

LUAN SALLES PASSOS

AVALIAÇÃO DA DISPERSÃO DE PÓLEN DE TAXONS OCORRENTES NOS  
AFLORENTOS ROCHOSOS PRESENTES EM MOSAICOS DE VEGETAÇÃO CAMPO-  
FLORESTA NA REGIÃO SUBTROPICAL DA AMÉRICA DO SUL

Projeto de pesquisa apresentado como requisito inicial para a obtenção do título de Doutor pelo Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Fabiano Rodrigo da Maia

*Luan Salles Passos*

Luan Salles Passos

*Fabiano R. Maia*

Fabiano Rodrigo da Maia

Curitiba

2021

## INTRODUÇÃO

As plantas são organismos sésseis e, portanto, a dispersão de diásporos é a principal forma de manutenção do fluxo gênico, que somada aos fatores evolutivos como seleção, deriva genética e mutação, além de fatores ecológicos, exercem influência direta na diversidade e estruturação genética dentro e entre populações (Wright, 1943; Loveless & Hamrick, 1984; Slatkin, 1985; Sork, 2016). Nas plantas com sementes (Spermatophyta) o fluxo gênico é resultado das dinâmicas de dispersão do pólen e sementes (revisado em Ghazoul, 2005).

A polinização, principalmente mediada por agentes bióticos, pode favorecer a polinização cruzada, reduzindo as taxas de extinção (Regal, 1977), além de estar relacionada a maiores taxas de especiação, principalmente por promover mecanismos de isolamento reprodutivo relacionados à variação geográfica de traços morfológicos e comportamentais das plantas e seus polinizadores (Bawa, 1990). Enquanto a dispersão de sementes pode estar relacionada à colonização ou reestabelecimento de indivíduos em áreas distintas (Regal, 1977). Conseqüentemente, tanto a polinização quanto a dispersão de sementes são apontadas como as principais causas da alta diversidade genética das angiospermas e também como agentes da irradiação das plantas com flores (Bawa, 1995).

A contribuição da dispersão do pólen e sementes para o fluxo gênico dentro e entre (sub)populações varia substancialmente entre espécies, ou mesmo entre diferentes escalas espaciais de uma mesma espécie (McCauley, 1997). Em grande parte das espécies vegetais, as sementes geralmente são dispersas a pequenas distâncias da planta-mãe (Willson, 1993), como ocorre em espécies autocóricas (Vittoz & Engler, 2007). Nestes casos, a polinização possui função fundamental na manutenção do fluxo gênico e, conseqüentemente, na estruturação genética.

A polinização, por sua vez, é influenciada por diversos fatores que variam em uma escala de espaço e tempo, como a fenologia e sistema reprodutivo das plantas (Elzinga *et al.*, 2007; Oliveira & Maruyama, 2014; Maia *et al.*, 2018), disponibilidade de recursos, comportamento e composição dos polinizadores (Rathcke, 1992; Goulson, 1999; Jürgens *et al.*, 2009; Zambon *et al.*, 2020) e padrões de distribuição espacial dos indivíduos vegetais (e.g., fragmentação, densidade e abundância; Ghazoul, 2005; Hanoteaux *et al.*, 2013). Além disso, a paisagem também tem papel fundamental na variação da diversidade genética e fluxo gênico (Shirk *et al.*, 2010; Zeller *et al.*, 2012; Balkenhol *et al.*, 2016; Monteiro *et al.*, 2019). Estudos em paisagens ambientalmente complexas, embora sejam escassos, apontam tal fator como um dos agentes capazes de moldar o fluxo gênico e estruturação genética de populações naturais (Sork *et al.*, 1999; Turcheto *et al.*, 2015; Maia *et al.*, 2018; Cruzan & Hendrickson, 2020).

O estado do Paraná, região sul brasileira, possui em seu território uma significativa diversidade fitofisionômica, consequência da ação mútua de aspectos geográficos, geológicos, históricos e climáticos (Labiak, 2014). Embora a Floresta Ombrófila Mista (FOM) ou “Floresta com Araucária” - devido ao predomínio do pinheiro *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae) nesta formação florestal - seja a principal formação vegetacional no estado, especificamente no Segundo Planalto Paranaense há uma ampla distribuição de campos naturais (Maack, 2002; Labiak, 2014). Esta região, informalmente denominada “Campos Gerais”, é formada por um complexo mosaico de campo e floresta, com relictos de savana e campos rupestres (Cerrado; Veloso *et al.*, 1991; Maack, 2002). Este mosaico vegetacional é resultado de uma provável formação de campos originais do Pleistoceno (Behling, 1997; Maack, 2002). Entretanto, posteriores mudanças para um clima mais úmido favoreceram a expansão de formações florestais em áreas de solos mais profundos e próximos a corpos d’água (Behling, 1997; Maack, 2002), culminando no cenário paisagístico mais próximo do encontrado atualmente. Este ambiente tão heterogêneo configura um sistema único e de grande importância na investigação de como uma paisagem complexa pode afetar a distribuição de indivíduos vegetais e sua interação com polinizadores, moldando os padrões de dispersão de pólen e, consequentemente, o sucesso reprodutivo e estruturação genética dessas espécies.

