

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Gabriela Goebel

Sistemática molecular do complexo *Miconia cinerascens* Miq. (Melastomataceae)

Florianópolis

2021

Gabriela Goebel

Sistemática molecular do complexo *Miconia cinerascens* Miq. (Melastomataceae)

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^a. Mayara Krasinski Caddah

Coorientador: Me. Eduardo Koerich Nery

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Goebel, Gabriela
Sistemática molecular do complexo *Miconia cinerascens*
Miq. (Melastomataceae) / Gabriela Goebel ; orientadora,
Mayara Krasinski Caddah, coorientadora, Eduardo Koerich
Nery, 2021.
55 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2021.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Espécie. 3. ISSR. 4. Mata
Atlântica. I. Krasinski Caddah, Mayara . II. Koerich Nery,
Eduardo . III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Gabriela Goebel

Sistemática molecular do complexo *Miconia cinerascens* Miq. (Melastomataceae)

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Licenciada em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 14 de maio de 2021.

Prof. Carlos Roberto Zanetti, Dr.

Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof^a Mayara Krasinski Caddah, Dr^a

Orientadora - UFSC

Duane Fernandes Lima, Dr^a

Avaliadora - UFSC

Eduardo Koerich Nery, Me.

Coorientador – UFABC

Luciana Pereira-Silva, Me.

Avaliadora - UFSC

Este trabalho é dedicado ao meu pai Charles, por todo amor e confiança depositados em mim, obrigada por tudo, por todo sempre.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha orientadora Mayara pela oportunidade de realizar esse trabalho, por me apresentar o mundo vasto e incrível da botânica e de Miconia, pela confiança depositada, pelo empenho em fazer esse trabalho acontecer, pela amizade e por acreditar em mim. É incalculável o tanto que aprendi contigo. Obrigada por cada reunião, cada saída de campo e cada conversa que me inspirou a fazer esse trabalho, te admiro e sou grata imensamente.

Também agradeço a toda minha família, em especial ao meu pai Charles, em memória, que possibilitou meus estudos e meu percurso até aqui, minha estadia em Florianópolis e na UFSC e sem ele esse trabalho também não poderia ter sido realizado. Sempre imaginei que ele veria esse momento importante chegar. Obrigada por acreditar em mim, pelos ensinamentos, pela parceria e pelo exemplo em tantas coisas. Tem muito de ti nesse trabalho, amo você eternamente. Também sou eternamente grata ao apoio e amor incondicional de minha mãe Zenilde, meu irmão Lucas e minha avó Ivone. Amo vocês. Quero também fazer uma menção especial a minha nona Ivone, por me inspirar desde a infância no universo das plantas, nas trilhas no meio do mato, me ensinar tanto sobre tudo e acreditar desde sempre em mim como bióloga e como botânica, você jogou a sementinha do amor à botânica em mim. Também quero agradecer ao meu parceiro Caio por todo amor, parceria e por tornar essa caminhada mais leve, por também acreditar em mim, não cansar de ouvir sobre Miconia cinerascens e aliviar minhas inseguranças, amo você. Por último nesse parágrafo, mas não menos importante, agradeço que nesse percurso tive a companhia de meus cachorros Baco e Diana (em memória), meu gato Missi, minhas calopsitas Ivy (em memória), Nico e Amy. Vocês tornam minha vida mais viva.

Sou eternamente grata ao meu amigo e coorientador Eduardo, por seus ensinamentos de laboratório, de biologia molecular, de estatística e de vida. Esse trabalho também não poderia ser feito sem você, obrigada pela parceria, pelas boas risadas e pela amizade, te admiro muito.

Também agradeço a todos meus amigos que estiveram presentes nesses anos na faculdade e na vida, pelas conversas, conselhos, risadas e por tornarem tudo mais fácil e feliz. Em especial agradeço aos amigos amados Gabriela, Guilherme, Gustavo, Leonardo, Letícia,

Mariana e Pamela, pelo suporte e companheirismo em todos os momentos. Um agradecimento muito especial à Pamela, minha companheira de botânica desde o primeiro dia e que incondicionalmente me apoiou em todos os momentos e dificuldades e que sem ela esse trabalho também não poderia ter sido feito. Sou muito grata por tua amizade. Mas também aos amigos que a botânica me trouxe, pelas conversas, conselhos, boas risadas, reuniões de meio dia, cafezinhos na copa do lab, procedimentos no lab de biomol, saídas de campo... Agradeço muito por tudo: Ana Flávia, Andrielle, Artur, Daniele, Fernando, Janaína, Kauana, Leonardo, Mariana, Rennan e Vivian.

Um agradecimento especial também a todos que auxiliaram nas saídas de campo que foram feitas ao longo desses anos para esse trabalho: Ana Flávia, Artur, Eduardo, Rodrigo e Pamela. Obrigada pela parceria.

Agradeço também às membras da banca, a Duane e a Luciana, que aceitaram de prontidão participar da defesa desse trabalho e que admiro muito. Muito obrigada por aceitarem o convite.

