

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

Genômica de Populações e Conservação: Investigando a Evolução do Complexo *Poidium*  
*calotheca* e Espécies Relacionadas (Poaceae)

Doutoranda: Taciane Schröder Jorge

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Aimberê Dorneles Welker

Coorientadora: Profa. Dra. Tatiana Teixeira de Souza Chies

Uberlândia  
2025

Taciane Schröder Jorge

Genômica de Populações e Conservação: Investigando a Evolução do Complexo *Poidium calothea* e Espécies Relacionadas (Poaceae)

Projeto de pesquisa apresentado como parte dos requerimentos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do título de Doutora em Biologia Vegetal.

Uberlândia

2025

Genômica de Populações e Conservação: Investigando a Evolução do Complexo *Poidium calothea* e Espécies Relacionadas (Poaceae)

**Resumo:** Poaceae compreende aproximadamente 11.783 espécies e 789 gêneros de distribuição cosmopolita, ocorrendo em uma grande variedade de habitats e sendo a principal componente das formações campestres. *Poidium* é composto por dez táxons sul-americanos, dos quais sete são endêmicos dos campos de altitude do sul e sudeste do Brasil, estabelecendo-se como o gênero contendo o maior número de espécies da subtribo Calothecinae. Estudos filogenéticos recentes envolvendo o gênero evidenciaram a presença de complexos de espécies, onde amostras distintas dessas espécies não se agruparam. A identificação do complexo *Poidium calothea* é dificultada pela variação morfológica e sobreposição de caracteres. Além disso, as árvores filogenéticas derivadas de sequências plastidiais e nucleares separadas demonstraram variação significativa na posição das espécies dentro do complexo. Nesse caso, a discrepância entre as árvores geradas a partir de marcadores nucleares e plastidiais pode indicar fluxo gênico intra e interespecífico no âmbito destas espécies. O complexo *Poidium calothea* abrange cinco táxons: *Poidium ambiguum*, *Poidium calothea*, *Poidium juergensii* var. *angustilemma*, *Poidium juergensii* var. *juergensii* e *Poidium serranum*, com *Poidium latifolium* e *Poidium uniolae* sendo as duas principais espécies relacionadas ao grupo. O presente trabalho terá como objetivo utilizar a genômica de populações com foco no complexo *Poidium calothea* e espécies relacionadas para investigar a história evolutiva do grupo e assim contribuir na delimitação, conservação e manejo das espécies envolvidas. Para isso serão realizadas expedições para amostragem das populações e coleta de informações sobre o habitat e número de indivíduos. A extração de DNA total será realizada a partir de metodologia convencional e o sequenciamento será realizado em empresas terceirizadas. Os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) serão obtidos através do sequenciamento de nova geração (ddRAD-Seq) com clivagem de DNA por enzimas de restrição. As espécies serão avaliadas quanto ao seu estado de conservação, seguindo os critérios da IUCN, e experimentos para avaliar o potencial germinativo também serão realizados. Espera-se que os resultados avancem no esclarecimento das relações filogenéticas entre as espécies do complexo e aprofundem a compreensão da diversidade genética das populações analisadas. As avaliações do estado de conservação deverão oferecer um panorama sobre o grau de ameaça de cada espécie, possibilitando sua inclusão, quando necessário, na lista vermelha de espécies ameaçadas, facilitando ações de proteção mais eficazes. Os experimentos de germinação deverão revelar como a temperatura influencia o processo germinativo, permitindo o desenvolvimento de um protocolo para futuras ações de propagação e conservação. Ao final, o projeto visa promover a delimitação das espécies do complexo e apoiar estratégias de conservação e manejo eficazes para as espécies, considerando aspectos genéticos, ecológicos e reprodutivos.

**Palavras-chave:** Calothecinae, Complexo de espécies, Endemismo, Filogenômica, Germinação.

## 1. Introdução

O Brasil se destaca como um dos países mais biodiversos do mundo, abrigando uma flora abundante e sendo reconhecido como o local onde mais se descobrem novas espécies de plantas (Giulietti *et al.*, 2005; Cheek *et al.*, 2020). Estimativas apontam que 15% ou mais das espécies ainda aguardam serem descobertas (Joppa *et al.*, 2013). Entretanto, estudos apontam que duas a cada cinco espécies de plantas correm risco de extinção, principalmente devido às ações antrópicas (Antonelli *et al.*, 2020).

Diante dos desafios impostos pela perda de biodiversidade, os avanços em genômica têm se destacado como uma ferramenta fundamental para a conservação das espécies e a restauração ecológica (Supple & Shapiro, 2018; Fomenti *et al.*, 2022; Hogg *et al.*, 2022; Kress *et al.*, 2022). O acesso ao conteúdo genômico das plantas também possibilita a identificação de genes para o melhoramento de cultivares e de compostos com potencial farmacêutico (Cardinale *et al.*, 2012). Atualmente, tanto os dados genéticos quanto os genômicos podem ser utilizados para estimar a diversidade genética, a estrutura populacional e a história demográfica (Supple & Shapiro, 2018). No entanto, os dados em escala genômica oferecem estimativas mais precisas desses parâmetros devido à maior cobertura do genoma, o que pode influenciar diretamente as recomendações de conservação (Allendorf *et al.*, 2010; Shafer *et al.*, 2015; Supple & Shapiro, 2018). Ao analisar sequências de DNA de diferentes indivíduos ou populações, é possível identificar SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), que representam o tipo mais abundante de polimorfismo no genoma (Allendorf *et al.*, 2022). Sua ampla distribuição ao longo de todo o genoma os torna especialmente úteis em estudos genômicos (Morin *et al.*, 2004). Haplótipos, por sua vez, são definidos como um conjunto de SNPs que, por conta de sua proximidade entre si, tendem a ser herdados em conjunto (Jehan & Lakhanpaul, 2006).