As formações campestres paranaenses podem ser classificadas de acordo com as características de profundidade e drenagem do solo em campos secos ou úmidos (Moro & Carmo, 2007). Ainda, nos campos secos há um tipo de vegetação restrita a afloramentos rochosos, os refúgios vegetacionais rupícolas (*sensu* Moro & Carmo, 2007). Estes refúgios representam um padrão vegetacional muito singular, detendo um considerável número de espécies endêmicas da região (Moro & Carmo, 2007; Maia & Goldenberg, 2014), fato que revela a importância deste tipo de vegetação. Além disso, o padrão de distribuição restrito de algumas espécies faz deste sistema um excelente modelo para investigar os processos que moldam a dinâmica de dispersão de sementes e pólen dentro e entre afloramentos. Podendo gerar impacto na diversidade e estruturação genética, considerando os padrões de distribuição dos indivíduos nestes refúgios e reconhecendo possíveis barreiras naturais capazes de influenciar no fluxo gênico entre eles (e.g., Lousada *et al.*, 2011), como matrizes florestais de FOM ou savanas.

Táxons da família Melastomataceae são notáveis modelos para testar hipóteses acerca do impacto da paisagem e do padrão de distribuição dos indivíduos na dispersão e sucesso reprodutivo de espécies ocorrentes em áreas de campos rupestres. Embora seja uma família megadiversa, constituída por cerca de 5750 espécies em 177 gêneros (Michelangeli *et al.*, 2020), podemos destacar três pontos principais que justificam essa importância: (i) sua ampla ocorrência em campos rupestres da região

subtropical da América do Sul (Romero & Martins, 2002; Faria *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2012); (ii) a presença de um sistema especializado de polinização conservado na maioria das espécies (Renner, 1989), onde a dispersão de pólen se dá quase obrigatoriamente por abelhas capazes de vibrar as anteras para acessar o pólen (*buzz-pollination*; Buchmann, 1983); e, (iii) pela existência de espécies com frutos secos que apresentam sementes sem adaptações para dispersão a longas distâncias, disseminadas por vetores abióticos; e espécies de frutos bacáceos, principalmente da tribo Miconieae, dispersos por animais (Brito *et al.*, 2017).

De maneira geral, o entendimento dos fatores acima nos permite fazer inferências sobre a história de vida das espécies de Melastomataceae em áreas campestres, e também compreender padrões e processos que influenciam espécies com biologia semelhante. Ainda, a maioria dos estudos envolvendo fluxo gênico e estruturação genética trabalha com hipóteses a nível interpopulacional ou de espécie (Brito *et al.*, 2016; Maia *et al.*, 2017a), poucos trabalhos estudaram padrões espacialmente localizados. Essa lacuna pode negligenciar processos que ocorrem em escalas menores e/ou em determinados ambientes de paisagens tão peculiares como os campos rupestres no mosaico vegetacional campo-florestal com relictos de Cerrado encontrados na região subtropical da América do Sul. Esse padrão vegetacional é capaz de gerar variações geográficas em microescala nos mais diversos aspectos (e.g., fenologia, sistemas reprodutivos, interação com polinizadores), resultando em eventos locais que podem culminar em linhagens microendêmicas.

## **OBJETIVO DA TESE**

O objetivo central desta tese é investigar como as características da paisagem e dos padrões de distribuição dos indivíduos afetam, em microescala, a abundância e comportamento de polinizadores, e a dispersão de pólen e suas consequências (e.g., sucesso reprodutivo, estruturação genética, fluxo gênico, etc.) em táxons que ocorrem em paisagens fragmentadas com base no mosaico vegetacional composto de campos naturais, campos rupestres, FOM, e savanas, em três unidades de conservação (UC) do estado do Paraná, a saber: Parque Estadual de Vila Velha (PVV), Parque Estadual do Guartelá (PEG) e Parque Estadual do Cerrado (PEC). Nosso intuito é extrapolar nossos resultados para espécies endêmicas com padrões semelhantes de distribuição em áreas similarmente complexas.

## **Objetivos específicos**

Para respondermos nosso objetivo central, estabelecemos os seguintes objetivos específicos:

1) Avaliar como a paisagem fragmentada e a distribuição dos indivíduos nas três UC's afetam a abundância de polinizadores, e qual a consequência para o sucesso reprodutivo desses indivíduos, utilizando como modelo espécies da família Melastomataceae (Capítulo 1);

2) Compreender os padrões de dispersão de pólen dentro e entre os afloramentos rochosos de *Pleroma hatschbachii* (Wurdack) P. J. F. Guim. & Michelang., a partir de experimentos com tintura em pó fluorescente (material análogo ao pólen) e marcadores genéticos no PEG (Capítulo 2);

3) Investigar se a distância entre indivíduos influencia no sucesso reprodutivo de espécies densamente distribuídas em afloramentos rochosos e espécies com distribuição esparsa nos mosaicos campo-floresta considerados (Capítulo 3).

Baseados em nossos objetivos, propusemos as seguintes hipóteses: (1) as formações florestais dos mosaicos campo-floresta terão dois papéis na dispersão de pólen: i. apresentarão impacto positivo (fonte de polinizadores) no número de visitas de polinizadores nos indivíduos floridos do entorno; ii. atuarão como barreira para dispersão de pólen entre indivíduos separados por essas formações. Ainda, espécies com dispersão autocórica apresentarão maior densidade de indivíduos, portanto, também apresentarão maior quantidade de visitas. (2) A dispersão polínica dentro de um afloramento será maior que o esperado ao acaso, devido seguir a distribuição dos vizinhos mais próximos. Portanto, encontraremos uma significativa estruturação genética espacial intrapopulacional, resultado do baixo fluxo gênico entre afloramentos devido à fragmentação natural do habitat de *P. hatschbachii* (afloramentos rochosos). (3) Baseando-nos no modelo de isolamento pela distância (Wright, 1951) e na densidade de indivíduos, o efeito da distância de cruzamento entre indivíduos será maior entre as espécies que apresentarem distribuição restrita aos afloramentos rochosos. Enquanto em espécies com distribuição mais esparsa não haverá efeito da distância de cruzamento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de estudo