Também sou grata ao LAMEB, em especial ao técnico Willian, pela ajuda e disposição em todas as vezes que precisei. À Olga, que em 2018, quando estive utilizando o antigo laboratório de biologia molecular também sempre me auxiliou e ensinou práticas de biologia molecular. Um agradecimento também ao Herbário FLOR, que também sempre contribuiu com esse trabalho e com a preservação das amostras mencionadas nesse trabalho.

Um agradecimento também à Universidade Federal de Santa Catarina, pelo ensino público, gratuito e de qualidade, pela formação científica e cidadã. Quando entrei na faculdade não imaginei que aquele slogan da UFSC formar para vida faria tanto sentido hoje. Agradeço também a toda comunidade UFSC, aos técnicos, TAEs, terceirizados e professores. Meu muito obrigada!

Também agradeço às instituições de apoio à pesquisa, como o CNPq, que me contemplou com bolsa de iniciação científica em alguns dos anos de execução desse trabalho. O auxílio foi de extrema importância para execução das atividades e comprometimento com a pesquisa, obrigada!

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma auxiliaram na execução desse trabalho, assim como todos mencionados acima. Serei eternamente grata pelas vivências e por tudo,

vocês tornam minha vida mais significativa. À grandeza da aleatoriedade de eventos e pessoas que me trouxeram até aqui meu muito obrigada!

Se podes olhar, vê. Se poder ver, repara. (SARAMAGO, J., 1995)

RESUMO

Miconia cinerascens Miq. é considerado um complexo de espécies que envolve quatro entidades: *M. cinerascens* Miq. var. *cinerascens*, *M. cinerascens* var. *robusta* Wurdack, *M. lagunensis* Ule e *M. proteoides* A.St.-Hil. & Naudin, e está distribuído desde o Rio Grande do Sul até o Rio de Janeiro e Minas Gerais, alcançando também o Paraguai e a Argentina. As variedades aceitas em *M. cinerascens* possuem variações morfológicas distintas, bem como na distribuição, o que tem levado autores a considerar a hipótese de espécies distintas. Ademais, também pertencem ao complexo *Miconia lagunensis* e *Miconia proteoides*, que ocorrem em restinga em Santa Catarina e locais de altitude no Rio de Janeiro, respectivamente. Por possuírem características morfológicas intermediárias entre as variedades de *M. cinerascens*, autores têm sugerido a possibilidade de que elas sejam conspecíficas de uma e de outra variedade de *M. cinerascens*. A hipótese desse trabalho é que as quatro entidades pertencentes ao complexo *M. cinerascens* podem ser consideradas como quatro espécies distintas, dada a combinação única de caracteres morfológicos e de distribuição. O objetivo deste trabalho foi contribuir com uma melhor circunscrição taxonômica do complexo *Miconia cinerascens* por meio de uma abordagem molecular. Para isso, foram investigados marcadores moleculares do tipo ISSR e a região ETS do DNA nuclear a fim de testar hipóteses de delimitação de espécies, contrastando os dados genéticos com a morfologia e distribuição geográfica. No estudo, foi adotada a abordagem integrativa por congruência e considerou-se como espécie segmentos de linhagens de metapopulações evoluindo independentemente. Foram amostradas populações do complexo *M. cinerascens* em diferentes estados do Brasil, de modo a abranger sua distribuição no país. Extrações e amplificações de DNA dos indivíduos das populações citadas foram feitas com dois *primers* do tipo ISSR ((AC)₇RG e (CA)₈G), além de ETS. Os dados provenientes da genotipagem foram analisados com o *software* Structure e por análise de PCA. Os dados do sequenciamento do ETS geraram uma árvore filogenética que, de maneira geral, não teve sustentação estatística, sendo o monofiletismo do grupo inconclusivo. Nas duas análises populacionais, o melhor cenário de agrupamentos genéticos foi igual a 5. Ademais, parece haver um fator geográfico envolvido nos agrupamentos genéticos, que gera um padrão nos agrupamentos mais evidente que o delineamento pelas típicas diferenças morfológicas e da distribuição dos espécimes, como seria o esperado pela hipótese inicial. Assim, as análises de nosso trabalho não suportaram a hipótese da circunscrição de quatro

espécies no complexo, sendo que, nesse momento, a circunscrição mais adequada para o grupo é de que este seja constituído por uma única espécie de grande variabilidade morfológica, de acordo com o ambiente ocupado.

Palavras-chave: Espécie. ISSR. Mata Atlântica.

