



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA



ESTUDOS BIOSISTEMEMÁTICOS DE *BARBACENIA PARANAENSIS* L. B. SM.
(VELLOZIACEAE)

CANDIDATA: PATRÍCIA MICHELE DA LUZ

ORIENTADORA: VIVIANE DA SILVA PEREIRA

CO-ORIENTADOR: ERIC DE CAMARGO SMIDT

CURITIBA – PR

2012

RESUMO

Barbacenia paranaensis L.B.SM. (Velloziaceae) é a única representante da família ocorrente no estado Paraná e se apresenta em formações rochosas encravadas nas áreas de limite sul do cerrado brasileiro. Para compreender como o processo reprodutivo pode estar relacionado à evolução de populações de *B. paranaensis*, serão realizados estudos integrados do funcionamento floral e sistemas de polinização e reprodução, abordando os eventos sucessivos no nível floral e, se possível, em abordagem multipopulacional. Tais estudos serão fundamentais para contextualizar o nível de variabilidade e estrutura genética atual e o grau de isolamento genético entre populações disjuntas, que serão quantificados a partir do emprego de marcador molecular altamente variável do tipo ISSR para as populações da espécie, percorrendo toda a amplitude de sua distribuição geográfica. O projeto fornecerá ainda diretrizes para tomada de decisões conservacionistas sobre quais as populações são prioritárias para efetiva preservação das espécies em seus habitats naturais, pautadas em dados biológicos quantificados a cerca da viabilidade e *status* de conservação genética da espécie.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Estudos sobre a diversidade e estruturação genética de algumas das espécies ocorrentes em campos rupestres podem contribuir para um melhor entendimento dos processos evolutivos de táxons ocorrentes neste tipo de ambiente. Além disso, a disjunção de afloramentos rochosos forma um sistema comparado a ilhas oceânicas, em termos de isolamento espacial e restrição de fluxo gênico, e por apresentarem condições ecológicas distintas, que funcionam como barreiras à migração, são ideais para estudos evolutivos em espécies de plantas que ocupam este habitat (HARLEY, 1995).

A família Velloziaceae compreende cerca de 240 espécies, predominantemente de distribuição Neotropical, com 25 espécies ocorrendo na África, três em Madagascar e uma na península Arábica (sul do Yemen) (SALATINO *et al.* 2001). A biogeografia das Velloziaceae tem sido considerada de grande interesse devido a esta disjunção da sua distribuição. A taxonomia da família é extremamente controversa, tanto nas subdivisões infrafamiliais quanto na circunscrição

dos gêneros (MENEZES *et al.* 1994; BEHNKE *et al.* 2000; MELLO-SILVA, 1991, 2000, 2005; SALATINO *et al.* 2001; STEVENS, 2001). Vários autores têm dividido a família tradicionalmente em duas subfamílias, Vellozioideae e Barbacenioideae, porém com diferenças na delimitação de ambas (MELLO-SILVA, 1991). Estudos recentes mostram que a subfamília Vellozioideae é parafilética, e uma definição mais ampla, englobando as Barbacenioideae, tem sido proposta (BEHNKE *et al.* 2000; MELLO-SILVA, 2005; SALATINO *et al.* 2001; STEVENS, 2001).

O gênero *Barbacenia* tem aproximadamente 100 espécies com flores em tons claros, como branco, amarelo e lilás e em tons mais fortes como rosa, violeta e vermelho (MELLO-SILVA, 2004). Há espécies do gênero que apresentam flores tubulosas e produtoras de néctar, sendo relacionadas à coleta de recursos pelos beija-flores (CONCEIÇÃO *et al.* 2007), muito embora a aparência floral e a categorização das síndromes seja algo especulativo sem estudos de observação direta. Esse gênero apresenta flores com 6 estames, corona presente, estigmas lineares ou elípticos (MELLO-SILVA, 2009). *Barbacenia paranaensis* é a única espécie da família ocorrente no estado do Paraná. Assim como as demais espécies de Velloziaceae *B. paranaensis* ocorre em afloramentos rochosos destacados nas poucas áreas de cerrado a noroeste do estado, as quais representam o limite sul da distribuição deste bioma no Brasil. O hábito da espécie é erva perene, apresentam folhas densamente imbricadas lâminas linear-lanceolada completamente e subdensamente pilosa em ambas as faces, bainha delgada. A inflorescência é uniflora, o perianto possui de 40 a 55 mm de comprimento, verde, com tonalidades vinosas, tépalos reflexos na antese (SMITH, 1962).

