total.

Tabela 1. Informações das amostras utilizadas para inferir a diversidade genética e a estrutura populacional de *Nierembergia hatschbachii*, *Stylosanthes vallsii* e *Eryngium corallinum*. O nome das populações com código de acordo com o local de coleta, coordenadas de latitude e longitude, altitude em metros e número do voucher por exemplar, estão detalhados abaixo.

População (código)	Coordenadas	Elevação (m)	Voucher* por espécie		
			<i>N. hatschbachii</i>	<i>S. vallsii</i>	<i>E. corallinum</i>
Candói (CAN1)	25°25'12.07"S; 51°54'24.51"W	934	FUEL 56152	FUEL 56172	FUEL 56163
Candói (CAN2)	25°25'58.60"S; 51°54'38.37"W	943	FUEL56151	FUEL 56173	FUEL 56162
Candói (CAN3)	25°25'25.24"S; 51°48'5.99"W	953	FUEL 56149	FUEL 56180	FUEL 56179
Candói (CAN4)	25°27'22.66"S; 51°49'11.68"W	936	**	**	FUEL 56158
Foz do Jordão (FOZ1)	25°38'6.82"S; 52° 5'57.81"W	886	FUEL56148	FUEL 56178	FUEL 56160
Foz do Jordão (FOZ2)	25°40'12.02"S; 52° 7'17.56"W	868	FUEL56150	FUEL 56174	FUEL 56161
Foz do Jordão (FOZ3)	25°41'52.23"S; 52° 7'0.50"W	838	FUEL56153	FUEL 56171	**

*FUEL, Herbário da Universidade Estadual de Londrina.

** , não ocorrência da espécie no afloramento.

EXTRAÇÃO DE DNA E APLICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES AFLP

A extração do DNA total foi realizada segundo o protocolo utilizado por Feliciano e colaboradores (2022). A técnica de AFLP foi realizada conforme o protocolo descrito por Vos *et al.* (1995), com modificações propostas por Godoy *et al.* (2019). As quatro combinações mais polimórficas e reprodutíveis foram selecionadas e aplicadas a todas as amostras, sendo: (6-FAM) *EcoRI*-AGC / *MseI*-CTAG; (VIC) *EcoRI*-ATC / *MseI*-CTTC; (NED) *EcoRI*-ACC / *MseI*-CTC; (PET) *EcoRI*-ACG / *MseI*-CTA. O primer *EcoRI* foi marcado com fluorescência para posterior resolução em sistema de eletroforese automatizada, seguindo os parâmetros propostos por Feliciano e colaboradores (2022). Para as análises dos dados, foi utilizado o software GeneMaPPer[®] v.4.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), usando bin automático de 1 pb para gerar a matriz binária de cada combinação de primers. Amostras que

não apresentam padrão satisfatório de amplificação foram retiradas das análises para evitar vieses na interpretação dos dados.

Os parâmetros de diversidade genética para os dados de AFLP, como o número e percentual de loci polimórficos (LP e PLP) e diversidade genética (HJ) (análogo ao H_e de Nei) (Nei, 1978), foram estimados no software AFLP-SURV v.1.0 (Vekemans, 2002). Os números de fragmentos privados (FP), foram inferidos pelo software FAMD (Schlueter & Harris, 2006), e índice de raridade (DW), estimado por meio do pacote AFLPDAT (Ehrich, 2006) no ambiente R v. 4.2.1 (R Core Team, 2022). A diversidade genética foi inferida utilizando abordagem Bayesiana com prior de distribuição das frequências de alelos não uniforme, dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Zhivotovsky, 1999), que mostra estimativas das frequências de alelos nulos, mesmo quando há desvios moderados do equilíbrio (Bonin, Ehrich & Manel, 2007).

Realizou-se a análise bayesiana de agrupamento foi realizada para as 3 espécies e suas respectivas populações (*N. hatschbachii*; *S. vallsii*; *E. corallinum*), realizada no software BAPS v.6.0 (Corander *et al.*, 2008), inicialmente uma análise sem mistura (*mixture*) foi feita para a formação dos agrupamentos genéticos (*clusters*) para cada espécie (Corander & Tang, 2007) sem considerar informações populacionais como prior (Corander *et al.*, 2004) e posteriormente uma outra análise com mistura (*admixture*), para verificar a possível mistura genotípica ancestral entre os clusters identificados (Corander & Marttinen, 2006). A distribuição da variação genética, dentro e entre populações, foi avaliada por meio da análise da variância molecular (AMOVA) (Excoffier; Smouse & Quattro, 1992), foi utilizado o software Arlequin v. 3.5.1.3 (Excoffier; Laval & Schneider, 2005). As relações entre as populações e os indivíduos das três espécies, *Nierembergia hatschbachii*, *Stylosanthes vallsii* e *Eryngium corallinum* foram visualizadas através de uma Minimum Spanning Network (MSN), construída para cada espécie separadamente, por meio do pacote poppr (Kamvar, Tabima &

Grünwald, 2014; Kamvar, Brooks & Grünwald, 2015) implementado no ambiente R v. 4.2.1 (R Core Team, 2022), utilizando-se a distância genética de Nei-Li (Nei & Li, 1979).

RESULTADOS

DIVERSIDADE GENÉTICA

Os fragmentos de AFLP foram gerados a partir da combinação de quatro primers seletivos (*EcoRI*-AGC (6-FAM) / *MseI*-CTAG); *EcoRI*-ATC (VIC) / *MseI*-CTTC; *EcoRI*-ACC (NED) / *MseI*-CTC; *EcoRI*-ACG (PET) / *MseI*-CTA), aplicados para as três espécies. Foram gerados 404 fragmentos de AFLP para 172 indivíduos *N. hatschbachii*, dos quais 395 foram polimórficos (98 %). Já em *S. vallsii* foram utilizados 173 indivíduos, que geraram 321 fragmentos de AFLP, sendo 298 polimórficos (93%). Em *E. corallinum*, foram avaliados 161 indivíduos, que geraram 352 fragmentos, sendo 96% polimórficos. Os dados detalhados sobre o polimorfismo gerado a partir das quatro combinações estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Dados dos fragmentos gerados pelas combinações de primers de AFLP, das três espécies estudadas.

<i>Nierembergia hatschbachii</i>				
Primers	Frag.	Mono	Poli	%
<i>EcoRI</i> -AGC (6-FAM) / <i>MseI</i> -CTAG	64	4	60	93,75
<i>EcoRI</i> -ATC (VIC) / <i>MseI</i> -CTTC	73	1	72	98,63
<i>EcoRI</i> -ACC (NED) / <i>MseI</i> -CTC	158	3	155	98,10
<i>EcoRI</i> -ACG (PET) / <i>MseI</i> -CTA	109	1	108	99,08
<i>Stylosanthes vallsii</i>				
Primers	Frag.	Mono	Poli	%
<i>EcoRI</i> -AGC (6-FAM) / <i>MseI</i> -CTAG	60	2	58	96,67
<i>EcoRI</i> -ATC (VIC) / <i>MseI</i> -CTTC	66	1	65	98,48
<i>EcoRI</i> -ACC (NED) / <i>MseI</i> -CTC	108	15	93	86,11
<i>EcoRI</i> -ACG (PET) / <i>MseI</i> -CTA	87	5	82	94,25
<i>Eryngium corallinum</i>				
Primers	Frag.	Mono	Poli	%
<i>EcoRI</i> -AGC (6-FAM) / <i>MseI</i> -CTAG	64	1	63	98,44
<i>EcoRI</i> -ATC (VIC) / <i>MseI</i> -CTTC	67	4	63	94,03
<i>EcoRI</i> -ACC (NED) / <i>MseI</i> -CTC	125	6	119	95,20
<i>EcoRI</i> -ACG (PET) / <i>MseI</i> -CTA	96	2	94	97,92

Primer, combinação de primer *EcoRI* + *MseI*; **Frag**, número de fragmentos gerados; **Mono**, número de fragmentos monomórficos gerados; **Poli**, números de fragmentos polimórficos gerados; **%**, percentual de fragmentos.

Foi possível observar que o maior percentual de fragmentos polimórficos (LP%) foi encontrado em *N. hatschbachii* foi a espécie que apresentou maiores valores para o PLP (47,73%), DW (738,45), Fp (11) e Ht (0,18), seguida por *E. corallinum* (PLP: 44,85%, DW: 627,75, Fp: 10,5, Ht: 0,17) e finalmente *S. vallsii* (PLP: 41,26%, DW: 531,55, Fp: 6,5, Ht: 0,15).

Sobre as estimativas de diversidade genética total (H_T), encontramos o maior valor para a espécie *N. hatschbachii* (0,18), seguindo de *E. corallinum* (0,17) e *S. vallsii* (0,15). Os índices de diversidade genética populacional (H_j) tiveram variações entre 0,12, nas populações de CAN1 e CAN3 de *S. vallsii*, sendo considerados os mais baixos e de 0,16 em CAN1, CAN2, CAN3, FOZ1 de *N. hatschbachii* e em *E. corallinum* na população de CAN1, sendo considerados os mais altos. A descrição de todos os índices estimados, para cada espécie e população, se encontra na Tabela 3.

Tabela 3. Índices de diversidade genética das populações de *Nierembergia hatschbachii*, *Stylosanthes vallsii* e *Eryngium corallinum*, obtidos com base nos marcadores AFLP.

<i>Nierembergia hatschbachii</i>						
População	N	LP	LP%	Hj	Fp	DW
CAN1	26	198	49	0,16	25	1199,38
CAN2	28	208	51,5	0,16	4	611,48
CAN3	30	190	47	0,16	8	823,74
FOZ1	28	195	48,3	0,16	11	674,01
FOZ2	30	187	46,3	0,15	8	603,96
FOZ3	30	179	44,3	0,14	10	518,14
Média	28,67	192,83	47,73	0,16	11	738,45
<i>Stylosanthes vallsii</i>						
População	N	LP	LP%	Hj	Fp	DW
CAN1	28	113	37,9	0,12	7	620,31
CAN2	29	135	45,3	0,15	6	530,65
CAN3	27	112	37,6	0,12	2	362,17
FOZ1	30	124	41,6	0,13	8	498,30
FOZ2	29	118	39,6	0,14	9	649,25

FOZ3	30	136	45,6	0,15	7	528,60
Média	28,83	123	41,27	0,14	6,5	531,55
<i>Eryngium corallinum</i>						
População	N	LP	LP%	Hj	Fp	DW
CAN1	26	164	46,6	0,16	9	655,83
CAN2	30	170	48,3	0,15	14	732,14
CAN3	25	154	43,8	0,15	6	499,14
CAN4	26	161	45,7	0,15	11	625,70
FOZ1	26	139	39,5	0,13	12	568,63
FOZ2	28	159	45,2	0,14	11	684,98
Média	26,83	158	44,85	0,15	10,5	627,75

N, número de indivíduos analisados para dados AFLP; LP, número de fragmentos polimórficos; LP%, proporção de fragmentos polimórficos; Hj, índice de diversidade genética (análogo a He – Nei, 1978); Fp, fragmento privado; DW, índice de raridade (estimado como marcadores ponderados por frequência);

ESTRUTURA POPULACIONAL E FLUXO GÊNICO

Para as 6 populações de *N. hatschbachii* (Fig. 5), o BAPS encontrou o melhor *marginal likelihood* estimado (-20915.6035) para $K = 5$, com probabilidade posterior máxima ($p = 1$). O primeiro *cluster* (azul), agrupou os indivíduos da população de CAN1, o segundo (lilás) as amostras da população de CAN2, o terceiro (verde) a população de CAN3, o quarto *cluster* (amarelo) a população de FOZ1, e quinto agrupamento (vermelho) foi composto pelos indivíduos das populações de FOZ2 e FOZ3. As populações de CAN3 e FOZ3, não tiveram nenhuma mistura entre os indivíduos, entretanto, foi observado alguma mistura genotípica ancestral nas populações de CAN1, CAN2, FOZ1 e FOZ2.