ABSTRACT

Miconia cinerascens Miq. is considered a species complex which involve four entities: *M. cinerascens* Miq. var. *cinerascens*, *M. cinerascens* var. *robusta* Wurdack, *Miconia lagunensis* Ule and *Miconia proteoides* A.St.-Hil. & Naudin, and is distributed from Rio Grande do Sul to Rio de Janeiro and Minas Gerais, also reaching Paraguay and Argentina. The accepted varieties of *M. cinerascens* have distinct morphological variations, as well as its distribution, which leads authors to consider distinct species hypothesis. In addition, *Miconia lagunensis* Ule and *Miconia proteoides* A.St.-Hil. & Naudin, that also belong to this complex, occur in restinga and Rio de Janeiro highlands, respectively. Because they have intermediate morphological characters among *M. cinerascens* varieties, authors have suggested the possibility that they are conspecific to one and the other variety of *M. cinerascens*. The hypothesis of this study is that the four entities of *M. cinerascens* complex should be considered as four distinct species, given the unique combination of morphological and distribution characters. The aim of this study was contribute to a better delimitation of the *Miconia cinerascens* complex by a molecular approach. For this, ISSR and nuclear ETS molecular markers were investigated in order to test species delimitation hypothesis, by contrasting genetic data with morphology and geographic distribution. In this study, integrative by congruence approach was adopted and as species we considered as independent evolving metapopulation lineage. Populations of *Miconia cinerascens* complex were sampled in different Brazilian states in order to cover its distribution. DNA extractions and amplifications of population individuals were made with ISSR ((AC)₇RG e (CA)₈G) and ETS primers. Data provided from genotyping were analyzed with STRUCTURE software and by PCA analysis. Sequence data generated a phylogenetic tree that, in general, did not have statistical support, being the group monofiletism inconclusive. In both population analyzes, the best genetic clusters scenario was with K equal to 5. Moreover, it seems to have a geographic factor involved in genetic clusters, which generates a pattern in genetic clusters that is more evident than the typical specimens outline by morphological and geographic distribution differences, as would be expected by the initial hypothesis. Thus, the analysis in this study did not support our initial circumscription hypothesis of four distinct species in the *M. cinerascens* complex and at this moment the most suitable circumscription to the group is

that it is constituted by a single species with huge morphological variability according to the occupied environment.

Keywords: Species. ISSR. Atlantic Forest.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa gerado pelo Google Earth (2021) ilustrando a localização geográfica dos municípios onde cada população foi amostrada. O ícone branco representa as populações de *M. cinerascens* var. *cinerascens*, o amarelo de *M. cinerascens* var. *robusta*, o vermelho de *M. proteoides* e o verde de *M. lagunensis*.25

Figura 2: Árvore filogenética gerada a partir do marcador ETS e análise com o RAxML. O retângulo em destaque representa as amostras que pertencem ao complexo *Miconia cinerascens*, sendo que as com asterisco foram sequenciados para este trabalho. Os pontos em preto representam clados com sustentação estatística.34

Figura 3: Gráfico gerado pelo Structure com o melhor cenário de K (K=3) utilizando o marcador ISSR “889”, para as amostras das populações do complexo *Miconia cinerascens*.35

Figura 4: Gráfico gerado pelo Structure com o melhor cenário de K (K=4) utilizando o marcador ISSR “Oligo 4”, para as amostras das populações do complexo *Miconia cinerascens*.36

Figura 5: Gráfico gerado pelo Structure com o melhor cenário de K (K=5), utilizando os marcadores ISSR "889" e "Oligo 4", para as amostras das populações do complexo *Miconia cinerascens*.37

Figura 6: Gráfico da ordenação por PCA com a correlação dos dados genéticos e de identificação taxonômica das populações. Em rosa, estão representados indivíduos de *M. cinerascens* var. *cinerascens*, em verde de *M. lagunensis* e em azul *M. cinerascens* var. *robusta*.40

Figura 7: Gráfico da ordenação por PCA com a correlação dos dados genéticos e de distribuição geográfica das populações. As populações estão representadas por diferentes símbolos, sendo as populações: “Antonio” = Mcc-Antônio Carlos, “Aparados” = Mcc-Cambará do S Sul, “Floripa” = MCr -Florianópolis, “Jardim” = Mcc-Silva Jardim, “Jordao” = Mcc-Campos do Jordão, “Laguna” = ML – Laguna, “Urubici” = Mcc-Urubici.41

Figura 8: Gráfico de k-means, que indica o melhor cenário de agrupamentos geneticamente estruturados na amostra, sendo igual a 5 grupos.42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Populações coletadas de cada táxon envolvido no complexo por localidade, com o código, voucher e n° de indivíduos associados a cada população.	24
Tabela 2: Mistura para reação de PCR com base no kit Top Taq Master Mix.	28
Tabela 3: Número de indivíduos do complexo <i>Miconia cinerascens</i> e número de loci genotipados para os marcadores ISSR.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

µl – Microlitro

BFG – Grupo da Flora do Brasil. Do inglês (Brazilian Flora Group)

BIC - Critério Informativo Bayesiano. Do inglês (Bayesian Informative Criterion)

CTAB – Brometo de Cetil-Trimetil Amônio

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeo trifosfato. Do inglês (Desoxynucleotide triphosphates).

EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético. Do inglês (Ethylenediamine tetraacetic acid).

ETS – Do inglês (External Transcribed Spacers)

g – Grama

ISSR – Do inglês (Inter Simple Sequence Repeat)

H₂O: Fórmula química da água.