Conduziremos nossos estudos em três unidades de conservação distintas, todas situadas no Segundo Planalto do estado do Paraná, são elas: Parque Estadual de Vila Velha (PVV), Parque Estadual do Guartelá (PEG) e Parque estadual do Cerrado (PEC). O PVV está localizado no município de Ponta Grossa (25°12'34"S; 50°03'37"O) e apresenta uma área de 3803,3 ha (Silva, 2018). O clima do PVV é o *Cfb* (temperado e úmido), conforme a classificação de Köppen, com média anual de precipitação de 1554 mm, sendo janeiro o mês mais chuvoso (Silva, 2018; Caramari, 2004). O PEG está situado no município de Tibagi, (24°34'10"S; 50°15'25"O), com uma área de aproximadamente 789,97 ha (Carmo & Assis, 2012). O PEG apresenta uma topografia muito variada, sendo que nas

porções mais baixas, entre 800 – 900 m acima do nível do mar, está inserido o Rio Iapó, um dos limites da unidade; e, com as altitudes mais elevadas variando entre 1050 – 1150 m (Carmo & Assis, 2012). O clima do PEG, de acordo com a classificação de Köeppen, é o *Cfa* (subtropical, úmido e quente) com influência do *Cfb* (temperado e úmido), com ocorrência de geadas durante o inverno (Maia & Goldenberg, 2014). A média de precipitação mensal está próxima dos 116,23 mm, sendo janeiro e fevereiro considerados os meses mais chuvosos (Maia & Goldenberg, 2014). O PEC, por sua vez, está localizado no município de Jaguariaíva (24°16'00"S; 49°49'21"O), totalizando 426,62 há de área (Uhlmann *et al.*, 1997). O clima da região conforme a proposta de Köeppen é o *Cfb* (temperado e úmido), com altitude variando de 800 – 900 m acima do nível de mar, sendo que o Rio Jaguariaíva está inserido em declives mais acentuados atingindo cerca de 750 m acima do nível do mar (Uhlmann, 1995).

Devido à marcada variação na topografia, influências climáticas, propriedades edáficas, além da história da região, ambas as UC's apresentam uma notória heterogeneidade vegetacional, formando um ecótono entre Mata Atlântica e Cerrado, sendo o limite austral deste último bioma (Veloso *et al.*, 1991; Maack, 2012; Labiak, 2014). A vegetação de Mata Atlântica tem influência de formações campestres e florestais, como FOM e elementos de Floresta Estacional Semidecidual (FES; ver Carmo & Assis, 2012), formando um complexo mosaico campo/floresta com formações de campos rupestres.

### **Espécies Modelos**

Para o Capítulo 1, as espécies serão definidas conforme distribuição nas áreas de pesquisa (em torno de 4-5 espécies). Para esta escolha serão definidos os seguintes critérios: espécie com reprodução reconhecidamente sexuada (não-apomíticas; veja Maia *et al.*, 2016a) e que apresentem um número significativo de indivíduos nas áreas de estudo. Além disso, selecionaremos espécies com diferentes mecanismos de dispersão de diásporos, ou seja, espécies com frutos secos (autocoria) e com frutos carnosos (zoocoria).

No capítulo 2, trabalharemos com *Pleroma hatschbachii* (Wurdack) P. J. F. Guim. & Michelang. (= *Tibouchina hatschbachii* Wurdack; ver Michelangeli *et al.*, 2020). Uma espécie arbustiva endêmica do estado do Paraná e sul de São Paulo (Meyer *et al.*, 2009). Esta espécie apresenta distribuição local restrita a afloramentos rochosos (Meyer *et al.*, 2009; Maia & Goldenberg, 2014). A espécie é autocompatível e polinizada por abelhas de grande porte (e.g., abelhas do gênero *Bombus*; Maia *et al.*, 2018) capazes de vibrar as anteras para acessarem o pólen de forma legítima (polinização vibrátil ou *buzz-pollination*; Buchmann, 1983). Os frutos são secos do tipo cápsula, que se abrem e liberam milhares de sementes que, por sua vez, não apresentam adaptações para dispersão a longa

distância (Maia *et al.*, 2018). Tal característica foi apontada como um dos principais fatores da elevada estruturação genética entre as populações da espécie (Maia *et al.*, 2017).

A princípio, para o Capítulo 3, além de *P. hatschbachii*, pré-selecionamos outras três espécies, *Pleroma guartelaensis* F. S. Mey & R. Goldenb., *Chaetostoma armatum* (Spreng.) Cogn. e *Miconia sellowiana* Naudin. *Pleroma guartelaensis* é um arbusto com flores pentâmeras de pétalas roxas, possui dez estames dimórficos e frutos capsulares (Meyer & Goldenberg, 2014). *Chaetostoma armatum* é uma espécie de subarbusto, de flores 4-5 meras de pétalas rosas (Silva *et al.*, 2020). *Miconia sellowiana* é uma espécie de porte arbustivo a arbóreo, de flores pequenas, pentâmeras e diplostêmones, e frutos bacáceos (Goldenberg, 2004). Assim como *P. hatschbachii*, *C. armatum* e *M. sellowiana* são autocompatíveis (Maia *et al.*, 2016a). Não há até o presente momento dados sobre biologia reprodutiva e polinização para *P. guartelaensis*.

Coletaremos amostras de ramos férteis de todas as espécies para posterior prensagem e herborização dessas plantas (Mori *et al.*, 1989), que serão o material testemunho do desenvolvimento de nosso projeto. Esses exemplares serão então depositados no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB).