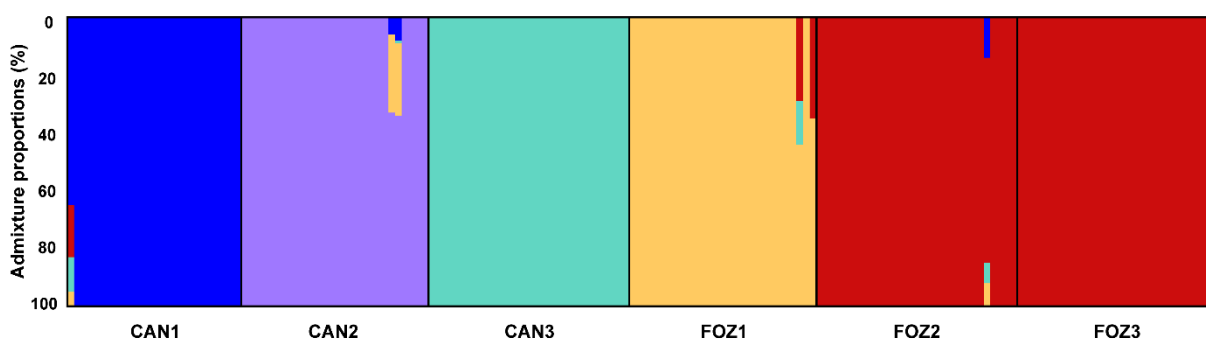


Figura 5 Agrupamentos por Inferência Bayesiana realizada pelo BAPS para 6 populações de *Nierembergia hatschbachii*. Foram encontrados 5 *clusters* distintos com o melhor resultado de $K = 5$ agrupamentos (probabilidade marginal -20915.6035, probabilidade posterior 1), a partir de 404 fragmento de AFLP.

Diante da mesma análise de Inferência Bayesiana, realizada para as 6 populações de *S. vallsii* foram encontrados 3 *clusters* geneticamente distintos (melhor *likelihood* = -14563.4279; $p = 1$) (Fig. 6). Nesta espécie, o primeiro *cluster* (verde) foi formado pela população de CAN1, o segundo *cluster* (laranja) foi formado pelas populações de CAN2, FOZ2 e FOZ 3, e por fim, o terceiro *cluster* (roxo) foi composto pelas populações CAN3 e FOZ1. Alguns indivíduos das populações CAN1, CAN2, FOZ1 e FOZ3 apresentaram mistura genética, já os *clusters* CAN3 e FOZ2 não apresentaram nenhuma.

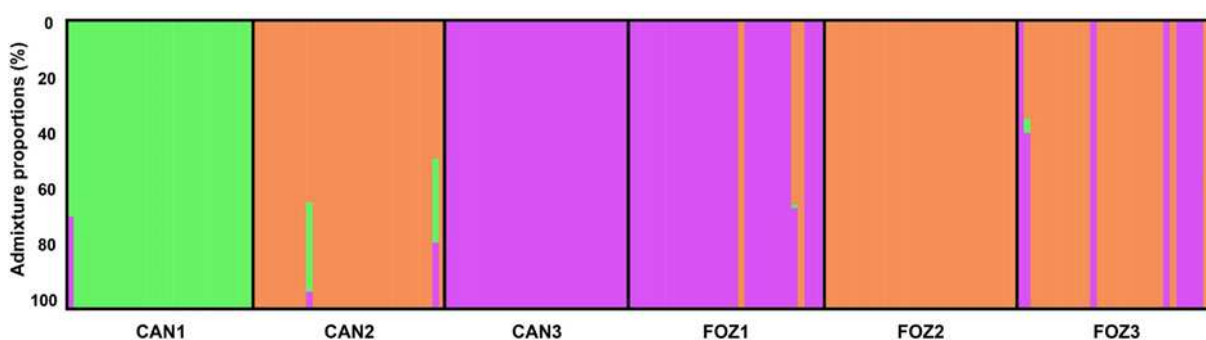


Figura 6. Agrupamentos por Inferência Bayesiana realizada pelo BAPS para 6 populações de *Stylosanthes vallsii*. Foram formados 3 *clusters* distintos com o melhor resultado de $K = 3$ agrupamentos (probabilidade marginal -14563.4279, probabilidade posterior 1), a partir de 321 fragmento de AFLP.

Para as 6 populações de *E. corallinum*, 3 *clusters* geneticamente distintos se formaram (Fig.7) sendo o melhor marginal *likelihood* estimado = -16395.1813, com probabilidade posterior máxima ($p = 1$). Na observação da composição dos grupos formados em *E. corallinum*, vemos que no primeiro *cluster* (verde) a maior parte dos indivíduos são da população de CAN1, o segundo *cluster* (laranja) é formado pelos indivíduos das populações CAN2, CAN3 e CAN4, já o terceiro *cluster* (roxo), é composto pelas populações de FOZ1 e FOZ2. Podemos também observar que as populações CAN2 e FOZ1 não apresentaram nenhuma mistura ancestral, embora tenha a presença do pool gênico delas em outros grupos. As populações de CAN1, CAN3, CAN4 e FOZ2, apresentaram mistura genotípica ancestral, sendo as populações de CAN1 e CAN4 com o maior número de indivíduos com mistura, embora CAN3 e FOZ2 tenham apresentado apenas um indivíduo em cada uma com alguma mistura.

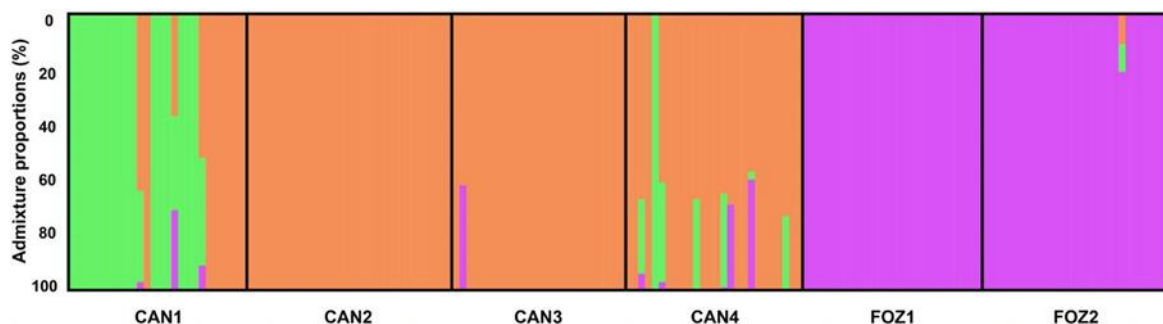


Figura 7. Agrupamentos por Inferência Bayesiana realizada pelo BAPS para 6 populações de *Eryngium corallinum*. Foram formados 3 *clusters* distintos com o melhor resultado de $K = 3$ agrupamentos (probabilidade marginal -16395.1813, probabilidade posterior 1), a partir de 352 fragmento de AFLP.

A Minimum Spanning Network construída para as populações de *N. hatschbachii*, mostrou braços com pouca mistura de indivíduos, colocando no grupo A, as amostras de FOZ3 e FOZ2, seguido do grupo B, que compõe um ramo pequeno, agrupando os indivíduos de FOZ1. No braço C, um ramo agrupou todos os indivíduos de CAN3, sendo estes mais próximos de FOZ1. No braço D, os indivíduos de CAN1 se agruparam, sendo mais próximos de CAN2. As amostras de CAN2, compuseram o braço E, sendo estes também mais próximos de FOZ1. Nesta espécie podemos observar pouca mistura entre as populações, corroborando com a homogeneidade dos agrupamentos encontrados pelo BAPS.

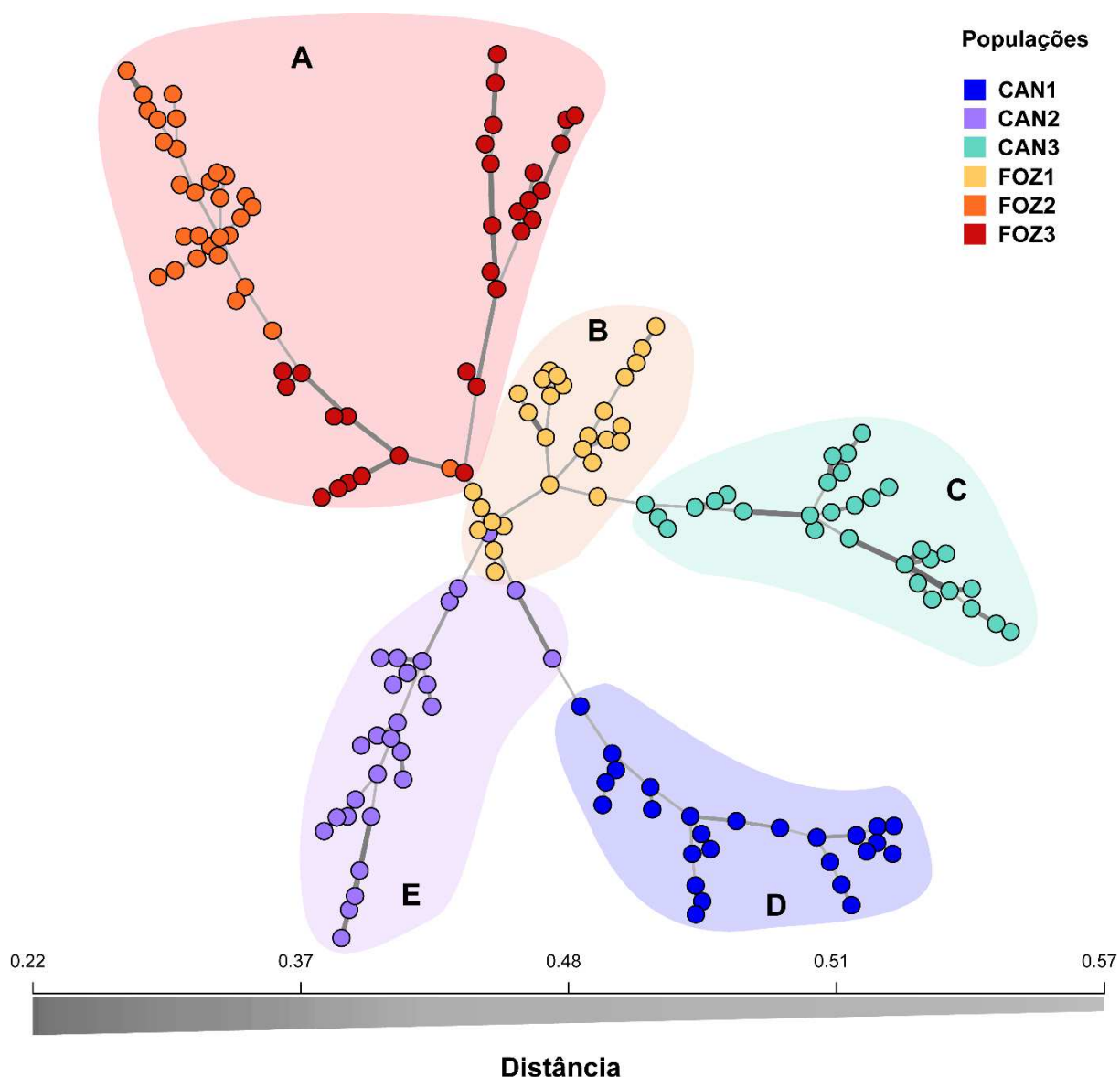


Figura 8. Minimum Spanning Network (MSN) mostrando as relações evolutivas entre 6 populações de *Nierembergia hatschbachii*. A MSN foi construída com base nas distâncias de Nei-Li a partir de 404 fragmentos de AFLP. A cor de fundo dos agrupamentos (ABCDE) codifica os seis *clusters* genéticos encontrados pelo BAPS.