Abordagens de genômica de populações utilizando sequenciamento de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*) apresentam um potencial significativo para esclarecer padrões filogeográficos e relações filogenéticas em complexos de espécies, especialmente aqueles que permanecem inacessíveis quando se utiliza um número limitado de marcadores genéticos (Jeffries *et al.*, 2016; Anderson *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018). Ademais, a partir dos dados genômicos é possível obter informações altamente relevantes sobre a variabilidade genética das populações, fundamentais para compreender sua diversidade e, consequentemente, fatores decisivos para determinação do risco de extinção (Schmidt *et al.*, 2023). Além disso, informações sobre as espécies e sua situação atual de conservação são

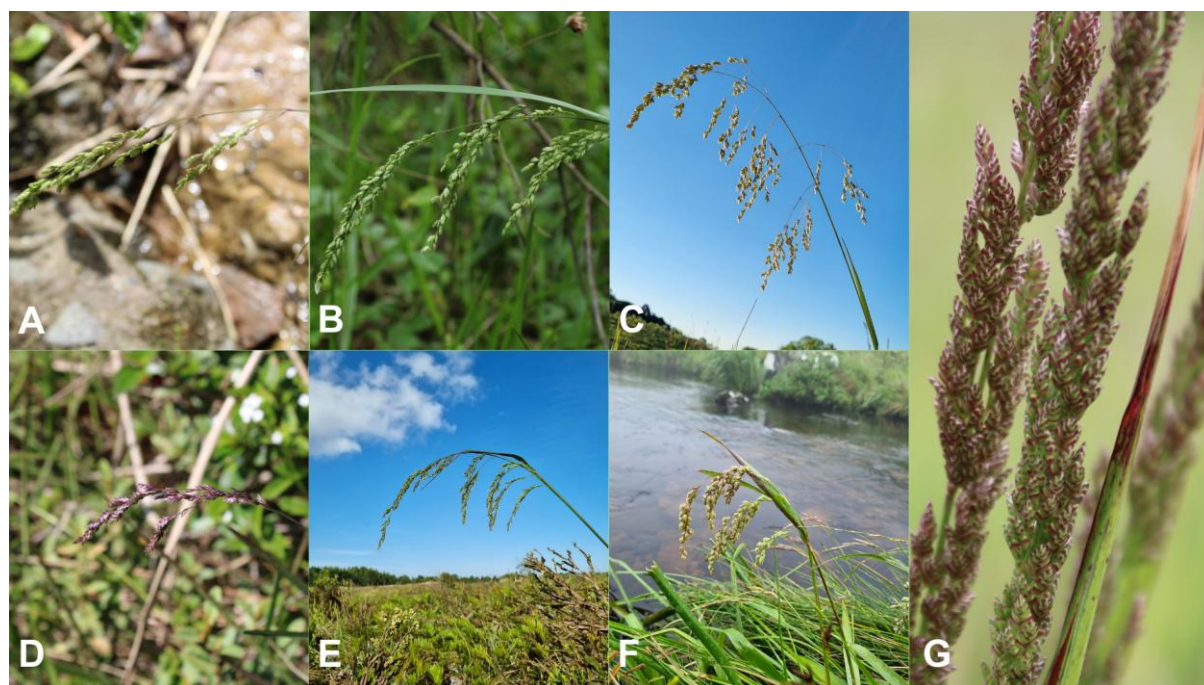
indispensáveis para ações de conservação eficazes (Le Breton, 2019). O estudo de estado de conservação através da utilização de parâmetros e critérios estabelecidos pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) desempenham uma função essencial na orientação dos esforços de preservação (Rodrigues *et al.*, 2006). A integração de dados sobre diversidade e estrutura genética, fluxo gênico, viabilidade populacional, principais ameaças, distribuição geográfica e tamanho populacional permite a formulação de estratégias de manejo e conservação mais eficazes para garantir a sobrevivência das espécies a longo prazo.

Além disso, a germinação das sementes é um dos aspectos biológicos que influenciam diretamente a sobrevivência e regeneração das populações ao longo do tempo. A germinação e os estágios iniciais das plântulas são eventos cruciais no ciclo de vida das plantas, desempenhando um papel essencial na dinâmica populacional (Bakhshandeh *et al.*, 2013). Esses estágios influenciam diretamente a aptidão individual, a persistência das populações e a capacidade das espécies de se dispersarem e se estabelecerem em diferentes habitats (Seglias & DePrenger-Levin, 2024). A massa da semente (Moles & Westoby, 2004), a dispersão (Howe & Smallwood, 1982) e a dormência (Venable & Brown, 1988) são algumas das características que suportam a capacidade de uma plântula emergir, crescer e se estabelecer. Walck *et al.* (2011) evidenciaram em seu estudo que as mudanças climáticas podem impactar a regeneração de plantas a partir das sementes alterando as temperaturas e disponibilidade de água, que são fatores essenciais para a quebra de dormência e germinação, impactando mais severamente nos estágios iniciais do ciclo de vida das plantas (Hedhly *et al.*, 2009).