## **Metodologia que contempla o Capítulo 1**

### *Análise da paisagem*

Avaliaremos o efeito da paisagem sobre a abundância de polinizadores de espécies de Melastomataceae através da definição das classes de ocupação vegetal na área de estudo, com base em técnicas de classificação do uso do solo a partir dos complementos *Semi-automatic Classification Plugin* (Congedo, 2016) e *Thematic Raster Editor* (Corredor, 2021) do software QGIS v3.14 Hannover (QGIS Development Team, 2019). Com auxílio destes complementos, classificaremos o uso do solo com definição de pixel de 1x1 m. A classificação será realizada a partir de imagens do satélite *Copernicus Sentinel* para os mesmos períodos de coleta dos dados, que possuem definição de pixel de 10 x 10, disponíveis no catálogo do INPE (2020). Consideraremos dois níveis de influência da paisagem: vegetação local (VL) e paisagem próxima (PP). Para VL serão realizados recortes em raios de até 150 m, para PP em raios de até 3000 m (Moreira *et al.*, 2015), ambos a partir do ponto central das unidades amostrais (indivíduos). Para os recortes de PP, será calculado o Índice de Diversidade de Shannon-Wiener para paisagem (SHDI). Esta métrica é baseada no cálculo do somatório da proporção de cada classe multiplicado pelo logaritmo neperiano dessa proporção. Assim, quanto mais diversa a quantidade de tipos de vegetação e a área que ocupa na paisagem, maiores serão os valores de Shannon-Wiener (Moreira *et al.*, 2015). Para PP, além de SHDI será calculada a métrica de isolamento

de fragmentos florestais e o percentual de cobertura florestal. O isolamento será estimado a partir da distância euclidiana média do vizinho mais próximo (ENM\_MN), que quantifica o isolamento dos fragmentos a partir da distância média entre os fragmentos mais próximos. O percentual de cobertura (PLAND) florestal será estimado a partir do percentual de ocupação da classe dentro do raio. Todas as métricas serão calculadas a partir do complemento “*landscapemetrics*” (Hesselbarth *et al.*, 2019).

Para testar a hipótese do efeito da paisagem sobre o sucesso reprodutivo de Melastomataceae, realizaremos uma seleção de modelos lineares generalizados (GLM) uni e multivariados, onde a variável dependente (abundância de polinizadores) será modelada em função das métricas de paisagem (SHDI, ENM\_MN e PLAND). A seleção de modelos será realizada através do critério de informação de Akaike de segunda ordem (AICc). Além do melhor modelo, serão considerados plausíveis os modelos com  $\Delta AICc < 2$  e AICc superior ao do modelo nulo (Burnham & Anderson, 2002). As análises serão realizadas através do pacote *MuMIn* (Bartoń, 2009) no ambiente *R* (R Core Team, 2020).

#### *Densidade dos indivíduos e tipo de vegetação em que ocorrem*

Com as espécies definidas, realizaremos um censo populacional dos indivíduos potencialmente reprodutivos (i.e., não serão amostradas plântulas e juvenis). Descreveremos os padrões de distribuição e densidade dos indivíduos, assim como a classe de ocupação vegetal onde se encontram através do georreferenciamento com GPS de todos os indivíduos, e análises espaciais com o auxílio do *software* QGIS v3.14 Hannover (QGIS Development Team, 2019) e o pacote *dismo* do ambiente *R* (R Core Team, 2020). Durante a fenofase de floração, registraremos o número de indivíduos floridos e a quantidade de flor/indivíduo como possível efeito no número de visitas.

#### *Observação de polinizadores*

Registraremos a guilda de visitantes florais para cada espécie selecionada por dois anos consecutivos com a finalidade de relacionarmos os dados das análises da paisagem com a quantidade de visitas. Assim, sistematizaremos nossas observações da seguinte forma: os indivíduos identificados serão observados durante 30 minutos, ao fim deste período, passaremos a outro indivíduo da mesma espécie, observando um total de  $n$  indivíduos por período de floração, sendo  $n$  o número de indivíduos floridos observados por espécie. Registraremos a identidade do indivíduo visitado, a quantidade de flores disponíveis aos visitantes, a riqueza e abundância de visitantes e o horário das visitas por dois anos consecutivos. Consideraremos apenas as visitas legítimas, ou seja, quando os visitantes tocarem tanto o estigma quanto as anteras. As observações serão realizadas durante o período específico da

antes das espécies selecionadas em dias ensolarados ou parcialmente nublados, sem precipitação (Silveira *et al.*, 2002). Por fim, calcularemos a frequência de visita (em visitas.flor<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) para que possamos comparar as diferenças no padrão de visitas e associarmos às métricas de paisagem. Os visitantes serão coletados com uma rede entomológica e sacrificados em acetato de etila para futura identificação por especialistas.

### *Sucesso reprodutivo*

Avaliaremos o sucesso reprodutivo nas espécies selecionadas através da proporção de frutos formados em um total de dez flores marcadas e disponíveis aos polinizadores em um único indivíduo, com réplicas em  $x$  indivíduos (a quantidade  $x$  poderá variar de acordo com a espécie e a quantidade de indivíduos floridos), e pela proporção de sementes formadas, baseados na média de óvulos/flor na população de cada espécie. Estes dados serão coletados por dois anos consecutivos, seguindo o mesmo período da observação dos polinizadores (seção *Observação de polinizadores*).