Em *Stylosanthes vallsii*, a Minimum Spanning Network, mostrou o grupo A, quase sem mistura, compondo em apenas um braço simples da árvore, os indivíduos de CAN1, esta homogeneidade também foi corroborada pelo agrupamento do BAPS. Seguindo para o Grupo B, o mesmo formou um braço com os indivíduos de CAN3 e FOZ1 e neste ramo podemos observar a presença de 7 indivíduos de FOZ3. No grupo C, podemos observar uma maior mistura de indivíduos, contemplando as amostras de CAN2, com indivíduos de FOZ2 e FOZ3, apenas uma amostra de CAN1, foi observada neste grupo e mais 3 indivíduos de FOZ1.

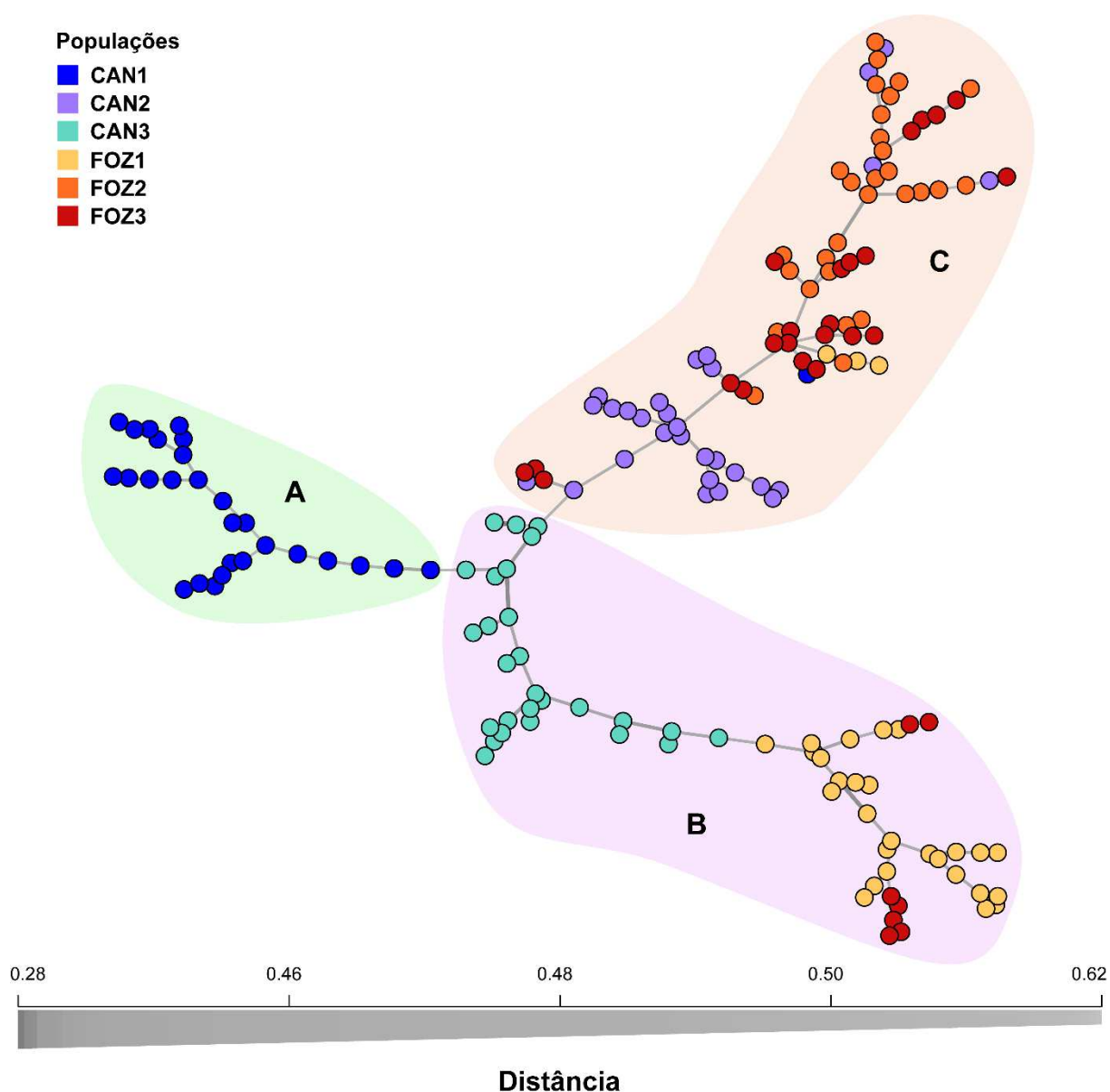


Figura 9. Minimum Spanning Network (MSN) mostrando as relações evolutivas entre 6 populações de *Stylosanthes vallsii*. A MSN foi construída com base nas distâncias de Nei-Li a partir de 321 fragmentos de AFLP. A cor de fundo dos agrupamentos (ABC) codifica os três *clusters* genéticos encontrados pelo BAPS.

Para *E. corallinum*, a rede de interações plotada a partir da menor distância entre dois pontos/indivíduos, mostra uma complementariedade entre os grupos que foram encontrados pelo BAPS, pois temos em um único braço os indivíduos que formam o grupo A, composto pelas populações de FOZ1 e FOZ2, tendo apenas um indivíduo de CAN3 e um indivíduo de CAN1 e dois indivíduos de CAN4 compondo este grupo. Em seguida temos o

grupo B, composto pelos indivíduos de CAN2, CAN3 e CAN4, sendo interessante destacar que os indivíduos de CAN1 (grupo C), se apresentaram mais próximos geneticamente de CAN2 e CAN3, fato que também é apontado pela presença do pool gênico de CAN1 em CAN4, sugerindo fluxo gênico entre as populações mais próximas.

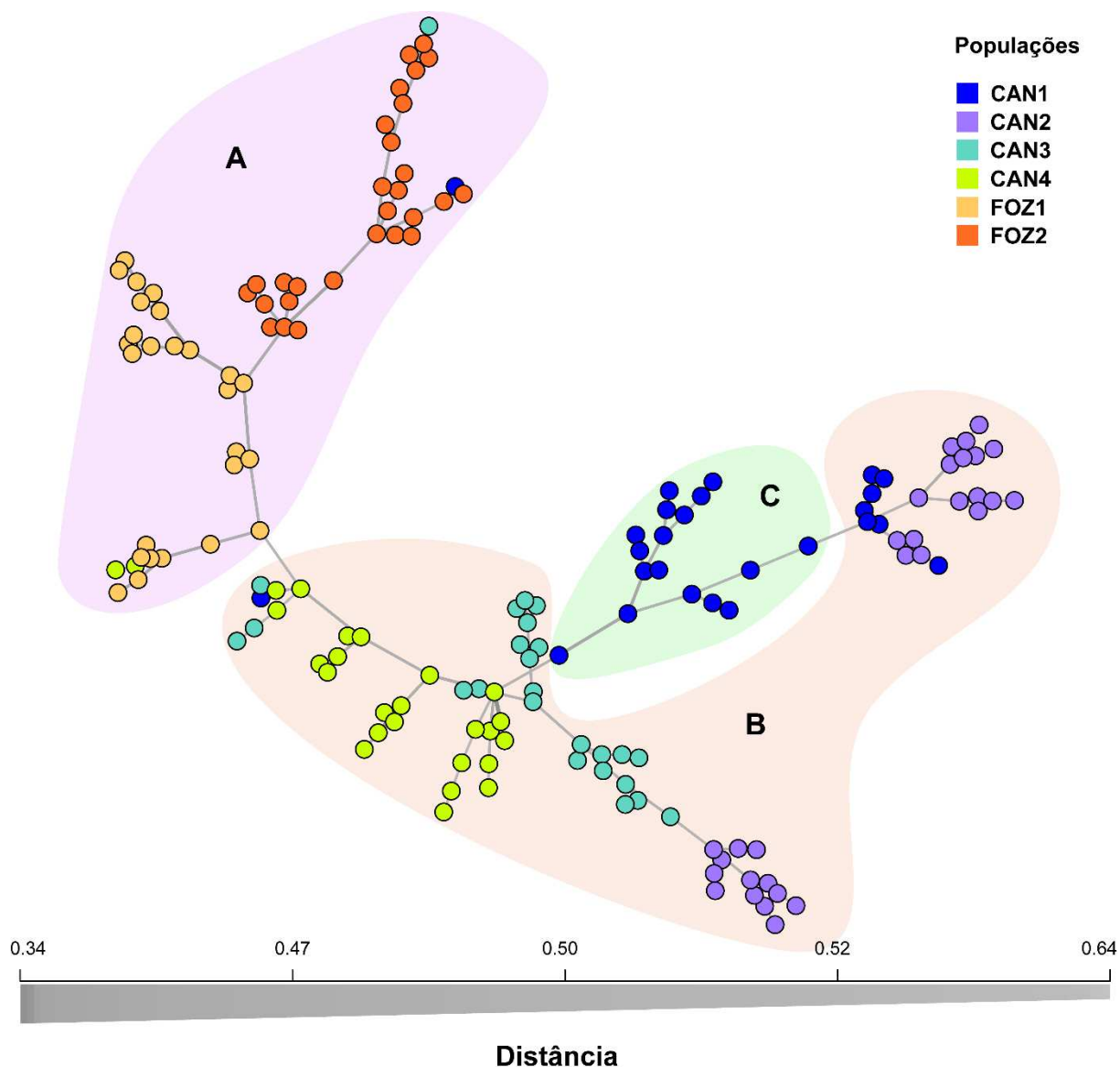


Figura 10. Minimum Spanning Network (MSN) mostrando as relações evolutivas entre 6 populações de *Eryngium corallinum*. A MSN foi construída com base nas distâncias de Nei-Li a partir de 352 fragmentos de AFLP. A cor de fundo dos agrupamentos (ABC) codifica os três *clusters* genéticos encontrados pelo BAPS.

A análise de variância molecular (AMOVA), para as três espécies e os respectivos dados década uma delas são encontrados na tabela 4. O índice de fixação (F_{ST}) é uma medida de diferenciação populacional devido à estrutura genética e de acordo com Hartl & Clark

(2006), os valores de F_{ST} menores que 0,05 como indicativo de baixa diferenciação, valores entre 0,05 a 0,15 como diferenciação moderada, valores entre 0,15 a 0,25 como alta diferenciação e valores acima de 0,25 como diferenciação muito alta entre populações. Com base nisso, podemos dizer que as populações das três espécies apresentaram alta diferenciação genética, sendo o maior índice foi encontrado em *N. hatschbachii* ($F_{ST} = 0,22$, seguido das populações de *E. corallinum* ($F_{ST} = 0,20$), e *S. vallsii* ($F_{ST} = 0,19$), assim como outros índices apontados anteriormente. Foi também observado que, para as três espécies (*N. hatschbachii*, *S. vallsii*, *E. corallinum*), a maior parte da variação genética se encontra dentro das populações (78,20%, 80,53%, e 80,46%, respectivamente) e não entre elas (21,80%, 19,47%, e 19,54%, respectivamente).