LAMEB: Laboratório Multiusuário em Estudos de Biologia

mA – Miliampere

MCMC – Cadeias de Markov com amostragem de Monte Carlo. Do inglês (Markov Chain Monte Carlo)

ml – Mililitro

pb – Par de base

PCA – Análise de Componentes Principais

PCR: Reações em Cadeira da Polimerase

PEG - Polietileno Glicol

PR: Paraná

PVP: Polivinilpirrolidona

RJ: Rio de Janeiro

RS: Rio Grande do Sul

SC: Santa Catarina

SP: São Paulo

TBE: Tris/Borato/EDTA

TRIS: Tris (hidroximetil) aminometano

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

var: Variedade

v - Volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.2 OBJETIVOS.....	22
1.2.1 Objetivo geral.....	22
1.2.2 Objetivos específicos.....	22
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 AMOSTRAGEM.....	24
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA	26
2.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA	27
2.5 AMPLIFICAÇÃO DE DNA COM MARCADORES ISSR.....	28
2.6 GENOTIPAGEM	30
2.7 ANÁLISE DOS DADOS DA GENOTIPAGEM.....	31
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE A - MATERIAL SUPLEMENTAR	50

1 INTRODUÇÃO

A delimitação de organismos em espécies, um dos objetivos principais da Sistemática, passa por um impasse central na biologia evolutiva: a concepção do que é espécie (WIENS, 2007). Por existirem, atualmente, diversos conceitos alternativos de espécie, a delimitação de espécies é um tema de controvérsias e até mesmo dificulta medidas conservacionistas (ALEIXO, 2009). Contribui bastante para isto a natureza temporal contínua do processo de especiação, que em muitos casos dificulta ou mesmo impede a delimitação de unidades totalmente discretas classificadas como espécies, independentemente do critério adotado (ALEIXO, 2009; de QUEIROZ, 2005).

De acordo com de Queiroz (2005), apesar dos inúmeros conceitos tradicionais e alternativos de espécie, todos compartilham a visão de que espécies são segmentos de linhagens de metapopulações evoluindo independentemente (de QUEIROZ, 1998), sendo este considerado um conceito unificado de espécie, conhecido como o “Conceito Filético Geral de Espécie” (CFGE; ALEIXO, 2009). Sob a perspectiva do CFGE, espécies são consideradas como hipóteses que necessitam de teste (de QUEIROZ, 1998). Segundo de Queiroz (2005), os diferentes conceitos de espécie estariam, na verdade, considerando momentos distintos do processo de especiação em suas definições, evidenciando certas propriedades em detrimento de outras (de QUEIROZ, 2005). Sob o CFGE, essas propriedades, como por exemplo, isolamento reprodutivo, diferenciação morfológica e monofiletismo, são consideradas como linhas de evidência para sustentar uma hipótese de espécie, não sendo propriedades obrigatórias para um táxon ser considerado como tal, visto que o processo de especiação não é linear. Porém, para que uma hipótese seja mais fortemente sustentada, múltiplas linhas de evidências são necessárias (de QUEIROZ, 2005; de QUEIROZ, 2007).

Diante da problemática a respeito da delimitação de espécies, avanços científicos e tecnológicos possibilitaram o surgimento de metodologias de análise que permitem acessar informações sobre os organismos antes não percebidas diretamente (LONGO et al., 2005). A partir desses avanços tecnológicos e metodológicos, surge a taxonomia integrativa, proposta por Dayrat et al. (2005), e explorada por Padial et al. (2010) de forma a operacionalizar diferentes fontes de dados para testar hipóteses de delimitação de espécies. A proposta de Padial et al. (2010) busca integrar o CFGE com diferentes

interpretações de como essas diferentes fontes de dados podem servir de linhas de evidência para delimitação de espécies. Especificamente, na abordagem integrativa por congruência, propriedades taxonômicas concordantes constituem linhas de evidência para delimitar espécies, ou seja, a investigação de padrões concordantes entre diferentes propriedades, como de morfologia, distribuição geográfica, ecologia e dados genéticos, constitui uma evidência a favor da delimitação (PADIAL et al., 2010).

Tendo em vista a abordagem da taxonomia integrativa (PADIAL et al., 2010) e o uso de dados moleculares na investigação de circunscrições taxonômicas, os marcadores moleculares têm sido utilizados para inferência das relações evolutivas entre *taxa*. O marcador molecular nuclear ETS (*External Transcribed Spacers*) vem sendo utilizado nos últimos anos com espécies da tribo Miconieae por ser uma região bastante variável e informativa (REGINATO e MICHELANGELI, 2016; MEYER, 2016). Apresenta boa aplicabilidade na família Melastomataceae Juss. (MEYER, 2016), assim como no gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (CADDAH, 2013; MEIRELLES, 2015). No entanto, apesar do método de sequenciamento de DNA ter trazido grandes contribuições para sistemática filogenética, há casos em que esses métodos de inferência filogenética mostram-se insuficientes na resolução do relacionamento entre espécies intimamente relacionadas e com divergência recente, bem como entre *taxa* infraespecíficos (CRAWFORD e MORT, 2004). Dessa forma, o estudo da genética de populações tem sido considerado uma ferramenta importante que pode auxiliar na delimitação de espécies (KNOWLES e CARSTENS, 2007).