## **Metodologia que contempla o Capítulo 2**

### *Variabilidade e estruturação genética dentro e entre afloramentos*

Para avaliação da variabilidade e estruturação genética de *Pleroma hatschbachii* dentro e entre afloramentos, utilizaremos dados genéticos extraídos de oito locos microssatélites polimórficos específicos descritos por Maia *et al.* (2016b). O material genético foi extraído e genotipado a partir de indivíduos adultos e progênies amostradas em três afloramentos distintos no PEG no ano de 2017. Estes dados compõem um conjunto do banco de dados de Maia e colaboradores (2017; dados não publicados). Este banco foi produzido em parceria com a Dra. Viviane Silva-Pereira e o Dr. Renato Goldenberg, ambos docentes do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e que deverão ser coautores deste capítulo. Os afloramentos estudados apresentam densidade de indivíduos visualmente diferentes. O AR-1 é separado do AR-2 pelo Rio Tibagi, e do AR-3 por 430 m de distância em linha reta. Entre AR-1 e AR-3 há uma malha de vegetação florestal separando estes afloramentos. Para responder às questões genéticas propostas, utilizaremos as matrizes de frequências alélicas e genótípicas de cada loco para calcular os índices de diversidade genética. Estes índices serão calculados através dos pacotes *diveRsity* (Keenan *et al.*, 2013), *PopGenKit* (Paquette, 2012) e *poppr* (Kamvar *et al.*, 2014) no ambiente *R* (R Core Team, 2020).

Para a análise de estrutura genética espacial em fina-escala, utilizaremos como base a estimativa do coeficiente de parentesco entre pares de indivíduos (*F<sub>ij</sub>*; Loiselle *et al.*, 1995), utilizando o *software* SPAGeDi 1.5 (Hardy & Vekemans, 2002). Com os dados de georreferenciamento dos indivíduos em

cada afluoramento no ano de 2017, empregaremos as coordenadas (X, Y) para gerar uma matriz de distâncias geográficas entre pares de indivíduos. As classes de distâncias serão definidas pelo SPAGeDI. A estrutura genética espacial será quantificada por meio do cálculo de  $S_p$  (Vekemans & Hardy, 2004).

Estimaremos a diferenciação genética populacional utilizando os valores de  $\theta$  como um estimador do coeficiente de endogamia entre cada par de afluoramentos ( $F_{ST}$ ; Weir & Cockerham, 1984). Os intervalos de confiança dessas estimativas serão calculados com 10.000 reamostragens *bootstrap*. As inferências de estrutura populacional, número de subpopulações geneticamente homogêneas e atribuição dos indivíduos (Q) em cada *cluster* mais provável serão realizadas por meio de uma abordagem bayesiana no *software* STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Selecionaremos os parâmetros previamente com base no conjunto de dados.

Avallaremos se os afluoramentos são geneticamente diferenciados, devido a um isolamento por distância (Wright, 1965), através de análises realizadas a partir do nosso conjunto de dados com auxílio dos pacotes *geneland* (Guillot *et al.*, 2005) e *dismo* no ambiente R (R Core Team, 2020).

### *Dispersão de pólen*

A dispersão de pólen em *P. hatschbachii* no PEG será estimada de maneira direta e indireta, através de rotas de polinizadores e dispersão de tintura em pó fluorescente (material análogo ao pólen), e dados moleculares, respectivamente. Destacamos que abordagem indireta será baseada no ano de 2017, quando foram coletados os dados moleculares.

Para descrever a rota de polinizadores, utilizaremos apenas as abelhas classificadas como polinizadoras por Maia *et al.* (2018). Para tanto, descreveremos os padrões de distribuição dos indivíduos conforme metodologia descrita em *Densidade dos indivíduos e tipo de vegetação em que ocorrem*. Assim, observaremos um polinizador a partir de uma planta focal e sua rota em um único afluoramento. Registraremos os seguintes parâmetros: espécie do polinizador, quantidade de flores disponíveis e visitadas/indivíduo, quantidade de indivíduos visitados, quantidade de indivíduos próximos não visitados. Ainda, marcaremos 60 flores em cada afluoramento (n=10 flores/indivíduo; sendo três indivíduos com distribuição na porção Norte e outros três na porção Sul do afluoramento) e contaminaremos as anteras desses indivíduos com tintura em pó fluorescente (material análogo ao pólen; Diniz *et al.*, 2019) de cores diferentes entre os indivíduos e afluoramentos para ser carregado por polinizadores ao longo da antese. Esta abordagem nos ajudará a identificar, de maneira qualitativa, os padrões de dispersão de pólen dentro e entre afluoramentos.

A abordagem indireta será realizada através da análise dos dados moleculares coletados (ver *Variabilidade e estruturação genética dentro e entre afloramentos*). Realizaremos a análise de paternidade através do programa CERVUS 3 (Kalinowski *et al.*, 2007). As análises terão como base os genótipos das matrizes, de suas progênes e demais indivíduos adultos reprodutivos da população (candidatos a doadores de pólen). Definiremos os parâmetros do programa com base no conjunto de dados. Nas simulações de paternidade utilizaremos 10.000 repetições e os níveis de confiança restrito de 99% e relaxado de 95%, para determinar o doador de pólen.

Por fim, utilizaremos métricas de análise de paisagem (ver metodologia em *Análise da paisagem*), conciliando com marcadores moleculares, os quais serão definidos posteriormente, ao longo do desenvolvimento deste capítulo.

### **Metodologia que contempla o Capítulo 3**

#### *Densidade de indivíduos e biologia floral*

Caracterizaremos a densidade de indivíduos floridos para todas as espécies de acordo com a metodologia descrita em *Densidade dos indivíduos e tipo de vegetação em que ocorrem*. Coletaremos dados como a quantidade de indivíduos floridos, quantidade de flores/indivíduo e flores total durante o período de floração. Ainda, obteremos dados de biologia floral como tempo de antese das flores de ambas as espécies e quantidade de óvulos por flor.