Tabela 4. Análise da variância molecular (AMOVA) aplicada aos marcadores AFLP para as populações das três espécies, *Nierembergia hatschbachii*, *Stylosanthes vallsii* e *Eryngium corallinum*.

<i>Nierembergia hatschbachii</i>					
Fonte de variação	g.l.	s.q	c.v	p.v	F_{ST}
Entre as populações	5	1395,92	8,66	21,80*	0,22*
Dentro das populações	166	5156,94	31,07	78,20*	
Total	171	16108,50	61,73		
<i>Stylosanthes vallsii</i>					
Fonte de variação	g.l.	s.q	c.v	p.v	F_{ST}
Entre as populações	5	846,19	5,13	19,47*	0,19*
Dentro das populações	167	3545,79	21,23	80,53*	
Total	172	4391,98	26,37		
<i>Eryngium corallinum</i>					
Fonte de variação	g.l.	s.q	c.v	p.v	F_{ST}
Entre as populações	5	971,94	6,28	19,54*	0,20
Dentro das populações	155	4011,46	25,89	80,46*	
Total	160	4983,40	32,17		

g.l. = graus de liberdade; s.q. = soma dos quadrados; c.v. = componentes da variação; p.v % = porcentagem da variação; F_{ST} = índice de fixação.

*P < 0.01 (teste de significância de 10100 permutações).

Com base nas estimativas de fluxo gênico, apresentadas na Tabela 5, podemos dizer que de maneira geral, o número de migrantes por geração ficou abaixo de (1) na maioria das populações e espécies, este valor, ou próximo deste, é sugerido como necessário para manter a diversidade genética (Mills & Allendorf, 1996; Wang, 2004). Sendo assim, podemos dizer que

em *N. hatschbachii*, apenas as populações de FOZ1 X FOZ2 ($N_m = 0,98$), tiveram valor próximo de 1 migrante por geração, assim como em *S. vallsii*, apenas os pares de populações CAN2 X FOZ2 ($N_m = 0,82$), CAN2 X FOZ3 ($N_m = 0,97$), FOZ1 x FOZ3 ($N_m = 0,86$), FOZ2 X FOZ3 ($N_m = 1,22$) tiveram valores próximos a 1, bem como em *E. corallinum*, onde apenas os pares de populações CAN1 X CAN4 ($N_m = 0,95$), CAN2 X CAN3 ($N_m = 0,93$), CAN3 X CAN4 ($N_m = 1,14$) e FOZ1 X FOZ2 ($N_m = 0,95$).

Tabela 5. Estimativa do número de migrantes por geração, das populações das três espécies estudadas: *Nierembergia hatschbachii*, *Stylosanthes vallsii* e *Eryngium corallinum*, a partir de marcadores AFLP, conforme fórmula proposta por Nielsen e Slatkin (2013).

<i>Nierembergia hatschbachii</i>						
Populações	CAN1	CAN2	CAN3	FOZ1	FOZ2	FOZ3
CAN1	0					
CAN2	0,53	0				
CAN3	0,36	0,63	0			
FOZ1	0,42	0,57	0,46	0		
FOZ2	0,37	0,43	0,41	0,41	0	
FOZ3	0,33	0,43	0,42	0,43	0,98	0

<i>Stylosanthes vallsii</i>						
Populações	CAN1	CAN2	CAN3	FOZ1	FOZ2	FOZ3
CAN1	0					
CAN2	0,62	0				
CAN3	0,36	0,44	0			
FOZ1	0,40	0,42	0,64	0		
FOZ2	0,42	0,82	0,28	0,44	0	
FOZ3	0,55	0,97	0,41	0,86	1,22	0

<i>Eryngium corallinum</i>						
Populações	CAN1	CAN2	CAN3	CAN4	FOZ1	FOZ2
CAN1	0					
CAN2	0,67	0				
CAN3	0,58	0,93	0			
CAN4	0,95	0,87	1,14	0		
FOZ1	0,36	0,35	0,35	0,47	0	
FOZ2	0,35	0,37	0,35	0,50	0,95	0

Nas estimativas de distâncias F_{ST} par a par, todas foram significativas a um alfa = 0,01, sendo as populações com maior distância genética entre si foram encontradas em CAN1

e FOZ3 (0,28) de *N. hatschbachii*, em CAN3 e FOZ2 (0,31) de *S. vallsii*, em CAN2 e FOZ1 (0,27) de *E. corallinum* e as menores distâncias foram encontradas nas populações de FOZ2 e FOZ3 (0,11) de *N. hatschbachii*, em FOZ2 e FOZ (0,09) de *S. vallsii* e em CAN3 e CAN4 (0,10) de *E. corallinum*. Os demais índices do F_{ST} par a par entre todas as populações das espécies se encontram na tabela 6.

Tabela 6. Os índices de diferenciação genética (F_{ST} par a par, a partir do AFLP) das populações das três espécies *Nierembergia hatschbachii*, *Stylosanthes vallsii* e *Eryngium corallinum*, se encontram abaixo da diagonal e a distância geográfica (km), acima da diagonal.

<i>Nierembergia hatschbachii</i>							
Populações	CAN1	CAN2	CAN3	FOZ1	FOZ2	FOZ3	$F_{ST} x$
CAN1	-	1,48	10,58	30,70	35,10	37,31	0,24
CAN2	0,19	-	11,01	29,35	33,74	35,91	0,20
CAN3	0,26	0,17	-	38,00	42,16	43,87	0,22
FOZ1	0,23	0,18	0,21	-	4,45	7,15	0,22
FOZ2	0,25	0,23	0,24	0,23	-	3,12	0,21
FOZ3	0,28	0,22	0,23	0,22	0,11	-	0,21

<i>Stylosanthes vallsii</i>							
Populações	CAN1	CAN2	CAN3	FOZ1	FOZ2	FOZ3	$F_{ST} x$
CAN1	-	1,48	10,58	30,70	35,10	37,31	0,22
CAN2	0,17	-	11,01	29,35	33,74	35,91	0,17
CAN3	0,26	0,22	-	38,00	42,16	43,87	0,24
FOZ1	0,24	0,23	0,16	-	4,45	7,15	0,20
FOZ2	0,23	0,13	0,31	0,22	-	3,12	0,20
FOZ3	0,19	0,11	0,23	0,13	0,09	-	0,15

<i>Eryngium corallinum</i>							
Populações	CAN1	CAN2	CAN3	CAN4	FOZ1	FOZ2	$F_{ST} x$
CAN1	-	1,48	10,58	9,62	30,70	35,10	0,19
CAN2	0,16	-	11,01	9,48	29,35	33,74	0,18
CAN3	0,18	0,12	-	4,05	38,00	42,16	0,18
CAN4	0,12	0,13	0,10	-	34,37	38,45	0,15
FOZ1	0,26	0,27	0,26	0,21	-	4,45	0,22
FOZ2	0,26	0,25	0,26	0,20	0,12	-	0,22

A correlação entre as distâncias genéticas e geográficas das populações das três espécies, foi verificada utilizando o teste de Mantel. O teste de Mantel não revelou correlação significativa, entre a distância genética e geográfica, para as populações de *N. hatschbachii* (r

= 0,48, $P = 0,015$) (Fig. 11) e *S. vallsii*, apenas este não foi significativo ($r = 0,27$, $P = 0.142$)

(Fig. 12), tampouco para *E. corallinum* ($r = 0,88$, $P = 0.044$) (Fig. 13).

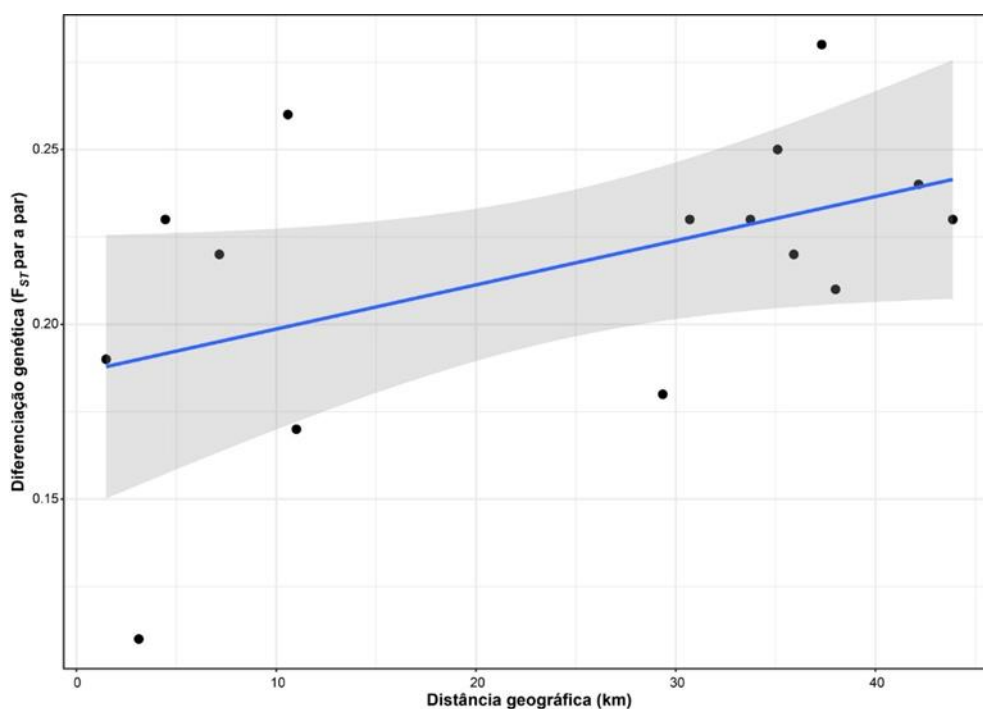


Figura 11. Correlação entre a diferenciação genética (F_{ST} par a par, a partir do AFLP) e distância geográfica (Km) de 6 populações de *Nierembergia hatschbachii* ($r = 0,48$, $P = 0,015$). Análise realizada pelo teste de Mantel utilizando o método “Pearson”. Distâncias geográficas no eixo (x); Diferenciação genética no eixo (y).

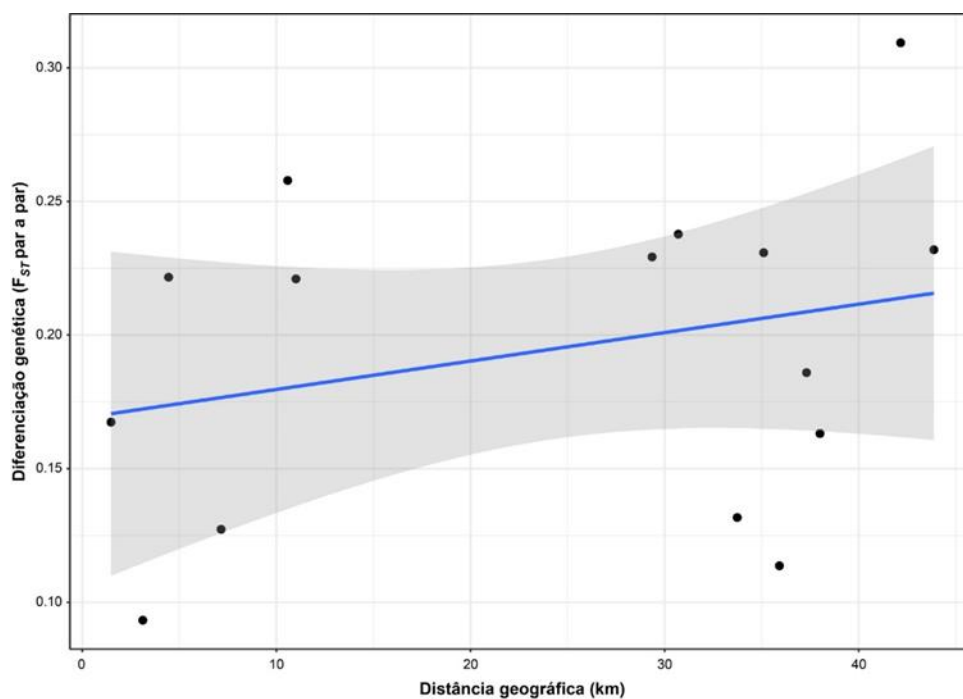


Figura 12. Correlação entre a diferenciação genética (F_{ST} par a par, a partir do AFLP) e distância geográfica (Km) de 6 populações de *Stylosanthes vallsii* ($r = 0,27$, $P = 0.142$). Análise realizada pelo teste de Mantel utilizando o método “Pearson”. Distâncias geográficas no eixo (x); Diferenciação genética no eixo (y).