A família Poaceae compreende aproximadamente 11.783 espécies e 789 gêneros de distribuição cosmopolita, ocorrendo em uma grande variedade de habitats e sendo a principal componente das formações campestres (Soreng *et al.*, 2022). Sua importância ecológica é dada por sua dominância em diversos ambientes terrestres e pelo efetivo papel nos ciclos do nitrogênio e carbono, por exemplo, e econômica, pela sua utilização na alimentação humana e animal, no artesanato, na medicina popular, na produção de óleos, perfumes e como ornamentais (Mistura *et al.*, 2015; Davis & Soreng, 2007; Judd *et al.*, 2009). Segundo o Flora e Funga do Brasil (2025), a família é representada no Brasil por 236 gêneros e 1.565 espécies, sendo mais predominante em biomas campestres como Pantanal, Caatinga e Pampa (BFG, 2015).

*Poidium* Nees é um gênero composto por dez táxons sul-americanos, distribuídos pela Argentina, Brasil, Colômbia, Paraguai e Uruguai. No Brasil, ocorrem todas as espécies, com destaque para os campos de altitude das regiões Sul e Sudeste, onde são encontradas em simpatria e sete delas são endêmicas dessas formações. Em altitudes mais baixas, as espécies

ocorrem principalmente em ambientes campestres, geralmente associados a banhados (Da Silva *et al.*, 2021). Estudos recentes envolvendo o gênero evidenciaram a presença de complexos de espécies, onde amostras distintas dessas espécies não se agruparam filogeneticamente (Da Silva *et al.*, 2021). O grupo denominado de complexo *Poidium calotheca* é composto por cinco táxons morfológicamente semelhantes que ocorrem em simpatria nos campos de altitude do sul e sudeste do Brasil: *P. ambiguum* (Hack.) Matthei, *P. calotheca* (Trin.) Matthei, *P. juergensii* var. *angustilemma* (Essi, Souza-Chies & Longhi-Wagner) L.N.Silva, *P. juergensii* var. *juergensii* (Hack.) Matthei e *P. serranum* (L.N.Silva) L.N.Silva. O complexo abrange cinco táxons, com *P. latifolium* (Essi, Souza-Chies & Longhi-Wagner) L.N.Silva e *P. uniolae* (Nees) Matthei sendo as duas principais espécies relacionadas ao grupo (Figura 1).



**Figura 1.** Representantes do complexo *Poidium calotheca* (A-E) e espécies relacionadas (F-G) em seus habitats naturais. A - *Poidium ambiguum*, B - *Poidium juergensii* var. *angustilemma*, C - *Poidium calotheca*, D - *Poidium serranum*, E - *Poidium juergensii* var. *juergensii*, F - *Poidium latifolium*, G - *Poidium uniolae*.

O estudo, portanto, abrange dois eixos principais: genômica de populações e conservação. No âmbito da genômica populacional, busca-se responder: quais os níveis de diversidade genética interespecífica e intraespecífica? Como as populações estão estruturadas geneticamente e geograficamente, e que processos históricos podem ter influenciado essa estrutura? Há fluxo gênico entre as espécies do grupo? Quais regiões geográficas apresentam maior diversidade genética? Os SNPs podem auxiliar na delimitação dos táxons do complexo



*Poidium calothea*? Existe um maior compartilhamento de haplótipos entre populações de uma mesma região? No aspecto de conservação, o projeto visa responder às perguntas: Quais espécies estão ameaçadas e quais são suas principais ameaças? Há diferenças no potencial germinativo entre populações de diferentes regiões geográficas? Quais fatores podem estar influenciando a taxa de germinação?

## 2. Justificativa

Estudos filogenéticos recentes sobre a subtribo Calothecinae trouxeram avanços significativos na compreensão das relações de parentesco e na circunscrição do grupo (Da Silva *et al.*, 2021). Além disso, foram realizados estudos voltados à compreensão da evolução do grupo na América do Sul, com ênfase em investigações biogeográficas e análises de diversificação (Schröder *et al.*, submetido). Essas abordagens forneceram uma compreensão mais abrangente da história evolutiva do gênero *Poidium* ao longo do tempo. No entanto, apesar desses progressos, ainda há lacunas no conhecimento sobre a diversidade genética do grupo, além da falta de resolução envolvendo o complexo de espécies. O estudo de Da Silva *et al.* (2021) revelou variação na posição das espécies dentro do complexo, com diferenças significativas entre os táxons nas árvores filogenéticas derivadas de sequências plastidiais e nucleares. Nesse caso, a discrepância entre as árvores geradas a partir de marcadores nucleares e plastidiais pode indicar fluxo gênico intra e interespecífico entre as espécies. Curiosamente, alguns indivíduos da mesma espécie que não se agruparam são provenientes de diferentes regiões geográficas, sugerindo uma possível variação genética com base na localização geográfica do táxon. Nesse sentido, estudos de genética de populações e filogeográficos permitem investigar o fluxo gênico e entender os mecanismos por trás da divergência entre populações que desenharam a atual estrutura genética e distribuição dos organismos (Avisé, 2009).