#### *Tratamentos de polinizações controladas*

Para investigar o efeito da distância no sucesso reprodutivo de ambas as espécies, delimitaremos diferentes afloramentos rochosos (mínimo de quatro afloramentos) onde ocorram *P. hatschbachii* e *P. quartelaensis*, e que apresentem diferentes distâncias entre si. Enquanto para *C. armatum* e *M. sellowiana* estabeleceremos classes de distâncias entre indivíduos de acordo com o censo populacional de ambas as espécies. Selecionaremos  $n$  indivíduos de cada espécie em cada afloramento ou classe de distância, sendo  $n$  o número de indivíduos floridos disponíveis, para aplicarmos os seguintes tratamentos de polinização controlada: autopolinização manual (0 m); polinização com doador de pólen no mesmo afloramento ou mesma classe de distância; polinização com doador de pólen do afloramento mais próximo ou classe de distância mais próxima; polinização com distância intermediária ou classe de distância intermediária; polinização com doador de pólen do afloramento mais distante ou classe de distância distante; e, polinização controle, onde as flores dos indivíduos selecionados serão marcadas e estarão sujeitas às condições naturais de polinização. Para

definir o sucesso reprodutivo de cada tratamento, avaliaremos a proporção de frutos e sementes formadas.

Para avaliar se a proporção de frutos formados (variáveis-resposta) ajustaremos um modelo linear generalizado, assumindo uma distribuição binomial (fruto formado ou não), usando a identidade das plantas como fator aleatório. Para a quantidade de sementes formadas em resposta ao tratamento, utilizaremos um modelo linear. Nossas análises serão realizadas no ambiente *R*, onde poderemos utilizar os pacotes *vegan* (Oksanen *et al.*, 2013), *car* (Fox & Weisberg, 2011), *lme4* (Bates *et al.*, 2015) e *nlme* (Pinheiro *et al.*, 2016). Sempre que necessário, aplicaremos testes *post-hoc* (teste de Tukey, assumindo  $\alpha < 0,005$ ) com correções de Bonferroni utilizando o pacote *glht* no *R* (Hothorn *et al.*, 2016).

## CUSTOS DO PROJETO E CRONOGRAMA

**Tabela 1.** Previsão orçamentária para o desenvolvimento do presente projeto.

Elemento de Despesa	Valor Específico (R\$)	Valor Geral (R\$)
Combustível e Pedágios	300,00	3000,00
Materiais	200,00	2000,00
<b>TOTAL</b>	<b>500,00</b>	<b>5000,00</b>

Nota: Valor específico referente a uma expedição a campo.

Etapas	Ano 1		Ano 2		Ano 3		Ano 4	
	Sem. 1	Sem. 2	Sem. 3	Sem. 4	Sem. 5	Sem. 6	Sem. 7	Sem. 8
<b>Levantamento Bibliográfico</b>								
<b>Realização de Disciplinas</b>								
<b>Coleta de dados em Campo</b>								
<b>Atividades em Laboratório</b>								
<b>Análise dos Dados</b>								
<b>Escrita da Tese</b>								
<b>Defesa da Tese</b>								

## REFERÊNCIAS

- BALKENHOL, N.; CUSHMAN, S.; STORFER, A.; WAITS, L. **Landscape genetics: concepts, methods, applications**. John Wiley & Sons, Nova Jérsei. 2016.
- BARTOŃ, K. **MuMIn: Multi-model inference**. R package version 0.12. 2/r18. 2009.
- BATES, D.; MAECHLER, M.; BOLKER, B.; WALKER, S. **Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4**. Journal of Statistical Software, v. 67, p. 1-48. 2015.
- BAWA, K. S. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. **Annual review of Ecology and Systematics**, p. 399-422. 1990.
- BAWA, K. S. Pollination, seed dispersal and diversification of angiosperms. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 10, p. 311–312. 1995.
- BEHLING, H. Late Quaternary vegetation, climate and fire history of the *Araucaria* forest and campos region from Serra Campos Gerais, Paraná State (South Brazil). **Review of palaeobotany and palynology**, v. 97, p. 109-121. 1997.
- BRITO, V. L., *et al.* Reproductive phenology of Melastomataceae species with contrasting reproductive systems: contemporary and historical drivers. **Plant Biology**, v. 19, p.806-817. 2017.
- BUCHMANN, S. L. Buzz pollination in angiosperms. In: Jones, C. E. & Little R. J. (Eds.) **Handbook of experimental pollination biology**. Van Nostrand, New York. p. 73-113. 1983.
- BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. **Model Selection and Multimodel Inference**. Springer, Berlim. 2002.
- CARAMARI, P. H. Climatologia. In: **Plano de manejo Parque Estadual de Vila Velha**. Curitiba: IAP - Instituto Ambiental do Paraná, SEMA - Secretaria do Estado e do Meio Ambiente e Recursos Hídricos, p.136-174, 2004.
- CARMO, M. R. B. D.; ASSIS, M. A. D. Caracterização florística e estrutural das florestas naturalmente fragmentadas no Parque Estadual do Guartelá, município de Tibagi, estado do Paraná. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, p. 133-145. 2012.
- CONGEDO, L. Semi-automatic classification plugin documentation. **Release**, 4, 29. 2016.
- CRUZAN, M. B.; HENDRICKSON, E. C. Landscape Genetics of Plants—Challenges and Opportunities. **Plant communications**, 100100. 2020.
- DINIZ, U. M.; LIMA, S. A.; MACHADO, I. C. Short-distance pollen dispersal by bats in an urban setting: monitoring the movement of a vertebrate pollinator through fluorescent dyes. **Urban Ecosystems**, v. 22, p. 281-291. 2019.
- ELZINGA, J. A.; ATLAN, A.; BIERE, A.; GIGORD, L.; WEIS, A. E.; BERNASCONI, G. Time after time: flowering phenology and biotic interactions. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, p. 432-439. 2007.
- FARIA, C. A.; ROMERO, R.; LEONI, L. Flora fanerogâmica do Parque Nacional do Caparaó: Melastomataceae. *Pabstia*, v. 17, p. 1–31. 2006.