O modo como as peças florais se desenvolvem e o modo como os gametas são formados são as etapas iniciais do processo reprodutivo de organismos vegetais sexuados (BRIGGS; WALTERS 1997; RICHARDS, 1997). Na flor madura, o funcionamento e as mudanças temporais nas peças florais e o modo como os grãos de pólen são expostos, determinam como os polinizadores ajustam seu comportamento à exploração dos recursos florais realizando, em contra partida, a transferência de gametas entre flores (FRANKIE; HABER 1983; THORP, 2000). Após a transferência do pólen para o estigma, processos histoquímicos são desencadeados de

modo a restringir ou permitir que grãos de pólen germinem e sejam capazes de fecundar os óvulos da mesma flor ou em flores de indivíduos distintos. Porém, nem todos os óvulos fecundados apresentarão o mesmo vigor, sendo o sucesso de sobrevivência normalmente influenciado pela origem do pólen e pela proximidade genética das plantas parentais. Em última análise, acontecimentos sucessivos, através de um sistema de filtros, estão envolvidos ao longo do processo reprodutivo, definindo que tipo de prole será preponderantemente formada, sendo este, um passo evolutivo fundamental na estruturação e na diferenciação genética em populações naturais de plantas (BRIGGS; WALTERS 1997, RICHARDS 1997).

Para se compreender como o processo reprodutivo pode estar relacionado à evolução de populações de *B. paranaensis*, fazem-se necessários estudos integrados do funcionamento floral e sistemas de polinização e reprodução, abordando os eventos sucessivos no nível floral. Tão importante quanto, é determinar o nível de variabilidade e estrutura genética atual, de modo a se estimar o grau de isolamento genético entre populações disjuntas, e os processos filogeográficos antigos, que podem eventualmente determinar a presença de linhagens genéticas divergentes entre grupos populacionais.

2. OBJETIVOS

Para compreender o processo evolutivo em populações naturalmente fragmentadas de *Barbacenia paranaensis* nos campos rupestres do Paraná serão investigados: (i) o nível atual de variabilidade e estrutura genética intra e interpopulacional; (ii) quantos contingentes populacionais podem ser detectados; (iii) quais as relações evolutivas históricas entre as populações.

Na tentativa de compreender como eventos pré e pós-fertilização podem determinar o sistema de reprodução e o nível de endogamia em populações naturais de *B. paranaensis*, será investigado: (i) quem são os polinizadores e como acessam o recurso nas flores; (ii) como as estruturas florais promovem o movimento do pólen dentro da flor e o contato do pólen e estigma com o corpo do polinizador; e (iii) caso seja uma espécie autocompatível, se existe redução na viabilidade e germinação de sementes originadas por autocruzamentos ou cruzamentos entre vizinhos, possivelmente aparentados.

3. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA

Atividades	Semestres			
	1	2	3	4
Coleta de amostras em campo	X			
Extração de DNA e inclusão das amostras no DNAUPCB	X			
Amplificação e eletroforese dos fragmentos de ISSR		X	X	
Análise dos dados de variabilidade genética		X	X	X
Estudo de biologia floral, polinização e sistema de reprodução		X		X
Elaboração de artigos científicos				X
Apresentação dos resultados em eventos científicos				X
Redação final da dissertação				X

4. MATERIAL E MÉTODOS

Populações e amostragem

As áreas de estudo encontram-se localizadas na região dos Campos Gerais do Paraná, Sul do Brasil. No levantamento prévio foi verificado que a espécie encontra-se no município de Sengés, na localidade Rio do Funil, Fazenda Morungava e existem informações que foi encontrada no município de Itararé (Species Link 2012, acesso em 12 de março de 2012). Com base nesses dados, o presente projeto irá verificar essas localidades e buscar outros possíveis locais para amostrar todos os indivíduos encontrados nas populações.

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

O DNA total será extraído seguindo protocolo de DOYLE;DOYLE (1987) e os produtos de extração serão visualizados em gel de agarose 0,8% e tampão TAE 1x, corados em brometo de etídio e fotografados. O DNA total será armazenado em ultrafreezers (-80°C) e as amostras serão tombadas no banco de DNA total da Universidade Federal do Paraná (DNAUPCB).