Nas metas da Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) estabelecidas para 2030, a Meta 4 destaca a importância de manter e restaurar a diversidade genética. Essa necessidade está alinhada com as sugestões para a integração da genômica na conservação de plantas, descrito por Schneider (2023), que ressalta a importância na geração de dados genômicos para espécies ameaçadas, seja em nível regional ou global. O autor também enfatiza a importância da obtenção de genomas de referência para espécies-chave que habitam ecossistemas ameaçados ou em transformação. Esses dados são essenciais tanto para aprofundar o conhecimento sobre a evolução das plantas e dos ambientes quanto para subsidiar estratégias de reintrodução e manejo. Entretanto, para que essas ações sejam efetivas, é fundamental

primeiro conhecer a diversidade genética das espécies. Assim, estudos que visem a obtenção de dados genômicos para espécies ameaçadas ou endêmicas se tornam essenciais para resguardar as informações genéticas das espécies, podendo subsidiar futuras ações de restauração, conservação e até na identificação de genes de importância econômica.

Entre as espécies foco do projeto, apenas *Poidium latifolium* está classificada quanto ao seu estado de conservação, sendo considerada Vulnerável, segundo a lista de espécies ameaçadas do Rio Grande do Sul (Rio Grande do Sul, 2014). A espécie mais recentemente descrita, *Poidium serranum*, foi classificada pelos autores como Em Perigo segundo os critérios da IUCN (Da Silva *et al.*, 2020), entretanto, a espécie ainda não consta em nenhuma lista oficial de espécies ameaçadas. A espécie é conhecida apenas em duas localidades, no município de Cambará do Sul (RS) e São Francisco de Paula (RS). Exceto as populações que se encontram dentro do Parque Nacional da Serra Geral, as demais ocorrem em áreas altamente vulneráveis, sujeitas a ameaças diretas, como o pastejo intensivo e a expansão de monoculturas.

Com isso, em primeiro lugar, é fundamental investigar a diversidade genética dessas espécies, uma vez que esse conhecimento permite identificar áreas e populações prioritárias para a conservação *in situ*. Além disso, os dados genômicos poderão resolver questões da sistemática do grupo, revelando as relações de parentesco entre os táxons, possibilitando uma melhor circunscrição dos táxons em estudo. Em segundo lugar, é necessária uma avaliação formal do estado de conservação dessas espécies, com base nos critérios da IUCN, a fim de determinar seu real grau de ameaça e possibilitar sua inclusão, quando necessário, em listas oficiais de espécies ameaçadas, incluindo a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN. Em terceiro lugar, destaca-se a importância da conservação *ex situ*, por meio do armazenamento de germoplasma em coleções especializadas. Conforme recomendações do *Center for Plant Conservation* (CPC), esse processo deve ser acompanhado de testes iniciais de germinação e viabilidade, além do desenvolvimento de protocolos de cultivo. Conjuntamente, é necessário compreender como o aumento da temperatura influencia a germinação das espécies foco, gerando informações fundamentais para o planejamento de estratégias de conservação e para a elaboração de protocolos eficazes de germinação e cultivo, dados ainda inexistentes para as espécies abordadas neste estudo.

### 3. Objetivos

O objetivo deste trabalho é investigar o complexo *Poidium calotheca* e espécies relacionadas ao longo de sua distribuição, com o propósito de compreender sua diversidade genética, sistemática, estado de conservação e potencial germinativo, a fim de subsidiar ações



embasadas em delimitação e conservação. Para isso, serão utilizados dados genômicos para explorar a variabilidade genética, integrados à avaliação do estado de conservação. Os experimentos de germinação visam desenvolver um protocolo específico para as espécies, avaliar os impactos do aumento da temperatura na germinação e contribuir com estratégias de propagação.

### Objetivo geral

- Investigar a história evolutiva do complexo *Poidium calothea* e espécies relacionadas com intuito de contribuir para a delimitação taxonômica, conservação e manejo das espécies.

### Objetivos específicos

- Estimar a diversidade genética e estrutura populacional, bem como a história demográfica das linhagens do complexo *Poidium calothea* e espécies relacionadas;
- Investigar a presença de fluxo gênico entre as populações das espécies do complexo *Poidium calothea* e espécies relacionadas;
- Identificar centros de diversidade genética e centros prioritários para conservação das espécies ao longo da sua distribuição geográfica;
- Estimar a variabilidade genética para os táxons do complexo *Poidium calothea* e espécies relacionadas utilizando SNPs em escala genômica;
- Contribuir para a delimitação das espécies do complexo *Poidium calothea*;
- Investigar a variação filogeográfica em populações do complexo *Poidium calothea*;
- Avaliar o estado de conservação, seguindo os critérios da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), para espécies do complexo *Poidium calothea* e espécies relacionadas;
- Avaliar o potencial germinativo de sementes de diferentes populações das espécies do complexo *Poidium calothea* e espécies relacionadas.