- FOX, J.; WEISBERG, S. **Functions and datasets to accompany. An R companion to applied regression.** 2 ed. Thousand Oaks: Sage. 2011.
- GHAZOUL, J. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. **Biological Reviews**, v. 80, p. 413–443. 2005.
- GOLDENBERG, R. O gênero *Miconia* (Melastomataceae) no estado do Paraná. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 927-947. 2004.
- GOULSON, D. Foraging strategies of insects for gathering nectar and pollen, and implications for plant ecology and evolution. **Perspectives in plant ecology, evolution and systematics**, v. 2, p. 185-209. 1999.
- GUILLOT, G.; MORTIER, F.; ESTOUP, A. GENELAND: a computer package for landscape genetics. **Molecular ecology notes**, v. 5, p. 712-715. 2005.
- HANOTEAUX, S.; TIELBÖRGER, K.; SEIFAN, M. Effects of spatial patterns on the pollination success of a less attractive species. **Oikos**, v. 122, p. 867-880. 2013.
- HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 618–620. 2002.
- HESELBARTH, M. H.; SCIAINI, M.; WITH, K. A.; WIEGAND, K.; NOWOSAD, J. landscapemetrics: an open-source R tool to calculate landscape metrics. **Ecography**, v. 42, p. 1648-1657. 2019.
- HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P.; HEIBERGER, R. M.; SCHUETZENMEISTER, A. & SCHEIBE, S. **Package multcomp: simultaneous inference in general parametric models.** R package version 3.2.5. 2016. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/multcomp/multcomp.pdf>> Acessado em: 15 set. 18
- JÜRGENS, A.; BOSCH, S. R.; WEBBER, A. C.; WITT, T.; FRAME, D.; GOTTSBERGER, G.. Pollination biology of *Eulophia alta* (Orchidaceae) in Amazonia: effects of pollinator composition on reproductive success in different populations. **Annals of Botany**, v. 104, p. 897-912. 2009.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1099–1106. 2007.
- KAMVAR, Z. N.; TABIMA, J. F.; GRÜNWARD, N. J. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. **PeerJ**, v. 2, e281. 2014.
- KEENAN, K.; MCGINNITY, P.; CROSS, T. F.; CROZIER, W. W.; PRODÖHL, P. A. diveRsity: An R package for the estimation of population genetics parameters and their associated errors. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 4, p. 782-788. 2013.
- LABIAK, P. H. E. Aspectos fitogeográficos do Paraná. In: Kaehler *et al.* (Eds.), **Plantas Vasculares do Paraná**, Curitiba: Departamento de Botânica/UFPR, Paraná, Brasil, p. 7–22. 2014.
- LOISELLE, B. A.; SORK, V. L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v. 82, p. 1420–1425. 1995.
- LOUSADA, J. M.; BORBA, E. L.; RIBEIRO, K. T.; RIBEIRO, L. C.; LOVATO, M. B. Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. **Genetica**, v.139, p. 431-440. 2011.

- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 15, p. 65–95. 1984.
- MAACK, R. **Geografia Física do Estado do Paraná**. Imprensa Oficial, Curitiba, 3ª edição. 2002.
- MAIA, F. R.; GOLDENBERG, R. Melastomataceae from the “Parque Estadual do Guartelá”, Tibagi, Paraná, Brazil: species list and field guide. **Check List**, v. 10, p. 1316–1323. 2014.
- MAIA, F. R.; VARASSIN, I. G.; GOLDENBERG, R. Apomixis does not affect visitation to flowers of Melastomataceae, but pollen sterility does. **Plant Biology**, v. 18, p. 132-138. 2016.
- MAIA, F. R.; SUJII, P. S.; GOLDENBERG, R.; DA SILVA-PEREIRA, V.; ZUCCHI, M. I. Development and characterization of microsatellite markers for *Tibouchina hatschbachii* (Melastomataceae), an endemic and habitat-restricted shrub from Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 38, p. 327-332. 2016a.
- MAIA, F. R. **O efeito do tempo e espaço na evolução de um táxon restrito aos campos subtropicais da América do Sul**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo. 2017.
- MAIA, F. R.; SUJII, P. S.; SILVA-PEREIRA, V.; GOLDENBERG, R. Naturally fragmented and isolated distribution in subtropical grassland patches affects genetic diversity and structure at different spatial scales: the case of *Tibouchina hatschbachii*, an endemic shrub from Brazil. **American Journal of Botany**, v. 104, p. 1867-1877. 2017a.
- MAIA, F. R.; ZWIENER, V. P.; MOROKAWA, R.; SILVA-PEREIRA, V.; GOLDENBERG, R. Phylogeography and ecological niche modelling uncover the evolutionary history of *Tibouchina hatschbachii* (Melastomataceae), a taxon restricted to the subtropical grasslands of South America. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 183, p. 616-632. 2017b.
- MAIA, F. R.; TELLES, F. J.; GOLDENBERG, R. Time and space affect reproductive biology and phenology in *Tibouchina hatschbachii* (Melastomataceae), an endemic shrub from subtropical grasslands of southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 20, p. 1-15. 2018.
- MAIA, F. R.; GOLDENBERG, R. Morphometric analysis and the distinction between *Tibouchina hatschbachii* and *T. marumbiensis*: morphological differentiation driven from the past. **Plant Systematics and Evolution**, v. 3015, p. 169-180. 2019.
- MCCAULEY, D. E. The relative contributions of seed and pollen movement to the local genetic structure of *Silene alba*. **Journal of Heredity**, v. 88, p. 257–263. 1997.
- MEYER, F. S.; GUIMARÃES, P. J. F.; GOLDENBERG, R. Uma nova espécie de *Tibouchina* Aubl. (Melastomataceae) e notas taxonômicas sobre o gênero no Estado do Paraná, Brasil. **Hoehnea**, v. 36, p. 139-147. 2009.
- MICHELANGELI, F. A.; ALMEDA, F.; GOLDENBERG, R.; PENNEYS, D. A Guide to Curating New World Melastomataceae Collections with a Linear Generic Sequence to World-Wide Melastomataceae. **Preprints**, 2020100203. 2020.
- MONTEIRO, W. P.; VEIGA, J. C.; SILVA, A. R.; CARVALHO, C.; LANES, E.; RICO, Y.; JAFFÉ, R. Everything you always wanted to know about gene flow in tropical landscapes (but were afraid to ask). **PeerJ**, v. 7, e6446. 2019.
- MOREIRA, E. F.; BOSCOLO, D.; VIANA, B. F. Spatial heterogeneity regulates plant-pollinator networks across multiple landscape scales. **PloS one**, v. 10, e0123628. 2015.