Para investigar estrutura e divergência interpopulacional serão empregados marcadores dominantes altamente variáveis como os ISSRs em cerca de 20 indivíduos por população. Para amplificação através de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) seguiremos o protocolo para um

volume final de 20 μ l, contendo: tampão1X, 2,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,5mM de *primer*, 1 unidades de *Taq*DNA polimerase (Invitrogen) e cerca de 15 a 150ng de DNA genômico. Para a amplificação dos fragmentos seguiremos o programa com desnaturação inicial a 94°C por 1,5 min, seguido de 36 ciclos de amplificação a 94°C por 40 segundos a desnaturação, intervalos de 47° a 50°C por 45 segundos para o anelamento, 72°C por 1,5 minuto para a extensão, seguindo, após a etapa de ciclagem, uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Análise dos dados genéticos

Os locos de ISSR serão codificados como presença (1) ou ausência (0) de uma banda para a construção de uma matriz de fenótipos. Serão consideradas homólogas todas as bandas de tamanho molecular em um mesmo primer (WILLIAMS *et al.* 1993). Uma matriz de distâncias euclidianas quadradas será construída a partir da matriz de fenótipos ISSR e submetida a uma análise de variância molecular (AMOVA), utilizando o programa GenAIEx 6.3 do Excel® (PEAKALL & SMOUSE 2006). A AMOVA será utilizada para quantificar a proporção da diversidade genética intraespecífica atribuída à diferença interpopulacional. Através da AMOVA será produzida uma matriz de Φ ST entre todos os pares de populações, que será utilizada para construir uma árvore utilizando *neighbour-joining* através do programa PHYLIP (FELSENSTEIN 1993). Será conduzida análise Bayesiana a partir de simulações de Monte Carlo e Cadeia de Markov (MCMC) para avaliar a estrutura populacional, utilizando genótipos multilocus dos indivíduos amostrados, para detecção de *K* prováveis populações, assumindo modelo de populações mistas utilizando o programa STRUCTURE 2.2 (FALUSH *et al.* 2007) para marcadores dominantes.

Biologia floral, polinização e sistema de reprodução

O padrão fenológico de reprodução será acompanhado desde o início da formação de botões até a formação dos frutos, em cerca de 70 indivíduos marcados, em intervalos semanais. Onde será descrito quantitativamente o processo de produção floral durante toda a fase reprodutiva no nível populacional.

Para a compreensão da biologia e do funcionamento floral serão descritos: todo o processo de antese e amadurecimento das peças reprodutivas para verificação da possível ocorrência de

isolamento temporal entre gineceu e androceu; a morfologia floral e polínica; a microestrutura e recompensas a partir da dissecação das peças florais; presença de osmóforos em teste com vermelho neutro; e presença de pigmentos que absorvem no ultravioleta a partir de testes em atmosfera de hidróxido de amônio (DAFNI 1992).

A diversidade e o comportamento de visita dos polinizadores de *B. paranaensis* serão investigados através de observação focal em períodos intercalados durante todo o dia e parte da noite, de modo que possamos verificar quais são os visitantes, em que frequência realizam visitas e qual horário de maior atividade. Será dada ênfase na descrição do comportamento do polinizador em relação à manipulação das peças reprodutivas e padrão de transferência polínica, número de visitas realizadas na mesma planta e de alternância de plantas visitadas durante o forrageamento do polinizador. Caso se confirme entomofilia, visitantes florais serão coletados durante as visitas e identificados por especialista. Por outro lado, caso se confirme, ornitofilia os visitantes serão fotografados e identificados a partir de guias de campo.

Para o estudo do sistema de reprodução e verificação da possível ocorrência de autocompatibilidade em *B. paranaensis* serão realizadas polinizações experimentais, em duas populações distintas, utilizando: 40 flores para autopolinizações; 40 para polinizações cruzadas; 40 botões florais ensacados para exclusão dos polinizadores e verificação da eventual ocorrência de autopolinização espontânea e agamospermia; e 40 flores marcadas como controle. Serão analisados todos os frutos resultantes dos tratamentos para a estimativa da viabilidade dos embriões. A variância do número de sementes bem formadas por tratamento será analisada através de ANOVA um critério e as médias comparadas pelo teste Tukey, na intenção de se testar a possível ocorrência de depressão endogâmica nas populações. A taxa de sucesso reprodutivo em condições naturais será avaliada através da quantificação de frutos formados por planta em relação ao número de flores produzidas, em planta não manipuladas, de indivíduos diferentes.

Serão fixadas em FAA amostras de flores de todos os tratamentos após 18, 24, 48 e 72h, para o acompanhamento e descrição do crescimento do tubo polínico, em microscópio de epifluorescência.

5. VIABILIDADE DE EXECUÇÃO DO PROJETO

O trabalho será realizado no Departamento de Botânica da UFPR, no Laboratório de Filogenia e Genética da Conservação de Plantas e no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular, que dispõem de todos os equipamentos necessários para extração, armazenamento, amplificação de amostras de DNA, quantificação e fotodocumentação de produtos amplificados e demais reações. Embora existam recursos financeiros que viabilizem parte do material de consumo necessário ao desenvolvimento do projeto de dissertação proposto, este projeto será submetido a editais de financiamento de órgãos de fomento científico, como Cnpq, Fundação Araucária e Fundação Boticário.