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Coleta de material botânico

Serão realizadas expedições de coleta durante a primavera de 2025 e 2026, visando a coleta de folhas jovens de indivíduos adultos localizados em sítios de coleta ao longo da distribuição geográfica dos táxons. Serão amostrados, sempre que possível, de cinco a oito indivíduos por sítio de coleta, abrangendo um total de 38 populações previstas. As amostras

coletadas serão preservadas em sílica gel para a realização das extrações de DNA total. Além disso, durante as expedições, será realizada a coleta de sementes e a obtenção de informações sobre o habitat, populações e ameaças para a conservação *in situ*. Alguns dos principais pontos estratégicos para a coleta de material botânico incluem a região central do Rio Grande do Sul, os campos de altitude do Paraná (Palmas, Guarapuava e Tibagi), de Santa Catarina (Urubici), de São Paulo (Queluz, Campos do Jordão e Serra da Bocaina), do Rio de Janeiro (Serra do Itatiaia e Serra dos Órgãos) e de Minas Gerais (Alto Caparaó e Itamonte). Durante as excursões de campo, os materiais serão coletados utilizando técnicas usuais de herborização seguindo os procedimentos descritos no Manual Técnico da Vegetação Brasileira (IBGE, 2012). Todos os materiais coletados serão incorporados ao Herbarium Uberlandense (HUFU) e duplicatas enviadas a outros herbários como o Herbário ICN, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e o Herbário RB, do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Vale destacar que 16 populações das espécies foco do estudo já foram amostradas na região Sul. No entanto, ainda restam poucas populações a serem coletadas nessa região e, principalmente, na região Sudeste.

#### 4.2 Extração e quantificação do DNA genômico

A extração do DNA total (DNA genômico) será realizada a partir de folhas secas armazenadas em sílica gel utilizando o método CTAB (Doyle & Doyle, 1987) adaptado para microcentrifuga. A concentração de DNA será quantificada com o fluorômetro Qubit e a qualidade do DNA será avaliada com o espectrofotômetro Nanodrop DN-1000 e eletroforese em gel de agarose a 1%. Amostras com proporções 260/280 e 260/230 maiores que 1,8 serão consideradas como indicativas de DNA de alta qualidade. A qualidade das amostras para a construção das bibliotecas genômicas será avaliada por meio de uma reação com enzima de restrição. As amostras também serão ajustadas para uma concentração entre 50 e 100 ng/μl, em um volume mínimo de 10 a 20 μl, faixa ideal para a aplicação da metodologia DArTseq.

#### 4.3 Preparo das bibliotecas genômicas, sequenciamento e filtragem dos SNPS

Para a obtenção dos marcadores moleculares do tipo SNP em escala genômica, será utilizada a abordagem de redução da complexidade genômica mediada por enzimas de restrição, seguida de sequenciamento de nova geração (DArTseq). As amostras de DNA genômico serão enviadas à empresa Diversity Arrays Technology Pty Ltd., localizada em Canberra, Austrália (<https://www.diversityarrays.com/>), responsável pela genotipagem. O sequenciamento será realizado em uma única *lane*, em modo *single-end sequencing*, utilizando o equipamento Illumina HiSeq 2500 (*High Density Sequencing*).

Os arquivos gerados pela empresa (formato *fastq.gz*) serão processados com ferramentas de bioinformática. Inicialmente, será realizado o demultiplex, associando cada *read* à sua respectiva amostra individual, seguida pela remoção dos *barcodes* e adaptadores das sequências. As *reads* serão então alinhadas, e as variantes do tipo SNP serão identificadas. O arquivo resultante contendo apenas essas variantes, no formato (.vcf), será utilizado nas análises genômicas posteriores.

#### 4.4 Análises genômicas

Os seguintes parâmetros de diversidade genética serão estimados: diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), riqueza alélica (AR), riqueza alélica privada (PAR) e coeficiente de endogamia (Fis), utilizando os programas Arlequin (Excoffier & Lischer, 2010), ADZE (Szpiech *et al.*, 2008) e o pacote Hierfstat (Goudet, 2005) no ambiente R (R Core Team, 2023), com interface RStudio Desktop (RStudio Team, 2023). O programa Arlequin também será utilizado para estimar a diferenciação entre as populações, por meio do índice de fixação ( $F_{ST}$ ), com 10.000 permutações para testar a significância estatística ( $P < 0,05$ ). Além disso, será empregada a Análise da Variância Molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) neste mesmo programa.

Para estimar o padrão de estrutura populacional e a ancestralidade genética individual, serão aplicados os seguintes métodos: (1) DAPC (*Discriminant Analysis of Principal Components*; Jombart *et al.*, 2010), por meio da qual a função “*find.clusters*” será utilizada para determinar o número ótimo de agrupamentos com score BIC (*Bayesian Information Criterion*), e a função “*optim.a.score*” será empregada para identificar o número ideal de componentes principais (PCs) que melhor explicam a variabilidade genética; (2) FASTSTRUCTURE (Raj *et al.*, 2014) utiliza um algoritmo bayesiano para inferir grupos de indivíduos em equilíbrio de Hardy-Weinberg e de ligação. Para esta análise, o número de grupos ( $K$ ) será testado com base no número de populações amostradas acrescido de dois (populações + 2), e a função “*chooseK*” será usada para identificar o valor ótimo de clusters; (3) ADMIXTURE (Alexander *et al.*, 2009), que adota uma abordagem de máxima verossimilhança para estimar a ancestralidade individual, atribuindo cada indivíduo ao cluster correspondente ao maior valor de  $Q$  na matriz de coeficientes de ancestralidade.