Entre as classes de marcadores moleculares disponíveis, os marcadores multilocus e dominantes ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*; ZIETKIEWICZ et al., 1994) podem ser utilizados na discriminação e caracterização molecular de indivíduos. São regiões genômicas de 100 a 3.000 pb, flanqueadas por sequências microssatélites (*SSR-Simple Sequence Repeats*), regiões com unidades repetitivas de pares de base, e amplificadas por meio de Reações em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizando *primers* de 16 a 20 pb que se ancoram nas sequências de microssatélites (FALEIRO, 2007; ZIETKIEWICZ et al., 1994). Assim, após os fragmentos de DNA serem amplificados, infere-se que os que possuem mesmo peso molecular são homólogos, podendo-se, dessa forma, inferir pela homologia de alelos o fluxo gênico entre os táxons (OLIVEIRA et al., 2006). Além disso, esses marcadores são muito úteis por possibilitarem a análise de altos níveis de polimorfismo (MASSENSINI, 2013). É possível então acessar, por meio

de comparações *fingerprints* de genótipos, ou seja, da “impressão digital genética” formada pela diferença nas sequências nucleotídicas dentro de populações, padrões de variação entre e dentro de espécies (PASSOS, 2007; BENZAQUEM, 2009).

Dessa forma, a partir da discriminação dos indivíduos do ponto de vista genotípico, com base nas frequências alélicas, é possível por meio de análises estatísticas acessar padrões genéticos em agrupamentos de indivíduos, detectar desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg, e padrões que caracterizam grupos, o que pode auxiliar na delimitação de espécies (WOLFE, 2005; HAUSDORF e HENNIG, 2010; CARSTENS et al., 2013). No trabalho de Roux et al. (2008), por exemplo, os marcadores ISSR foram utilizados para identificar se populações de *Miconia calvescens* DC., nas ilhas do Hawaii, diferem entre o Pacífico Norte e Sul. Em outro estudo, este com *Miconia prasina* (Sw.) DC., marcadores ISSR foram utilizados para investigar a diversidade genética e o fluxo gênico da espécie em locais remanescentes de Floresta Atlântica em Pernambuco (CRUZ, 2009). Apesar da aplicação da técnica ser mais difundida na investigação de variabilidade genética de plantas cultivadas de interesse agrônomo, há grande potencial de uso como ferramenta na delimitação de espécies, tendo em vista trabalhos como de Essi (2007), Passos (2007), Rodrigues (2010), Lima et al. (2015), Massensini (2013), Silva (2013) e Nery et al. (2020).

A família Melastomataceae Juss. está entre as maiores famílias de Angiospermas, com distribuição pantropical, sendo cerca de 70% das espécies encontradas no continente americano (CLAUSING e RENNER, 2001; MICHELANGELI et al., 2009). A família possui, atualmente, 177 gêneros e cerca de 5.750 espécies, com uma maior riqueza nos Neotrópicos, com 88 gêneros e cerca de 3.700 espécies (MICHELANGELI et al., 2020). No Brasil, é a quinta maior família de Angiospermas (BFG, 2015), com mais de 1.300 espécies, com os gêneros *Miconia* Ruiz & Pav. e *Tibouchina* Aubl. sendo os mais representativos e com alto grau de endemismo (BAUMGRATZ et al., 2010; GOLDENBERG et al., 2012).

Na flora brasileira, o gênero *Miconia* (*sensu stricto*, dada a recente sinonimização de gêneros de Miconieae em *Miconia*) é o mais diverso, com cerca de 270 espécies (Flora do Brasil 2020, 2021; MICHELANGELI et al. 2019) que ocorrem em diferentes domínios fitogeográficos, do nível do mar até matas nebulares de elevada altitude na Mata Atlântica, assim como no Cerrado, Amazônia, Caatinga e Pampas (BAUMGRATZ et al., 2010; BFG, 2015; BAUMGRATZ; GOLDENBERG, 2017).

Ademais, é um dos gêneros mais diversos na Mata Atlântica brasileira, com cerca de 100 espécies (GOLDENBERG e CADDDAH, 2015). Além disso, *Miconia* tem grande importância ecológica, sendo muitas espécies usadas como controles biológicos e na restauração de áreas degradadas, já que seus frutos são recursos alimentícios para pássaros e outros animais, que ajudam na sua dispersão e polinização, esta feita por abelhas, vespas e morcegos (RENNER, 1989; GOLDENBERG; SHEPARD, 1998).