6. PRODUTOS ESPERADOS

Serão apresentados três pôsteres com resumos publicados em anais de congressos nacionais ou internacionais, e publicados dois artigos científicos em periódicos de reconhecida qualidade na área da pesquisa. O projeto fornecerá ainda diretrizes para tomada de decisões conservacionistas sobre quais as populações são prioritárias para efetiva preservação das espécies em seus habitats naturais, pautadas em dados biológicos quantificados a cerca da viabilidade e *status* de conservação genética da espécie.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEEHNKE, H. D.; TREUTLEIN, J.; WINK, M.; KRAMER, K.; SCHNEIDER, C.; KAO, P. C. Systematics and evolution of Velloziaceae, with special reference to sieve-element plastids and *rbcL* sequence data. ***Botanical Journal of the Linnean Society*** v.134, p. 93-129, 2000.
- BRIGGS, D.; WALTERS, S.M.. **Plant variation and evolution** 3rd ed. University Press, Cambridge.1997
- CONCEIÇÃO, A. A.; FUNCH, L. S.; PIRANI, J. R. Phenology, pollination and seed dispersal syndromes on sandstone outcrop vegetation in the "Chapada Diamantina", northeastern Brazil: population and community analyses. ***Revista Brasileira de Botânica*** v.30. p. 475-485, 2007.
- DAFNI, A. **Pollination ecology**: - a practical approach. New York: Oxford University Press, p.250, 1992.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.S. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. ***Phytochemistry Bulletin*** v. 19, p. 11-15, 1987.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using

- multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**. STRUCTURE v.2.2, 2007. Disponível em: <<http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>>. Acessado em: 20/01/2011.
- FELSENSTEIN, J. **PHYLIP (Phylogeny inference package) version 3.5c**. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, 1993.
- FRANKIE, G.W.; HABER, W.A. Why bees move among mass-flowering neotropical trees. P. 360-372 In: Jones, C.E. & R.J Little (eds.) **Handbook of experimental pollination biology**. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1983.
- HARLEY, R.M. Introduction In: B.L. Stannard (ed.) Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Brazil. **Kew, Royal Botanic Garden** p. 1-40, 1995.
- MELLO-SILVA, R. The infra-familial taxonomic circumscription of the Velloziaceae: a historical and critical analysis. **Taxon** v.40, p. 45-51, 1991.
- MELLO-SILVA, R. Partial cladistic analysis of *Vellozia* and characters for the phylogeny of Velloziaceae. In: Wilson, K. L. & Morrison, D. A. (eds.), **Monocots: systematics and evolution**. CSIRO, Melbourne, p. 505-522, 2000.
- MELLO-SILVA, R. Novitates velloziacearum florum phanerogamicarum Sancti Pauli. **Revista Brasileira Botânica**, v.27, n.3, p.453-462, 2004.
- MELLO-SILVA, R. Morphological analysis, phylogenies and classification in Velloziaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society** v.148, p. 157-173, 2005.
- MELLO-SILVA, R. Flora de grão-mogol, Minas Gerais: Velloziaceae. **Boletim Botânico Universidade São Paulo** v.27, n.1, p.109-118, 2009.
- PEAKALLI, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Vancouver, v. 6, p. 288-295, 2006.
- RICHARDS, A.J. **Plant breeding systems**, 2^a ed. Chapman & Hall, London, 1997.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; MELLO-SILVA, R.; VAN SLUYS, M. A.; GIANNASI, D. E.; PRICE, R. A. Phylogenetic inference in Velloziaceae using chloroplast *TrnL-F* sequences. **Systematic Botany** v.26, p. 92-103, 2001.
- SHAW, J.; LICKY, E. B.; SCHILLING, E. E. & SMALL, R. L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany** v. 94, n. 3, p. 275–288, 2007.
- SMITH, L.B. Origins of the flora of southern Brazil – A synopsis of the American Velloziaceae. **Contributions from the United States National Herbarium** v.35, p.280, 1962.
- STEVENS, P.F. 2001. Angiosperm phylogeny website, version 9, June 2008 [more or less continuously updated]. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> (accessed 7 March 2012).
- THORP, R.W. The collection of pollen by bees. **Plant Systematics and Evolution** v.222,

p. 211- 223, 2000.

WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods on Enzymology** v. 218, p. 704–740, 1993.