Análises de Bottleneck (gargalos populacionais) também serão realizadas utilizando o software Fastsimcoal (Excoffier, 2021), com o objetivo de investigar possíveis reduções recentes no tamanho efetivo das populações. Além disso, será implementada a abordagem de ABC (*Approximate Bayesian Computation*), por meio do software DIYABC (Cornuet *et al.*, 2014), para testar modelos demográficos alternativos e identificar aquele que melhor se ajusta

aos dados genômicos obtidos. As sequências geradas serão organizadas no software Geneious Prime 2025.1 e, posteriormente, depositadas no repositório do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

#### **4.5 Avaliação do estado de conservação**

Os dados de distribuição geográfica das espécies serão obtidos a partir de plataformas online como o *speciesLink* (2025) e o GBIF (2025). Com base nas coordenadas obtidas, serão calculadas a Extensão de Ocorrência (EOO) e a Área de Ocupação (AOO), utilizando a ferramenta GeoCAT (2025). Além disso, o número de indivíduos das populações encontradas será contabilizado e os riscos ambientais serão avaliados. Os resultados obtidos serão analisados de acordo com os critérios da IUCN (2025) e as espécies serão classificadas em uma das categorias de ameaça da IUCN.

#### **4.6 Testes de germinação e viabilidade das sementes**

Após a coleta das sementes durante as expedições de campo, as sementes serão secas em folha de jornal para secagem em condições ambientais durante sete dias. Os experimentos para avaliar o potencial germinativo das sementes serão conduzidos em uma câmara de germinação. Para avaliar os efeitos da temperatura na germinação das sementes, serão testadas quatro temperaturas constantes (15, 20, 25, 30 °C). A quebra de dormência será realizada por meio de estratificação a frio por sete dias a 4°C. As sementes serão dispostas em placas de Petri forradas com papel filtro e umedecidas com 2 mL de água destilada por placa. O experimento será monitorado a cada 24 horas ao longo de 45 dias, utilizando a emergência da radícula e a curvatura geotrópica como critério de germinação (Labouriau, 1983). Para calcular o tempo médio de germinação será utilizado a fórmula de Ranal & Santana (2006). Após cada experimento as cariopses não germinadas serão testadas quanto à viabilidade, imergindo-as em uma solução de cloreto de tetrazólio a 1% p/v, seguindo o método de Peters (2000).

#### **4.7 Preservação do germoplasma para conservação *in situ* e *ex situ***

Após os testes de germinação, as plantas germinadas serão transferidas para vasos com substrato e vermiculita para serem mantidas e acompanhadas em seu crescimento até a maturidade. Com isso, esperamos testar condições de exposição de fotoperíodo e temperatura, além de suplementos para que um protocolo de propagação possa ser adquirido. Além disso, a partir das informações dos testes de germinação e viabilidade juntamente com as informações de diversidade genética obtidas dos dados genômicos, será possível determinar as melhores populações para envio de material aos bancos de sementes para conservação a longo prazo. Da mesma maneira, mudas serão enviadas a Jardins Botânicos. Assim, será possível preservar a

variabilidade genética das espécies e garantir que no futuro ações de reintrodução sejam possíveis.

## 5. Resultados esperados

Espera-se que, ao término do projeto, sejam alcançados os seguintes resultados:

I) Dados genômicos: A geração de dados em escala genômica permitirá uma compreensão mais robusta e detalhada da diversidade genética e dinâmica populacional das sete espécies de *Poidium* analisadas neste estudo. Esses dados possibilitarão investigar de forma aprofundada a variação genética ao longo da distribuição geográfica das espécies no Brasil. Além disso, os dados obtidos permitirão uma delimitação filogenética mais precisa dos táxons do complexo *Poidium calothea*. A delimitação adequada das espécies não é apenas essencial para o avanço do conhecimento sobre a biodiversidade, mas também representa um passo crucial para o desenvolvimento de estratégias de conservação mais eficazes e direcionadas.

II) Avaliação do estado de conservação: Espera-se realizar, para cada uma das espécies estudadas, uma avaliação de seu estado de conservação, com a definição de sua respectiva categoria de ameaça, conforme os critérios da IUCN. Quando necessário, será realizada a inclusão de espécies na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas de Extinção da IUCN. Esses resultados poderão subsidiar a implementação de medidas efetivas de proteção *in situ*, contribuindo para a conservação das espécies em seus habitats naturais.

III) Protocolo de germinação: A partir dos testes de germinação e viabilidade das sementes, espera-se obter dados sobre o potencial germinativo e viabilidade das sementes, incluindo a taxa de germinação, o tempo médio de germinação e a resposta a diferentes regimes de temperatura. Esses dados permitirão identificar as condições de temperatura ideais para a germinação e avaliar o grau de dormência das sementes. E assim, proporcionar a elaboração de um protocolo de germinação das espécies alvo do estudo.

IV) Banco de germoplasma: O projeto resultará na criação de um banco para conservação da diversidade genética do complexo *Poidium calothea* e espécies relacionadas. Essa iniciativa será estratégica tanto para a preservação do patrimônio genético dessas espécies quanto para subsidiar futuras ações de reintrodução e manejo.