Em diferentes locais do Domínio Mata Atlântica, encontra-se *Miconia cinerascens* Miq., considerado um complexo de espécies (CADDDAH, 2013). Fazem parte desse complexo quatro entidades: *Miconia cinerascens* var. *cinerascens*, *Miconia cinerascens* var. *robusta* Wurdack, *Miconia lagunensis* Ule e *Miconia proteoides* A.St.-Hil. & Naudin. No caso da espécie *Miconia cinerascens*, em que aceitam-se duas variedades, ambas apresentam variações morfológicas muito distintas, por exemplo, a cor das anteras (brancas em *Miconia cinerascens* var. *cinerascens*, e amarelas em *Miconia cinerascens* var. *robusta*), cor da face abaxial das folhas (branca em *Miconia cinerascens* var. *cinerascens*, e amarronzada em *Miconia cinerascens* var. *robusta*), além das folhas maiores e da presença de glândulas no conectivo das flores em *Miconia cinerascens* var. *robusta* (folhas menores e glândulas ausentes no conectivo das flores em *Miconia cinerascens* var. *cinerascens*). Além disso, a distribuição geográfica de ambas é muito distinta, com *Miconia cinerascens* var. *cinerascens* ocorrendo tipicamente em locais de altitude, junto com a Mata de Araucárias, enquanto *Miconia cinerascens* var. *robusta* ocorre em baixas altitudes e locais de Mata Atlântica *sensu stricto* (CADDDAH, 2013). Essas diferenças morfológicas e na distribuição geográfica levantam a hipótese de que as variedades poderiam ser reconhecidas como espécies distintas (GOLDENBERG, 2009). Também pertencente ao complexo, *Miconia lagunensis* é uma espécie endêmica da Mata Atlântica brasileira com uma combinação alternativa dos estados de caracteres das variedades de *Miconia cinerascens* (folhas pequenas, face abaxial das folhas amarronzada, e anteras brancas). É endêmica do estado de Santa Catarina, e foi descrita para uma área de restinga de Laguna, litoral de Santa Catarina, um ambiente distinto ao de *M. cinerascens*. Além desta população, Wurdack (1962) reconheceu apenas mais uma população em Porto União, uma área de Mata de Araucárias. Por sua vez, *Miconia proteoides* é uma espécie descrita para o Rio de Janeiro e apresenta outra combinação de estados dos caracteres e de ocorrência (folhas pequenas e estreitas, com face abaxial das folhas amarronzada e anteras

amarelas, que ocorre em ambientes de altitude da Mata Atlântica s.s. do Rio de Janeiro). Apesar de ter sido a primeira espécie descrita no complexo (o que lhe confere prioridade nomenclatural), é a espécie menos representada nas coleções de herbários (CADDAH 2013). Na revisão taxonômica do grupo, Caddah (2013) destaca a presença de indivíduos intermediários entre as entidades ao longo da distribuição do complexo, mas mantém as duas variedades de *M. cinerascens*, e sugere que *M. lagunensis* seja considerado um sinônimo da variedade *cinerascens*, e que *M. proteoides* seja considerado um sinônimo da variedade *robusta*, abordagem adotada também na Flora do Brasil (Goldenberg et al. 2020). No entanto, a autora ressalta que estudos biossistemáticos são necessários para uma circunscrição definitiva (CADDAH, 2013). Diante deste cenário, portanto, torna-se questionável e duvidosa a classificação taxonômica atual dos taxa envolvidos no complexo de *Miconia cinerascens*, devido à sobreposição de caracteres por vezes presente ao longo da distribuição do grupo, sendo necessário um estudo mais aprofundado para uma melhor delimitação entre o complexo (CADDAH, 2013).

Diante do exposto, para investigar os táxons envolvidos no complexo, a hipótese do trabalho foi estabelecida como os quatros táxons (*M. cinerascens* var. *cinerascens*, *M. cinerascens* var. *robusta*, *M. lagunensis* e *M. proteoides*) pertencentes ao complexo *M. cinerascens* sendo consideradas como linhagens independentes, segundo o CFGE (QUEIROZ, 1998), dada a combinação única de caracteres morfológicos e de distribuição que cada entidade possui.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O presente trabalho objetiva contribuir com uma abordagem molecular para o desenvolvimento de uma melhor circunscrição taxonômica do complexo *Miconia cinerascens*.

1.2.2 Objetivos específicos

- (1) Estimar o relacionamento entre diferentes populações do complexo por meio de análises filogenéticas utilizando o marcador molecular ETS;
- (2) Testar hipóteses de delimitação de espécie dentro do complexo utilizando dados genéticos gerados pelos marcadores moleculares do tipo ISSR;

(3) Avaliar a circunscrição atual dos *taxa* contrastando os resultados genéticos com a morfologia e distribuição geográfica das entidades do complexo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM

A amostragem baseou-se na busca e coleta de populações do complexo *Miconia cinerascens* visando abranger a extensão geográfica de cada *taxa* do complexo com base em Caddah (2013) e no SpeciesLink. Foram coletadas onze populações pertencentes ao complexo, sendo seis populações de *M. cinerascens* var. *cinerascens*, três de *M. cinerascens* var. *robusta*, uma de *M. lagunensis* e uma de *M. proteoides* (Tabela 1, Figura 1). Na Tabela 1 está exposto o *voucher* associado a cada população amostrada, bem como o código associado para designar cada população e o número de indivíduos coletados por população.

Tabela 1: Populações coletadas de cada táxon envolvido no complexo por localidade, com o código, voucher e nº de indivíduos associados a cada população.