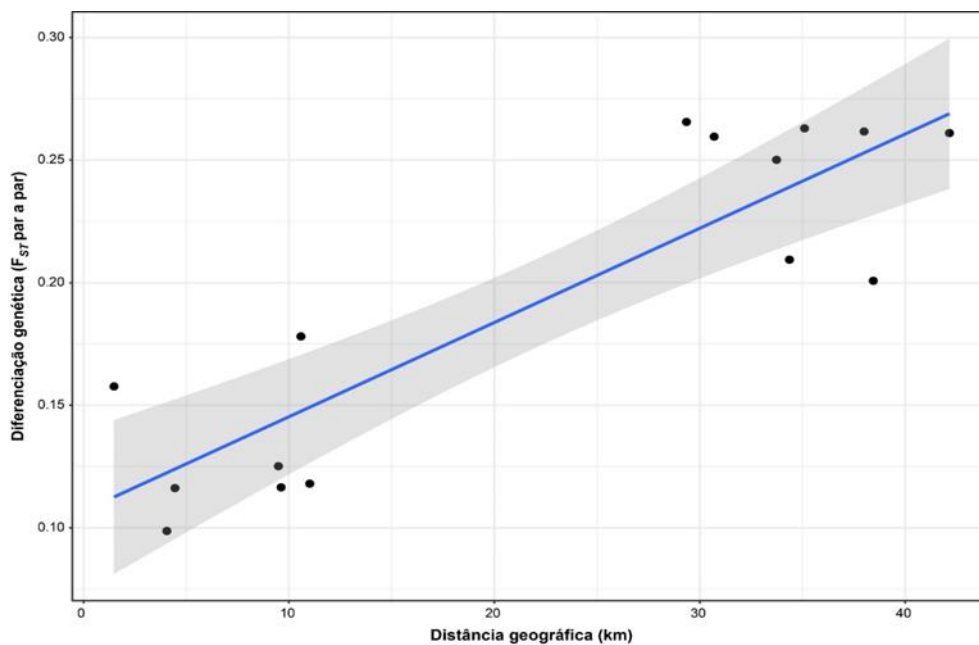


Figura 13. Correlação entre a diferenciação genética (F_{ST} par a par, a partir do AFLP) e distância geográfica (Km) de 6 populações de *Eryngium corallinum* ($r = 0,88$, $P = 0.044$). Análise realizada pelo teste de Mantel utilizando o método “Pearson”. Distâncias geográficas no eixo (x); Diferenciação genética no eixo (y).

DISCUSSÃO

O conceito de espécies endêmicas em plantas está comumente relacionado com a distribuição geográfica, tamanho da área de ocorrência, capacidade de expansão, associados a fatores ambientais como altitude, clima ou solo e ainda a outros índices, como os que são definidos pela IUCN, que podem classificar espécies endêmicas, como raras (IUCN, 2012; Rabinowitz 1981; Fiedler 1986). Essa forma de raridade é geralmente chamada de endemismo local ou, raridade restrita à distribuição (Cowlin, 2001).

Sendo assim, podemos considerar as espécies deste estudo, raras, devido a sua distribuição restrita e especificidade. Esta raridade restrita, já fora observada em *Portulaca hatschbachii*, espécie dos mesmos afloramentos (Feliciano *et al.*, 2022). Isto nos remete à um alerta, para que as áreas de Campos de Altitude do sul do Brasil, mais precisamente as áreas de afloramentos rochosos do Paraná, e que não possuem planos de proteção adequados e não estão inseridas em nenhuma Unidade de Conservação, possam ser vistas como possíveis áreas de preservação, pois abrigam um habitat com inúmeras plantas consideradas raras e provavelmente serão extintas em breve, devido a elevada degradação dos afloramentos.

Desta maneira, é importante destacar que os índices de diversidade genética das populações naturais são parâmetros importantes a serem estimados, pois é devido a manutenção dessa diversidade, que é possível garantir a sobrevivência de uma espécie e o potencial evolutivo, diante das adversidades ambientais (Frankham, Ballou & Briscoe, 2002). Em geral, para espécies endêmicas, a diversidade genética é considerada baixa quando comparadas a espécies amplamente difundidas (Barrett, S. C., & Kohn, J. R., 1991; Binks, Millar & Byrne, 2015) (Cavalli & Winge, 2003), usualmente porque os indivíduos aptos a se reproduzirem são limitados e, como estão isolados de outras populações, ou restritos à pequenas áreas, o cruzamento entre indivíduos aparentados acaba sendo favorecido, contribuindo para perda de diversidade e aumento da endogamia (Frankham, Ballou & Briscoe, 2010).

Os níveis de diversidade genética das populações de plantas estão relacionados a muitos outros processos que vão além do tamanho da área de ocupação da espécie, o tamanho efetivo da população, as síndromes de polinização e dispersão de sementes, efeitos fundadores, eventos de gargalos e características ecológicas (Cavalli & Winge, 2003; Barreto, 2010; Frankham e outros, 2010). Além disso é importante saber quem são os polinizadores nativos das espécies, pois assim é possível conhecer as preferências do polinizador e o modo como estes utilizam os recursos disponíveis (Nogueira-Neto, 2002; Aguiar, 2003). Todos estes fatores, relacionados as estimativas dos índices de diversidade contribuem para delineamento de estratégias de conservação, tanto *ex situ* (como a caracterização de bancos de germoplasma e sementes) (Miller *et al.*, 2016) quanto *in situ* (Gilbert & Whitlock, 2015).

Com a aplicação dos marcadores AFLP, observamos que as espécies do estudo apresentaram baixos índices de diversidade genética (*N. hatschbachii* (0,18), *E. corallinum* (0,17) e *S. vallsii* (0,15)). Estas estimativas de diversidade genética foram realizadas para outras espécies endêmicas dos mesmos afloramentos rochosos do Paraná, como *P. hatschbachii* (Portulacaceae) HT = 0,16 (Feliciano *et al.*, 2022), *Z. paranaensis* (Amaryllidaceae) HT = 0,17 (Aprígio, 2021) e *M. hatschbachii* (Fabaceae) HT = 0,12, todas estimadas a partir dos mesmos marcadores AFLP. Podemos dizer que, os índices estimados foram semelhantes e considerados baixos para todas estas diferentes espécies. Ainda que haja insuficiência de dados acerca dos mecanismos de reprodução destas, o que permitiria melhorar a compreensão de tais parâmetros (Aguiar, 2003), isto acaba por ser dispensável, visto que não poderíamos dizer que espécies com os mesmos tipos de sistema reprodutivo ou distintos, apresentariam alguma vantagem ou desvantagem, uma vez que os índices foram muito próximos. O fato é que, mesmo na falta dos dados de biologia reprodutiva, o gravame da elevada degradação do habitat, é o que prevalece, e o que contribui para perda de diversidade desta flora rara e possivelmente levará a extinção destas espécies em curto espaço de tempo.

Os índices de diversidade genética encontrados nas populações de *N. hatschbachii*, *S. vallsii* e *E. corallinum*, são considerados baixos, e corroboram com o padrão de baixo percentual de locos polimórficos, sugerindo que estas populações tenham passado por evento de gargalo genético recente seguido de expansão rápida a partir de poucos indivíduos (Cornuet & Luikart, 1996; Piry, Luikart & Cornuet, 1999). Tais dados também podem ser corroborados pela homogeneidade encontrada dentro das populações de *Z. paranaenses*, *P. hatschbachii*, e *M. hatschbachii*, com pouca mistura entre os indivíduos e com moderada/alta estruturação populacional, além do fluxo gênico restrito agravado pelo natural isolamento geográfico e forte degradação (Aprígio, 2021; Feliciano *et al.*, 2022; Feliciano, dados não publicados).

O fluxo gênico e diferenciação genética são também parâmetros importantes a serem estimados, pois avaliam a estruturação das populações, e se não há fluxo gênico ou se o mesmo for limitado, esperamos alta estruturação genética entre as populações (Hamrick & Godt, 1990). O fluxo gênico é a força evolutiva capaz de minimizar os efeitos da deriva genética, transferindo os alelos, gerados por mutação, a fim de homogeneizar as populações, contribuindo para a manutenção da diversidade genética (Slatkin, 1994; Yao *et al.*, 2007). Nos afloramentos, já foram descritos índices de diferenciação genética relativamente altos, como em *M. hatschbachii* ($F_{ST} = 0,17$) (Feliciano, dados não publicados), em *P. hatschbachii* ($F_{ST} = 0,36$) (Feliciano *et al.*, 2022) e em *Z. paranaensis* ($F_{ST} = 0,27$) (Aprígio, 2021), *N. hatschbachii*, ($F_{ST} = 0,22$); *S. vallsii* ($F_{ST} = 0,19$); *E. corallinum* ($F_{ST} = 0,20$), sugerindo fluxo gênico restrito, e que aliado ao isolamento geográfico natural, em que se encontram estas espécies, temos a acentuação dos efeitos de deriva genética, que gradualmente, pode fixar ou deletar alelos aleatórios, contribuindo para a perda de diversidade e comprometimento do *fitness* adaptativo das populações (Wright, 1978; Godt, Johnson, & Hamrick, 1996; Frankham *et al.*, 2010; Jones & Wang, 2012; Heinken & Weber, 2013; Ellstrand, 2014).

Além das estimativas de diversidade genética, foram estimados o número de fragmentos privados (Fp) e índice de raridade (DW), a fim de investigar uma tendência na distribuição da diversidade, entre as populações. Sendo assim, podemos dizer que com base nestes índices, populações há mais tempo estabelecidas tendem a apresentar maior número de fragmentos privados e índice de raridade, uma vez que passaram um tempo maior acumulando mutações, do que populações há menos tempo estabelecidas (Ehrich *et al.*, 2006; Ortiz *et al.*, 2008; Tremetsberger *et al.*, 2009). Diante disso, observamos que os maiores índices de fragmentos privados e índice de raridade, em *N. hatschbachii* encontrado em CAN1 (Fp= 25; DW = 1199,38), *E. corallinum* CAN2 (Fp= 14; DW = 732,14), *S. vallsii* em FOZ2 (Fp = 9; DW = 649,25), podendo sugerir que estas sejam as populações mais ancestrais de cada espécie.

Ainda sobre o padrão de distribuição da diversidade e estruturação das populações, a análise de agrupamento Bayesiano (BAPS) realizada para as três espécies, mostrou os mesmos agrupamentos encontrados na MSN, e evidenciou alta estruturação populacional. A AMOVA ainda revelou que, a maior parte da variação genética se encontra dentro das populações e não entre elas, isso para as três espécies e quando consideramos espécies que exibem polinização preferencialmente cruzada, podemos destacar padrões similares na distribuição da variação genética, como por exemplo os índices encontrados em *P. hatschbachii* (Feliciano *et al.*, 2022) e *Z. paranaensis* espécies dos mesmos afloramentos (Aprígio, 2021). Geralmente em plantas de polinização cruzada e perenes, a maior parte da variação genética, pode ser observada dentro das populações, enquanto as plantas preferencialmente autofecundadas mantêm a maior parte da variação genética entre as populações (Nybom, 2004).