Os resultados obtidos neste projeto contribuirão de forma significativa para a conservação do complexo *Poidium calothea* e espécies relacionadas, com ênfase na preservação de sua variabilidade genética. O banco de germoplasma, aliado ao protocolo de

germinação desenvolvido, será um recurso valioso para ações de conservação *ex situ* e para o planejamento de futuras reintroduções das espécies em seus habitats naturais.

## 6. Cronograma

	Ano/semestre								
Atividades	2025		2026		2027		2028		2029
	1º	2º	1º	2º	1º	2º	1º	2º	1º
Revisão de literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Realização de disciplinas e proficiência de língua estrangeira	X	X							
Coleta de material botânico		X	X	X					
Extração de DNA total			X	X					
Envio das amostras para elaboração das bibliotecas genômicas e sequenciamento					X				
Análises de bioinformática					X	X	X	X	
Avaliação do estado de conservação					X	X			
Testes de germinação e viabilidade					X	X	X		
Preservação do germoplasma para conservação <i>in situ</i> e <i>ex situ</i>						X	X	X	
Redação dos manuscritos						X	X	X	X
Redação e defesa da tese						X	X	X	X



### 7. Orçamento

Para a realização deste projeto, será necessário garantir financiamento, especialmente para o sequenciamento genômico. Para isso, a candidata irá submeter propostas a editais de financiamento, incluindo o *Neotropical Grasslands Conservancy*, a *International Association for Plant Taxonomy* (IAPT), *LinnéSys: Systematics Research Fund* e o FUNBIO, entre outros. Recursos de dois projetos Universal da FAPEMIG, já aprovados pelo orientador, também serão utilizados para cobrir as despesas deste projeto.

Despesa	Quantidade	Valor
Diárias para expedição de campo	25	R\$8.000
Reagentes para extração de DNA	-	R\$1.000
Preparo de bibliotecas genômicas e sequenciamento	2 placas	R\$37.000
Papel para germinação de sementes	1 pacote	R\$168
Placas de petri	50	R\$775
Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazolio	1	R\$277
Assinatura do <i>Software Geneious</i>	3 (anos de assinatura)	R\$ 3.336
<b>Total</b>		<b>R\$ 50.556</b>

### Referências

Anderson, B. M. *et al.* Genotyping-by-sequencing in a species complex of Australian hummock grasses (*Triodia*): methodological insights and phylogenetic resolution. **PloS One**, v. 12, n. 1, p. e0171053, 2017.

Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A., & Luikart, G. Genomics and the future of conservation genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 10, 697-709, 2010.

Allendorf, F. W. *et al.* Conservation and the Genomics of Populations, 3º ed. (Oxford, 2022; online edn, Oxford Academic, 21 Apr. 2022). Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oso/9780198856566.001.0001> (acessado: 5 de ago. de 2025).

Alexander, D. H.; Novembre, J.; Lange, K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. **Genome Research**, v. 19, n. 9, p. 1655-1664, 2009.

Antonelli, A. *et al.* **State of the World’s Plants and Fungi 2020**. Royal Botanic Gardens, Kew, 2020.

Avise, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3-15, 2009.

Bakhshandeh, E. *et al.* Quantification of the response of germination rate to temperature in sesame (*Sesamum indicum*). **Seed Science and Technology**, v. 41, n.3, 469-473, 2013.

- BFG (The Brazil Flora Group) Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.
- Cardinale, B. J.; *et al.* Biodiversity loss and its impact on humanity. **Nature**, v. 486, n. 7401, p. 59-67, 2012.
- Cheek, M. *et al.* New scientific discoveries: Plants and fungi. **Plants, People, Planet**. v. 2, p. 371-388, 2020.
- Cornuet, J. M. *et al.* DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 8, p. 1187-1189, 2014.
- Davis, J. I., & Soreng, R. J. (2007). A preliminary phylogenetic analysis of the grass subfamily Pooideae (Poaceae), with attention to structural features of the plastid and nuclear genomes, including an intron loss in GBSSI. **Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany**, v. 23, n. 1, p. 335-348
- Da Silva, L. N. *et al.* *Chascolytrum serranum* (Poaceae: Pooideae: Poeae: Calothecinae), a new microendemic species from Campos de Cima da Serra, southern Brazil. **Phytotaxa**, v. 435, n. 1, p. 41-49, 2020.
- Da Silva, L. N.; Saarela, J. M.; Souza-Chies, T. T. A comprehensive species sampling sheds light on the molecular phylogenetics of Calothecinae (Poaceae, Pooideae, Poeae): Evidence for a new subtribe and multiple genera within the *Chascolytrum* clade. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 60, n. 3, p. 691-712, 2021.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phyt. Bull.** v. 19, p. 11-15, 1987.
- Excoffier, L.; Lischer, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.
- Excoffier, L.; Smouse, P. E.; Quattro, J.M. 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, L.; Marchi, N.; Sousa, V. C. fastsimcoal ver 2.7 fsc27. 2021.
- Flora e Funga do Brasil. Poaceae In: **Flora e Funga do Brasil**, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2025. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB193>.
- Fomenti, G. *et al.* The era of reference genomes in conservation genomics. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 37, n. 3, p. 197-202, 2022.
- GBIF (Global Biodiversity Information Facility) (2025). GBIF Home Page. Disponível em: <https://www.gbif.org/pt/> (acessado: 14 jul. 2025).
- GeoCAT (Geospatial Conservation Assessment Tool) (2025). GeoCAT Home Page. Disponível em: <http://geocat.kew.org/> (acessado: 14 jul. 2025).
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Manual Técnico da Vegetação Brasileira. Manuais Técnicos em Geociências**. 1.ed. Rio de Janeiro. 2012. 275 p.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature) (2025). Banco de dados online: Red List of threatened species. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/> (acessado: 14 jul. 2025).
- Giulietti, A. M. *et al.* Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, n.1, 2005.
- Goudet, J. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 184-186, 2005.
- Hedhly, A.; Hormaza, J.I.; Herrero, M. Global warming and sexual plant reproduction. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 30-36, 2009.