Táxon	Código da população por localidade	<i>Voucher</i>	Nº de indivíduos
<i>M. cinerascens</i> var. <i>cinerascens</i>	MCc – Cambará do Sul	G. Goebel (29)	22
<i>M. cinerascens</i> var. <i>cinerascens</i>	MCc - Urubici	G. Goebel (334)	22
<i>M. cinerascens</i> var. <i>cinerascens</i>	MCc – Antônio Carlos	G. Goebel (23)	23
<i>M. cinerascens</i> var. <i>cinerascens</i>	MCc – Balsa Nova	G. Goebel (232)	21
<i>M. cinerascens</i> var. <i>cinerascens</i>	MCc – Campos do Jordão	G. Goebel (67)	20
<i>M. cinerascens</i> var. <i>cinerascens</i>	MCc – Silva Jardim	G. Goebel (332)	14
<i>M. cinerascens</i> var. <i>robusta</i>	MCr - Florianópolis	G. Goebel (21)	22
<i>M. cinerascens</i>	MCr - Antonina	G. Goebel (77)	22

<i>var. robusta</i>			
<i>M. cinerascens</i> <i>var. robusta</i>	MCr - Jacupiranga	G. Goebel (64)	21
<i>M. lagunensis</i>	ML - Laguna	G. Goebel (25)	21
<i>M. proteoides</i>	MP - Petrópolis	G. Goebel (333)	20

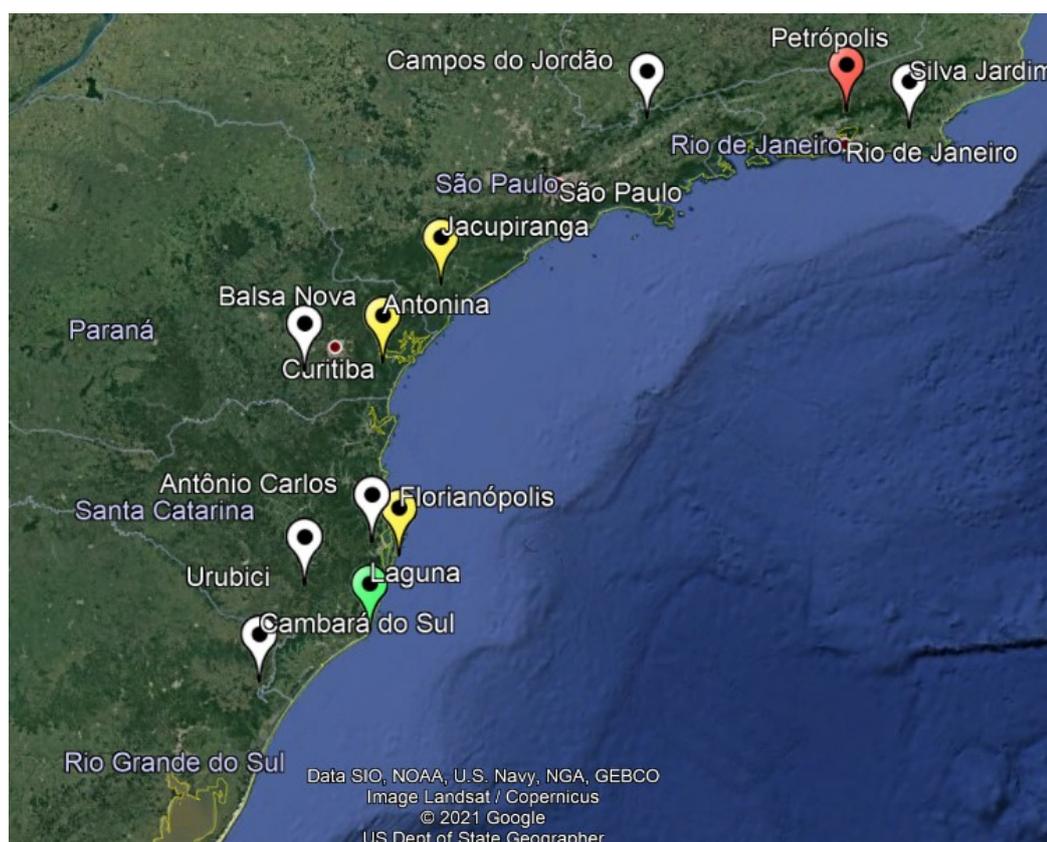


Figura 1: Mapa gerado pelo Google Earth (2021) ilustrando a localização geográfica dos municípios onde cada população foi amostrada. O ícone branco representa as populações de *M. cinerascens var. cinerascens*, o amarelo de *M. cinerascens var. robusta*, o vermelho de *M. proteoides* e o verde de *M. lagunensis*.

Foram amostrados até 23 indivíduos por população, exceto na população de Silva Jardim (RJ), na qual foram encontrados apenas 14 indivíduos. De cada indivíduo, coletou-se de uma a duas folhas jovens, sendo estas individualizadas em pequenos pacotes de plástico *ziplock* com sílica, de modo a desidratá-las. Posteriormente, este material foi armazenado sob refrigeração de -20°C . Material fértil de todas as populações também foi coletado para herborização de material testemunho e para incorporar à coleção do Herbário FLOR da UFSC. As amostras foram identificadas

primeiramente pela morfologia apresentada (segundo Caddah 2013), já que o hábitat nem sempre correspondeu à morfologia esperada.

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Os procedimentos de extração de DNA foram realizados no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), do Departamento de Botânica, na Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

A extração de DNA foi feita para todas as populações amostradas e teve como base o protocolo de extração de tecidos vegetais utilizando Brometo de Cetil-Trimetil Amônio (CTAB) de Doyle e Doyle (1987). Os componentes β -mercaptoetanol e PVP no tampão de extração não foram utilizados, visto que resultados prévios sem o uso dos mesmos foram satisfatórios.