Desta maneira, diante das estimativas de fluxo gênico, obtidas entre os pares de populações (Tabela 5), podemos observar que estão abaixo do necessário para manter a diversidade genética e evitar a depressão por endogamia (Mills & Allendorf, 1996; Wang, 2004), sendo o número ideal de migrantes por geração ($N_m = 1$). No entanto, alguns pares de

populações atingiram o número ideal de migrantes por geração ($Nm= 1$), as quais pertencem ao mesmo agrupamento genético encontrado pelo BAPS. A pouca mistura observada nestes clusters a partir do BAPS, são correspondentes ao observados nos indivíduos que se misturam na MSN, evidenciando fluxo gênico em populações mais próximas. Vale ressaltar que, nos 5 clusters encontrados nas populações de *N. hatschbachii* apenas um cluster foi composto de duas populações distintas (FOZ2 X FOZ3), e elas se encontram à menos de 3,12 km de distância, os demais clusters foram compostos por cada uma das populações restantes isoladamente, evidenciando que as populações a mais de 4 km, não se agruparam entre si. Já nos 3 clusters das populações de *S. vallsii*, podemos observar mais populações compartilhando o mesmo agrupamento, como por exemplo, CAN2, FOZ2 e FOZ3 agrupados em um cluster e CAN3, FOZ1 em outro, e CAN1 o outro, o que nos remete a uma possível dispersão mais facilitada própria da espécie (Lewis *et al.*, 2005), ainda que estes dados sejam escassos, também notamos um maior número de indivíduos com mistura, ou possível retenção de polimorfismo ancestral, uma vez que a população de CAN2 encontra-se a uma considerável distância de 35 km, das populações de FOZ2 e FOZ3 e ainda sim, fizeram parte do mesmo cluster. Todavia, nas populações de *E. corallinum* os 3 agrupamentos encontrados pelo BAPS, colocaram as populações de CAN1 em um grupo, as de CAN2, CAN3 e CAN4 em outro e FOZ1, FOZ2 em outro, o que também pode sugerir maior fluxo gênico nas populações mais próximas.

Somado a isso, os afloramentos de ocorrência das espécies, são habitats descontínuos, com áreas limitadas, sendo consideradas ilhas terrestres (Porembski, 2007), que se distribuem conforme o derramamento de rochas basálticas. A dispersão de pólen e sementes nestes ambientes é limitada e impacta a capacidade de colonização de espécies endêmicas e restritas (Lavergne *et al.*, 2004;). Como consequência dessa descontinuidade, somado aos altos níveis de degradação, a ação dos polinizadores acaba sendo cada vez mais limitada, pois além da distância, os recursos alimentares disponíveis também é reduzido nesses ambientes, onde os

visitantes florais, vão se limitando a visitas das mesmas flores e/ou flores próximas, e acabam por contribuir para perda de diversidade, devido aos cruzamentos entre indivíduos aparentados (Serrote; Reiniger & Stefenon, 2016). Sendo assim, ao observarmos as composições dos agrupamentos encontrados pelo BAPS e a pouca mistura que o mesmo apresentou, podemos dizer que a capacidade de dispersão destas espécies está limitada às trocas alélicas que se dão apenas entre populações vizinhas (Stepping-Stone) (Kimura & Weiss, 1964).

Estudos sobre os aspectos da história natural da região, também nos dariam informações relevantes para entender a dinâmica destas populações. Visto que em *S. vallsii*, pudemos observar que houve, dois agrupamentos encontrados pelo BAPS (CAN2, FOZ2, FOZ3) e (CAN3, FOZ1) que não seguiu o modelo esperado, de fluxo gênico e dispersão entre as populações mais próximas (Stepping-Stone) (Kimura & Weiss, 1964), contemplando o modelo de ilha descrito por Wright (1964), onde a migração se dá ao acaso entre grupos de pequenas populações. O fato é que, o cenário melhor explicado, seria as populações mais próximas comporem o mesmo cluster, sendo CAN2 junto à CAN3, e FOZ1, FOZ2 junto com FOZ3 (Fig.6). No entanto, poderíamos supor que nas populações de *S. vallsii*, haveria uma retenção de polimorfismo ancestral, o que justificaria a composição genotípica de populações mais distantes se agruparem no mesmo cluster, como abordado nos estudos de Godoy e colaboradores (2019), com *Mikania micrantha* (Asteraceae). Posto isto, ainda podemos considerar as flutuações climáticas de 21 mil anos atrás, quando o planeta atingiu sua temperatura mais baixa desde o último ciclo glacial, o clima frio e seco propiciava o desenvolvimento dos campos, dos quais se estendiam à longas e contínuas áreas, permitindo que as espécies deste ambiente avançassem sobre áreas mais úmidas e quentes, onde predominavam as florestas. Ao migrar pra regiões que não estavam adaptadas, as espécies campestres se diversificaram, dando origem a novas espécies (Boucher, Zimmermann & Conti, 2016), 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). Barros (2015), ainda sugere que o endemismo é caracterizado por ecossistemas antigos e estáveis, pois o surgimento de novas espécies é demorado. Seguindo este raciocínio, poderíamos sugerir que a dinâmica de expansão e contração dos campos, devido ao esfriamento e aquecimento do planeta, também explicariam as diversas espécies endêmicas encontradas nos afloramentos do Paraná, conforme as que detalhamos neste estudo e em outros (Iganci *et al.*, 2011; Barros *et al.*, 2015; Feliciano *et al.*, 2022; Aprígio, 2021).

Por este motivo, se torna crucial o conhecimento e o entendimento da estrutura genética espacial populacional das espécies, a fim de delinear a melhor estratégia de manejo e a conservação dos recursos genéticos, já que a presença de estruturação genética pode influenciar padrões reprodutivos e evolutivos, (Miyamoto *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2003; Kevin *et al.*, 2004; Oddou-Muratorio *et al.*, 2004). A diversidade genética é especialmente importante para uma espécie pois contribui para a preservação da capacidade evolutiva quando há alterações ambientais (Booy *et al.*, 2000). Tal conhecimento também é fundamental para o estabelecimento de estratégias de amostragem em populações naturais, seja pra escolha da área que representa a maior composição do pool gênico de uma espécie, contemplando a conservação *in situ*, bem como a coleta de sementes para conservação e reintrodução de germoplasma (Wu *et al.*, 2015), contemplando a conservação *ex situ*, ambas primordiais para salvaguarda da espécie (Godefroid *et al.*, 2011). A gestão das coleções e a conservação dos recursos genéticos deve garantir que a maior parte da variação existente seja conservada (Crossa, 1994; Mounce; Smith; Brockington, 2017).

A conservação de recursos genéticos requer uma avaliação da diversidade genética e estrutura das espécies, principalmente as ameaçadas de extinção. A incorporação de dados e informações sobre espécies da flora ameaçada, juntamente com as análises de fragilidade

ambiental, pode constituir-se em uma ferramenta útil para se avaliar o grau de impacto das atividades antrópicas sobre esta biodiversidade, sobretudo para estimar os reais riscos e probabilidades de extinção de espécies (Jackson & Kennedy, 2009). No entanto, é difícil planejar estratégias de conservação, uma vez que estudo sobre a diversidade genética e até mesmo a caracterização da área dos afloramentos, é escasso. Sendo assim, trabalhos como este podem auxiliar no mapeamento das áreas estratégicas para a conservação e restauração da biodiversidade do Paraná. O fato é que diante dos dados apresentados, partimos para um apelo à uma área que abriga uma flora rara e endêmica, que precisa ser protegida, ou será perdida em breve. É essencial obter as estimativas dos índices de diversidade genética, entender a estrutura e fluxo gênico de uma população para nortear, possíveis estratégias de manejo e conservação que de fato funcionem.

Diante disso, a única maneira de atentar o órgão público sobre a necessidade de proteção destas áreas, seria inicialmente expor a possibilidade de incentivos, aos proprietários, como por exemplo a criação de uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN), explanando os benefícios de tal ação em que há isenção do Imposto sobre a Propriedade Territorial Rural (ITR), referente à área reconhecida como RPPN. Logo, o proprietário pode permitir a realização de pesquisas científicas, atividades de educação ambiental e visitação pública, desde que as atividades estejam previstas no Plano de Manejo da RPPN (decreto nº 5.746, de 5 de abril de 2006). Para que então, possamos alcançar visibilidade e seguir na indicação destas áreas para a Compensação de Reserva Legal (Lei Federal nº 12.651/2012), mostrando aos proprietários das áreas, o grande valor biológico e as vantagens de conservar as áreas dos Campos Subtropicais de Altitude, sobre afloramentos de basalto e aí sim junto ao órgão público conseguir apoio para criação de uma unidade de conservação.

Outra estratégia, seria realizar parcerias com projetos para formação extracurricular docente, dentro das Universidades, a fim de levar os dados levantados na área acadêmica para

conhecimento da comunidade local, tais como projetos de Educação Ambiental, nas escolas públicas e particulares, enfatizando o quanto estes afloramentos são ricos em biodiversidade. Sendo assim, promover a divulgação de dados e materiais informativos que alcancem a sociedade, é de suma importância, a fim de incrementar a conscientização sobre a necessidade da conservação da biodiversidade e os possíveis impactos à qualidade de vida, especialmente quanto aos serviços ecossistêmicos e sua importância na adaptação às mudanças climáticas.

CONCLUSÃO

Aqui descrevemos os índices de diversidade e a estrutura genética de populações naturais de *Nierembergia hatschbachii*, *Stylosanthes vallsii* e *Eryngium corallinum*, todas endêmicas de regiões exploradas sobre os afloramentos de basalto do Paraná. Esses afloramentos rochosos, também conhecidos como “ilhas terrestres”, impõem condições de vulnerabilidade ambiental, que somado à degradação e falta de preservação, comprometem a perpetuação destas espécies.

Os marcadores AFLP, permitiram investigar a estrutura populacional e diversidade genética, mostrando que os índices são considerados baixos para todas as espécies estudadas, e alta estruturação genética também foi observada, fato que compromete o *fitness* adaptativo delas. Logo, a redução destas populações, devido a degradação eminente do habitat, pode extinguir inúmeras destas espécies em curto tempo. Sendo assim, compreender a diversidade genética existente e a diferenciação entre as populações se torna um componente crucial dos programas de recuperação de áreas, para garantir a proteção destas espécies.

Os programas de recuperação de espécies podem ter como objetivo aumentar ou manter o tamanho demográfico da população existente, através da preservação das áreas/habitats de ocorrências, mantendo o máximo possível da paisagem original. Os programas de recuperação podem ainda aumentar a diversidade genética das populações, com a

reintrodução de indivíduos com ou mesmo criar a partir destes, por meio de culturas *in vitro* e protocolos de criopreservação, bancos de sementes e jardins/ coleções vivas, novos indivíduos para aumentar o número e diminuir a estruturação das populações existentes. Para os afloramentos rochosos, cuja conectividade é naturalmente descontínua, os programas de recuperação de espécies se tornam cruciais, visto que há redução destas áreas encontra-se cada vez mais acelerada.