- Hogg, C. J. *et al.* Threatened Species Initiative: Empowering conservation action using genomic resources. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 4, e2115643118, 2022.
- Howe, H. F., & Smallwood, J. Ecology of seed dispersal. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 13, p. 201-228, 1982.
- Jeffries, D. L. *et al.* Comparing RAD seq and microsatellites to infer complex phylogeographic patterns, an empirical perspective in the *Crucian carp*, *Carassius carassius*, L. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 13, p. 2997-3018, 2016.
- Judd, W. S. *et al.* **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. Artmed Editora, 2009.
- Kress, W. J. *et al.* Green plant genomes: What we know in an era of rapidly expanding opportunities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 4, e2115640118, 2022.
- Labouriau, L. G. A germinação das sementes. **General Secretariat of the Organization of American States**, Washington, D.C., USA, 1938.
- Le Breton, T. D. *et al.* Using IUCN criteria to perform rapid assessments of at-risk taxa. **Biodiversity and Conservation**, 28, 863-883, 2019.
- Jehan, T., & Lakhanpaul, S. Single nucleotide polymorphism (SNP)-methods and applications in plant genetics: a review. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 435, 2006.
- Joppa, L. N. *et al.* Achieving the convention on biological diversity's goals for plant conservation. **Science**, v. 341, p. 1100-1103, 2013.
- Mistura, C. C. *et al.* Cores e formas do Bioma Pampa: gramíneas ornamentais nativas. 1ª edição. Pelotas RS: Editora Embrapa Clima Temperado, 2015.
- Moles, A.T.; Westoby, M. Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature. **Journal of Ecology**, v. 92, p. 372-383, 2004.
- Morin, P. A. *et al.* SNPs in ecology, evolution and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, n. 19, p. 208-216, 2004.
- Raj, A., Stephens, M., & Pritchard, J. K. fastSTRUCTURE: variational inference of population structure in large SNP data sets. **Genetics**, v. 197, n. 2, p. 573-589, 2014.
- Ranal, M. A., & Santana, D. G. D. How and why to measure the germination process?. **Brazilian Journal of Botany**, v. 29, p. 1-11, 2006.
- Rio Grande Do Sul. Decreto Estadual nº 52.109, 1 de dezembro de 2014. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul. Diário Oficial, Porto Alegre, 2 de dezembro de 2014, p 1-34.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2023. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.
- RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA, 2023. Disponível em: <https://www.rstudio.com/>
- Schneider, H. Integrating genomics and conservation to safeguard plant diversity. **Integrative Conservation**, v. 2, n. 1, p. 10-18, 2023.
- SpeciesLink. (2025). *speciesLink* network. Disponível em: <https://specieslink.net/search/> (acessado: 14 jul. 2025).
- Rodrigues, A. S. *et al.* The value of the IUCN Red List for conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, n. 2, p. 71-76, 2006.
- Seglias, A. E.; DePrenger-Levin, M. Can alpine species take the heat? Impacts of increased temperatures on early life stages. **Seed Science Research**, p. 1-5, 2024.
- Shafer, A. B. *et al.* Genomics and the challenging translation into conservation practice. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 30, n. 2, p. 78-87, 2015.
- Schmidt, C. *et al.* Genetic diversity and IUCN Red List status. **Conservation Biology**, v. 37, n. 4, e14064, 2023.

- Soreng, R. J. *et al.* A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) III: An update. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 60, n. 3, p. 476-521, 2022.
- Szpiech, Z. A.; Jakobsson, M.; Rosenberg, N. A. ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. **Bioinformatics**, v. 24, n. 21, p. 2498-2504, 2008.
- Supple, M. A.; Shapiro, B. Conservation of biodiversity in the genomics era. **Genome Biology**, v. 19, p. 1-12, 2018.
- Peters, J.; Lanham, B. Tetrazolium testing handbook: contribution no. 29 to the handbook on seed testing. Lincoln, NE: **Association of Official Seed Analysts**, 151-154, 2000.
- Walck, J. L. *et al.* (2011) Climate change and plant regeneration from seed. **Global Change Biology**, v. 17, p. 2145–2161, 2011.
- Venable, D. L.; Brown, J. S. The selective interactions of dispersal, dormancy, and seed size as adaptations for reducing risk in variable environments. **The American Naturalist**, v. 131, p. 360–384, 1988.
- Zhou, W. *et al.* Resolving relationships and phylogeographic history of the *Nyssa sylvatica* complex using data from RAD-seq and species distribution modeling. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 126, n. 1-16, 2018.