MORI, S. A.; SILVA, L. A. M.; LISBOA, G.; CORADIN, L. **Manual de manejo do herbário fanerogâmico**. 2 ed. Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus. 1989. 97p.

MORO, R. S.; CARMO, M. R. B. A vegetação campestre nos campos gerais. In: MELO, M. S.; MORO, R. S.; GUIMARÃES, G. B. (Eds.) **Patrimônio natural dos Campos Gerais do Paraná**. UEPG, Ponta Grossa, p. 93–98. 2007.

OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P. R.; O'HARA R. B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H.; WAGNER, H. **vegan: Community Ecology Package**. R package version 2.0-10. 2013. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=vegan>>

OLIVEIRA, P. E.; MARUYAMA, P. K. Sistemas reprodutivos. In: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. (Org.) **Biologia da Polinização**. Projeto Cultural; Rio de Janeiro, Brasil, p. 71-92. 2014.

PINHEIRO, J.; BATES, D.; DEBROY, S.; SARKAR, D. **nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models**. R package version 3.2.5., p. 1-128. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html>> Acessado em 15 set. 2018

PRITCHARD, J.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945–959. 2000.

REGAL, P. J. Ecology and evolution of flowering plant dominance. **Science**, v. 196, p. 622-629. 1977.

PAQUETTE, S. R. **PopGenKit: Useful functions for (batch) file conversion and data resampling in microsatellite datasets**. R package version 1.0. 2012.

QGIS Development Team. **QGIS Geographic Information System v3.16 Hannover**. Open-Source Geospatial Foundation Project. 2020. Disponível: <<http://qgis.osgeo.org/>>

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020. Disponível: <<https://www.R-project.org/>>

RATHCKE, B. J. Nectar distribution, pollinator behavior and plant reproductive success. In: HUNTER, M. D.; OHGUSHI, T.; PRICE, P. W. (Eds.) **Effects of resource distribution on animal-plant interactions**. Academic Press, Nova Iorque, p. 113-138. 1992.

ROMERO, R.; MARTINS, A. B. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 25, p. 19–24. 2002.

SANTOS, A. P. M.; FRACASSO, C. M.; LUCIENE DOS SANTOS, M.; ROMERO, R.; SAZIMA, M.; OLIVEIRA, P. E. Reproductive biology and species geographical distribution in the Melastomataceae: a survey based on New World taxa. **Annals of Botany**, v. 110, p. 667-679. 2012.

SHIRK, A. J.; WALLIN, D. O.; CUSHMAN, S. A.; RICE, C. G.; WARHEIT, K. I. Inferring landscape effects on gene flow: a new model selection framework. **Molecular ecology**, v. 19, p. 3603-3619. 2010.

SILVA, A. R. A vegetação rupestre dos campos gerais paranaense. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Curitiba, Paraná. 2018.

SILVA, D. N.; KOSCHNITZKE, C.; JESUS, J. C.; GUIMARÃES, P. J. F. **Chaetostoma in Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB9438>>. Acesso em: 01 abr. 2021

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A.; ALMEIDA, E. A. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. 2002.

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

SORK, V. L.; NASON, J.; CAMPBELL, D. R.; FERNANDEZ, J. F. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, p. 219–224. 1999.

UHLMANN, A. Análise fitossociológica de três categorias fitofisionômicas no Parque Estadual do Cerrado - Jaguariaíva/PR. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1995.

UHLMANN, A.; CURCIO, G. R.; GALVÃO, F.; SILVA, S. M. Relações entre a distribuição de categorias fitofisionômicas e padrões geomórficos e pedológicos em uma área de savana (cerrado) no Estado do Paraná. Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 4, p. 473–484. 1997.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 921–935. 2004.

VELOSO, H. P.; RANGEL-FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro, IBGE. 1991.

VITTOZ, P.; ENGLER, R. Seed dispersal distances: a typology based on dispersal modes and plant traits. **Botanica Helvetica**, v. 117, p. 109–124. 2007.

ZAMBON, V.; AGOSTINI, K.; NEPI, M.; ROSSI, M. L.; MARTINELLI, A. P.; SAZIMA, M. Nectar as manipulator: how nectar traits influence changes in pollinator groups of *Aechmea vanhoutteana*, a bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 192, p. 803–815. 2020.

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

WILLSON, M. F. Dispersal mode, seed shadows, and colonization patterns. **Vegetatio**, v. 107, p. 261–280. 1993.

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

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

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, p. 395–420. 1965.

ZELLER, K. A.; MCGARIGAL, K.; WHITELEY, A. R. Estimating landscape resistance to movement: a review. **Landscape ecology**, v. 27, p. 777–797. 2012.