Todas as populações, especialmente aquelas que apresentam os mais elevados níveis de variabilidade genética, quando avaliadas em diversos cenários ou evidenciando notáveis discrepâncias genéticas, merecem ser preservadas. A preservação *in situ* é reconhecida como a abordagem mais eficaz para a proteção de espécies vegetais em risco, possibilitando a salvaguarda de todo o pool genético em seu ambiente natural. Contudo, é igualmente importante contemplar a preservação *ex situ*, como a caracterização de bancos de germoplasma e sementes, a fim de viabilizar alternativas concretas para a proteção dessas espécies.

BIBLIOGRAFIA

- Aprígio, NG, Feliciano, DC, Ferraz, JR, Da Silva, JFM, & De Godoy, SM. 2021.** Diversidade genética e estruturação populacional da espécie endêmica do Paraná *Zephyranthes Paranaensis*. *Revista Multidisciplinar De Educação E Meio Ambiente*, 2(2), 12-12.
- Aguiar, CML. 2003.** Utilização de recursos florais por abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em uma área de Caatinga (Itatim, Bahia, Brasil). *Revista Brasileira de Zoologia*, 20: 457-467.
- Barrett, S. C., & Kohn, J. R. 1991.** Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. *Genetics and conservation of rare plants*, 3-30.
- 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* 17: 360–368.
- Binks RM, Millar MA, Byrne M. 2015.** Not all rare species are the same: contrasting patterns of genetic diversity and population structure in two narrow-range endemic sedges. *Biological Journal of the Linnean Society* 114: 873–886.
- Bonin A, Ehrich D, Manel S. 2007.** Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology* 16: 3737–3758.
- Booy, G, Hendriks, RJJ, Smulders, MJM, Van Groenendael, JM, Vosman, B. 2000.** Genetic diversity and the survival of populations. *Plant biology*, 2(04), 379-395.
- Boucher FC, Zimmermann NE, Conti E. 2016.** Allopatric speciation with little niche divergence is common among alpine Primulaceae. *Journal of Biogeography* 43: 591–602.
- Burke A. 2012.** The effect of altitude on arid inselbergs along a bioclimatic gradient. *J Nat Hist* 46:3011–3023.
- Cardozo, AL, Goldenberg, R, Fiaschi, P. & Labiak, P. 2021.** *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae) in the state of Paraná, southern Brazil. *Phytotaxa* 507: 1–50.
- Cavalli SS, Winge H. 2003.** Variabilidade genética em populações naturais. In: Freitas LB, Bered F. *Genética e Evolução Vegetal*. Porto Alegre: UFRGS. p.165-175.
- Chagas, KPT, Pinheiro, LG, Lucas, FMF, Freire, A, DSM, Fajardo, CG, Vieira, FDA. 2022.** Genetic diversity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.: an intensively exploited wood tree in the Brazilian tropical semi-arid vegetation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-14.
- CNCFlora.** *Eryngium corallinum* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Eryngium corallinum](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Eryngium%20corallinum)>. Acesso em 21 fevereiro 2023.
- Cocucci, AA. & Hunziker, AT. 1993.** Estudios sobre Solanaceae XXXV. Novedades en Nierembergia. *Lorentzia* 7: 5–15.
- Cocucci, AA. 1991.** Pollination biology of *Nierembergia* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 174: 17–35.

- Corander J, Waldmann P, Marttinen P, Sillanpää MJ. 2004.** BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* **20**: 2363–2369.
- Corander J, Marttinen P. 2006.** Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. *Molecular Ecology* **15**: 2833–2843.
- 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.
- Cosacov, A, Nattero, J. & Coccuci, AA. 2008.** Variation of pollinator assemblages and pollen limitation in a locally specialized system: the oil-producing *Nierembergia linariifolia* (Solanaceae). *Annals of Botany* **102**: 723–734.
- Costa, NMS & Van den Berg, C. 2009.** A new species of *Stylosanthes* Sw. (Leguminosae-Papilionoideae) from Paraná, Brazil. *Neodiversity* **4**: 9–13.
- Cowling R. M. 2001.** Endemism. In: *Encyclopedia of Biodiversity* (ed. S. A. Levin) pp. 497–507. Academic Press, San Diego.
- Cornuet JM, Luikart G. 1996.** Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**: 2001–2014.
- Crossa, J, Taba, S, Eberhart, SA, Bretting, P, Vencovsky, R. 1994.** Practical considerations for maintaining germplasm in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, **89**: 89-95.
- DECRETO Nº 5.746, DE 5 DE ABRIL DE 2006** EMENTA: Regulamenta o art. 21 da Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza. Texto - Publicação Original.
- Ellstrand NC. 2014.** Is gene flow the most important evolutionary force in plants? *American Journal of Botany* **101**: 737–753.
- Ehrich D. 2006.** AFLPDAT: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Notes* **6**: 603–604.
- Feliciano, DC, De Godoy, SM, Da Silva, JFM, Góes, BD, Ferraz, JR, De Oliveira Santos, Ruas, PM & De Fátima Ruas, C. 2022.** Landscape genetics reveal low diversity and adaptive divergence in *Portulaca hatschbachii* (Portulacaceae): an endangered species endemic to rocky outcrops of the Atlantic Forest. *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- Fiedler P. 1986.** Concepts of rarity in vascular plant species, with special reference to the genus *Calochortus* Pursh (Liliaceae). *Taxon* **35**, 502–18.
- Frankham R, Ballou J, Briscoe D. 2010.** *Introduction to conservation genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Gastauer, M, Ramos, SJ, Caldeira, CF, Siqueira, JO. 2021.** Reintroduction of native plants indicates the return of ecosystem services after iron mining at the Urucum Massif. *Ecosphere*, *12*(11), e03762.
- Gaudeul, M, Till-Bottraud, I, Barjon, F, Manel, S. 2004.** Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): comparison of AFLP and microsatellite markers. *Heredity*, *92*(6), 508-518.

Gilbert, KJ, Whitlock, MC. 2015. Evaluating methods for estimating local effective population size with and without migration. *Evolution*, 69(8), 2154-2166.

Godoy, SM, Da Silva, JFM, Ruas, PM, Ritter, MR, De Paula, GBN, Maffei, EMD, Fátima Ruas, C. 2019. Multilocus approach reveals a complex evolutionary history of the invasive mile-a-minute plant, *Mikania micrantha* (Asteraceae), in its natural habitat. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 191(2), 188-215.

Godefroid, S, Piazza, C, Rossi, G, Buord, S, Stevens, AD, Aguraiuja, R, Vanderborght, T. 2011. How successful are plant species reintroductions?. *Biological Conservation*, 144(2), 672-682.

Hamrick, JL, & Godt, MW. 1990. Allozyme diversity in plant species. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources.*, 43-63.

Iganci JRV, Heiden G, Miotto SV, Pennington RT. 2011. Campos de Cima da Serra: the Brazilian Subtropical Highland Grasslands show an unexpected level of plant endemism. *Botanical Journal of the Linnean Society* 167: 378–393.

Jackson, PW, Kennedy, K. 2009. The global strategy for plant conservation: a challenge and opportunity for the international community. *Trends in plant science*, 14(11), 578-580.

Jones OR, Wang J. 2012. A comparison of four methods for detecting weak genetic structure from marker data. *Ecology and Evolution* 2: 1048–1055.

IUCN. 2012. IUCN red list categories and criteria: Version 3.1. Second edition IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

IUCN. 2014. Guidelines for using the IUCN Red List categories and criteria. Version 11. Prepared by the Standards and Petitions Subcommittee. Acessado em Novembro 12, 2022 <http://jr.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>

Kamvar ZN, Brooks JC and Grünwald NJ. 2015. Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Frontiers in Genetics* 6: 208.

Kamvar ZN, Tabima JF and Grünwald NJ. 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2: e281.

Kimura M, Weiss GH. 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49: 561–576.

Lavergne S, Thompson JD, Garnier E, Debussche M. 2004. The biology and ecology of narrow endemic and widespread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. *Oikos* 107: 505–518.

LEI N° 11.428, DE 22 DE DEZEMBRO DE 2006 Dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, e dá outras providências.

Longhi-Wagner, HM, Welker, CAD & Waechter, JL. 2012. Floristic affinities in montane grasslands in eastern Brazil. *Systematics and Biodiversity* 10: 537–550.

Margules, CR, & Pressey, RL. 2000. Systematic conservation planning. *Nature*, 405(6783), 243-253.

- Martinelli G, Moraes MA. 2013.** *Livro vermelho da flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Martinelli, G, & Moraes, MA. 2013.** *Livro vermelho da flora do Brasil*. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1100 pp.
- Mathias, M.E. & Constance, L. 1958.** Two new species (Umbelliferae) from Santa Catarina, south Brazil. *Bulletin of the torrey botanical club* **85**: 225–259.
- Miller, JS, Lowry, PP, Aronson, J, Blackmore, S, Havens, K, Maschinski, J. 2016.** Conserving biodiversity through ecological restoration: the potential contributions of botanical gardens and arboreta. *Candollea*, *71*(1), 91-98.
- Mills, LS, Allendorf, FW. 1996.** The One-Migrant-Per-Generation Rule in Conservation and Management. *Conservation Biology***10**: 1509-1518.
- Miyamoto, N, Kuramoto, N, & Yamada, H. 2002.** Differences in spatial autocorrelation between four sub-populations of *Alnus trabeculosa* Hand. -Mazz.(Betulaceae). *Heredity*, *89*(4), 273-279.
- Milligan, BG, Leebens-Mack, J, & Strand, AE. 1994.** Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Molecular Ecology*, *3*(4), 423-435.
- Mounce, R, Smith, P, & Brockington, S. 2017.** Ex situ conservation of plant diversity in the world's botanic gardens. *Nature Plants*, *3*(10), 795-802.
- Nabinger C, Moraes AD, Maraschin GE. 2000.** Campos in southern Brazil. In: Lemaire G, Hodgson J, Moraes AD, Carvalho PDF, Nabinger C, eds. *Grassland ecophysiology and grazing ecology*. Wallingford: CABI Publishing, 355–376.
- Nattero, J., Coccuci, A.A. & Medel, R. 2010.** Pollinator-mediated selection in a specialized pollination system: matches and mismatches across populations. *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 1957–1968.
- Nei M. 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583–590.
- Nei M, Li W-H. 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**: 5269–5273.
- Nogueira-Neto, P. 2002.** Management of plants to maintain and study pollinating bee species, and also to protect vertebrate frugivorous fauna. *Pollinating Bees-The Conservation Link Between Agriculture and Nature-Ministry of Environment/Brasilia*, 21-28.
- Nybom, H. 2004.** Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular ecology*, *13*(5), 1143-1155.
- Ortiz MA, Tremetsberger K, Terrab A, Stuessy TF, García-Castanõ JL, 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.
- Overbeck GE, Müller SC, Fidelis A, Pfadenhauer J, Pillar VD, Blanco CC, Boldrini II, Both R, Forneck ED. 2007.** Brazil's neglected biome: the south Brazilian campos. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **9**: 101–116.

Pereira-Noronha, MR, Gottsberger, IS. & Gottsberger, G. 1982. Biologia floral de *Stylosanthes* (Fabaceae) no Cerrado de Botucatu, estado de São Paulo. *Revista brasileira de biologia* **43**: 595–605.

Plá C, Külkamp J, Heiden G, Lughadha EN, Iganci JRV. 2020. The importance of the Brazilian subtropical highland grasslands evidenced by a taxonomically verified endemic species list. *Phytotaxa* **452**: 250–267.

Piry S, Luikart G, Cornuet JM. 1999. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* **90**: 502–503.

Porembski S. 2007. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Brazilian Journal of Botany* **30**: 579–586.

Rabinowitz D. 1981. Seven forms of rarity. In: *The Biological Aspects of Rare Plant Conservation* (ed. H. Synge) pp. 205–17. John Wiley, New York.

Ramalho, M & Rosa, JF. 2010. Ecologia da interação entre as pequenas flores de quilha de *Stylosanthes viscosa* Sw. (Faboideae) e as grandes abelhas *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) *cearensis* Ducke, 1910 (Apoidea, Hymenoptera), em duna tropical. *Biota neotropica* **10**: 93–100.

Rodrigues, L, Van den Berg, C, Póvoa, O, & Monteiro, A. 2013. Low genetic diversity and significant structuring in the endangered *Mentha cervina* populations and its implications for conservation. *Biochemical systematics and ecology*, **50**, 51–61.

Ruas RB, Paggi GM, Aguiar-Melo C, Hirsch LD, Bered F. 2020. Strong genetic structure in *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae), an endangered species found on ironstone outcrops in Pantanal, Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* **192**: 691–705.

Secretaria de estado do meio ambiente/deutsche gesellschaft technische zusammenarbeit (SEMA/GTZ). Lista Vermelha de Plantas Ameaçadas de Extinção no Estado do Paraná, Curitiba, PR, p.139, 1995.

Serrote CML, Reiniger LRS, Stefenon VM. 2016. *Simulações em genética de população e conservação de recursos florestais*. Jundiaí: Paco Editorial.

Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, **236**(4803), 787–792.

Tremetsberger K, Urtubey E, Terrab A, Baeza CM, Ortiz MA, Talavera M, König C, Tensch EM, Kohl G, Talavera S, Stuessy TF. 2009. Pleistocene refugia and polytopic replacement of diploids by tetraploids in the Patagonian and Subantarctic plant *Hypochaeris incana* (Asteraceae, Cichorieae). *Molecular Ecology* **18**: 3668–3682.

Vekemans X. 2002. *AFLP-SURV version 1.0*. Belgium: Laboratoire de Genetique et Ecologie Vegetale. Universite Libre de Bruxelles. Available at: <http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/aflp-surv.html>. Accessed 6 December 2022.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van De Lee T, Hornes M, Frijtera A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabea UM. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407–4414.

Wang J. 2004. Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. *Conservation Biology* **18**: 332–343.

Wright S. 1978. *Evolution and the genetics of populations: variability within and among populations*. Chicago: University of Chicago.

Wu, FQ, Shen, SK, Zhang, XJ, Wang, YH, Sun, WB. 2015. Genetic diversity and population structure of an extremely endangered species: the world's largest *Rhododendron*. *AoB Plants*, 7.

Yao, X, Ye, Q, Kang, M, & Huang, H. 2007. Microsatellite analysis reveals interpopulation differentiation and gene flow in the endangered tree *Changiostyrax dolichocarpa* (Styracaceae) with fragmented distribution in central China. *New Phytologist*, 176(2), 472-480.

Zhivotovsky LA. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology* 8: 907-913.

Zuloaga, FO, O. Morrone, e MJ, Belgrano. 2008. Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 107 (1-3). 3486 pp.

7. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio a este trabalho e Bolsa de Doutorado da DCF.

8. FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

9. MATERIAL SUPLEMENTAR

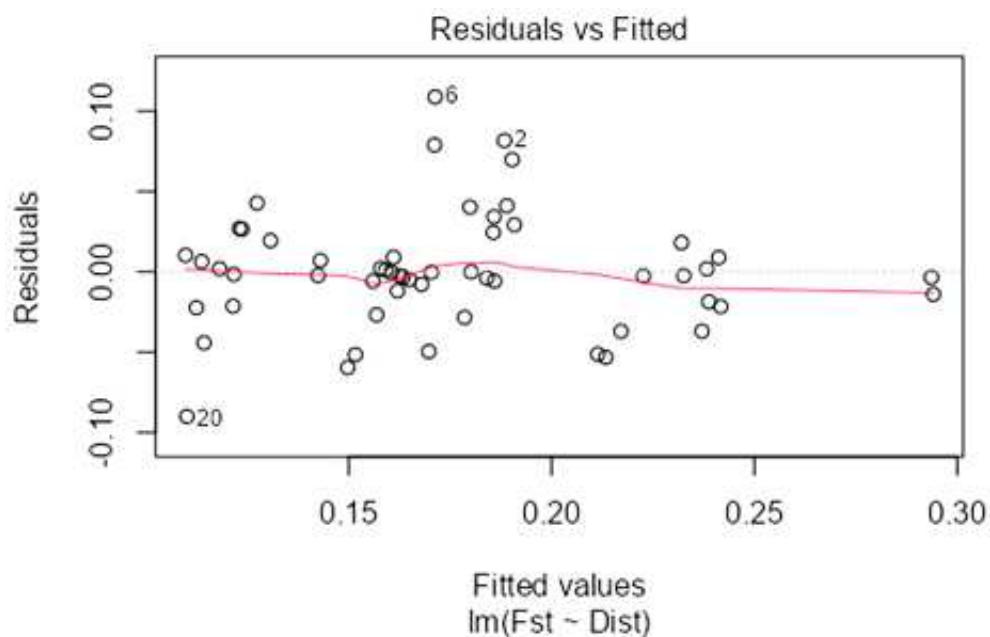


Figura S1. Gráfico de resíduos contra valores previstos para um modelo linear entre distância geográfica e diferenciação genética de *Mimosa hatschbachii*. Note que os pontos não se encontram distribuídos de maneira uniforme ao longo da reta, apresentando resíduos menores quanto maior for a diferenciação genética prevista. Este padrão indica que a diferenciação genética não responde de maneira linear às mudanças de distância geográfica.

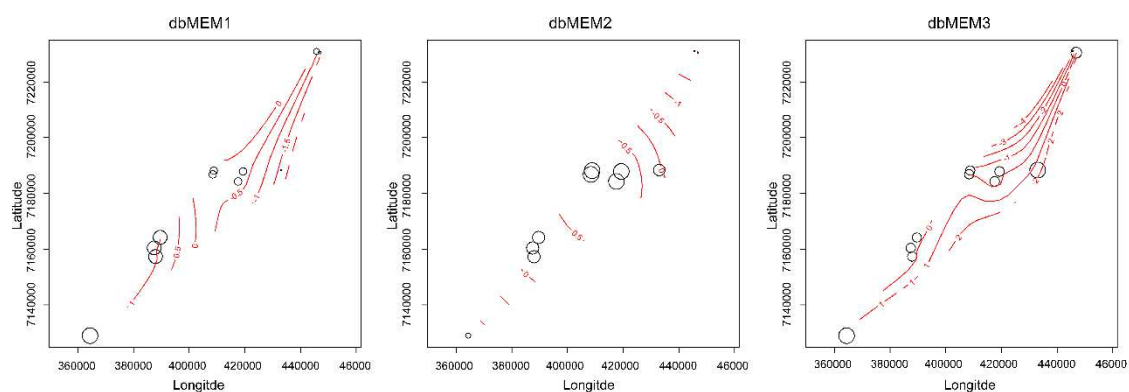


Figura S2. Mapas de autovetores de Moran baseados na distância (dbMEM) de populações de *Mimosa hatschbachii*. O tamanho do círculo representa a magnitude da pontuação de cada variável para cada população.

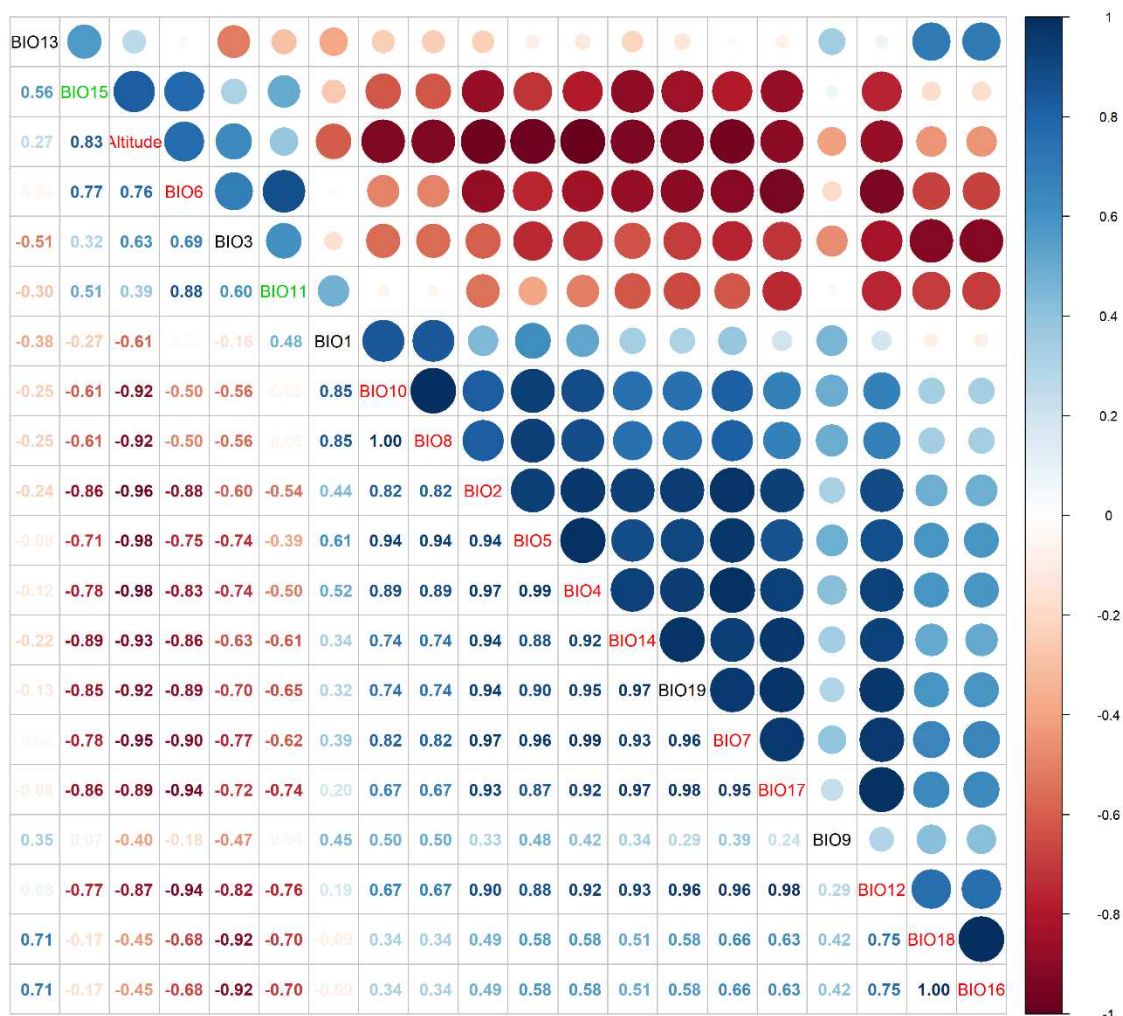


Figura S3. Matriz de correlação de Pearson entre as variáveis ambientais utilizadas como variáveis explicativas para a diferenciação genética de populações de *Mimosa hatschbachii*. As variáveis com o nome em vermelho foram eliminadas da matriz ambiental por apresentar correlação superior a 0,85 ou inferior a -0,85 com outras variáveis, enquanto as variáveis com nome em verde foram eliminadas por apresentar Fator de Inflação da Variância (VIF) superior a 10, ou seja, os seus valores podem ser previstos pelas variáveis restantes. O tamanho dos círculos e intensidade da cor indicam a correlação entre um par de variáveis, sendo que a cor vermelha indica correlação negativa, a cor azul correlação positiva, e o branco ausência de correlação.