Para certificar que as extrações de DNA tiveram sucesso, foi feito um gel de agarose após cada extração de DNA, utilizando TRIS/Brometo/EDTA (TBE) e pó de agarose (0,8%). Então, após o preparo e o posicionamento do gel em cuba de eletroforese foram adicionados Bluejuice/Red gel (corante) e DNA em cada poço formado. A corrente elétrica foi ajustada para 80v e 300mA por 30 minutos. Após esse tempo, o gel foi colocado em um transiluminador, sob luz ultravioleta, e então, o resultado (presença ou ausência de DNA) foi analisado e registrado por meio de fotos, como exemplificado na Figura 1 do material suplementar.

2.3 AMPLIFICAÇÃO DE DNA COM ETS, PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Para inferência das relações evolutivas entre indivíduos das populações amostradas, o marcador molecular nuclear ETS (*External Transcribed Spacers*) foi empregado. Após a extração de DNA, amostras de populações de *M. cinerascens*, *M. lagunensis* e *M. proteoides* foram escolhidas para amplificação de DNA. Foi escolhido um indivíduo de cada uma das populações amostradas. Porém, assim como com o marcador ISSR, nem todas as populações tiveram seus indivíduos amplificados e, nesse caso, sequenciados, tendo em vista a dificuldade de acesso aos laboratórios diante da pandemia de COVID-19. Sendo assim, para o presente trabalho, foram amplificadas e sequenciadas amostras de: MCr - Florianópolis, MCc - Urubici, MCc - Silva Jardim,

MCc - Campos do Jordão, MCr - Jacupiranga, MP - Petrópolis e MCr - Antonina, como ilustrado na Tabela 4, no material suplementar. Resultados satisfatórios da amplificação de DNA dessas amostras estão ilustrados na Figura 2 do material suplementar.

Cabe explicar que em alguns casos, por exemplo de *M. cinerascens* var. *cinerascens*, foram inclusas mais amostras do táxon nas análises porque foram amostradas mais populações do mesmo, dada a sua ampla distribuição, enquanto que *M. lagunensis* e *M. proteoides* tiveram menos amostras populacionais inclusas, já que a ocorrência dos espécimes é muito limitada, não se tendo o conhecimento de outras populações além das amostradas nesse trabalho.

As amostras foram amplificadas por meio de Reações em Cadeia de Polimerase (PCR) e a programação do ciclo de PCR em termociclador consistiu em 2 minutos iniciais de desnaturação a 94°C, seguidos de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, temperatura específica de anelamento de 55°C por 37-45 segundos, 72°C por 47-60 segundos e uma extensão final de 7 minutos por 72°C (CADDAAH, 2013). A purificação das amostras amplificadas seguiu protocolo com solução de Polietileno Glicol (PEG) a 20%, de acordo com Cheng, Jia e Ran (2015), e o produto foi encaminhado para o Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), que prestou o serviço de sequenciamento.

A leitura dos cromatogramas dos produtos do sequenciamento foi feita pelo *software* GENEIOUS (Biomatters Ltda.) e o alinhamento das sequências pelo MAFFT, presente na plataforma CIPRES (MILLER, PFEIFFER e SCHWARTZ, 2010).

2.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA

As análises provenientes dos dados moleculares com ETS foram feitas a fim de inferir a relação filogenética entre as populações amostradas, bem como testar o monofiletismo do grupo. Para isso, os dados foram analisados por meio de análise estatística de Máxima Verossimilhança, baseada em Caddah (2013). A análise filogenética foi feita com o *software* RAxML, através da plataforma CIPRES (MILLER, PFEIFFER e SCHWARTZ, 2010).

Para a análise de inferência filogenética buscou-se incluir, no mínimo, um indivíduo de cada população amostrada. Foram inclusas as amostras de: MCr - Florianópolis, MCc - Urubici, MCc - Silva Jardim, MCc - Campos do Jordão, MCr -

Jacupiranga, MP - Petrópolis e MCr - Antonina. Além dessas, como no presente trabalho não havia sido sequenciada nenhuma amostra de *M. lagunensis*, uma amostra do grupo advinda dos trabalhos de Caddah (2013) e presente no GenBank foi incluída (*voucher* Caddah 720, UPCB). Juntamente com essa amostra, também foram acrescentadas outras três amostras também advindas dos trabalhos de Caddah (2013), de *M. proteoides* (*voucher* Caddah 765, UPCB), *M. cinerascens* var. *cinerascens* (*voucher* Caddah 730, UPCB) e *M. cinerascens* var. *robusta* (*voucher* Caddah 782, UPCB).

Para contextualizar filogeneticamente o complexo, foram utilizadas também outras amostras da seção *Discolor* (senso CADDAAH 2013) e, como grupo externo, foi escolhida a espécie *Miconia albicans* (CADDAAH, 2013). Os números representados nos nós da filogenia representam valores de *bootstrap*, ou seja, indicam a confiabilidade daquele nó, sendo considerados apenas valores iguais ou superiores a 70.

2.5 AMPLIFICAÇÃO DE DNA COM MARCADORES ISSR

Após cada extração de DNA e posterior eletroforese, também foram realizadas Reações em Cadeia de Polimerase (PCR) para as amostras de DNA. Objetivava-se amplificar o DNA de todas as populações amostradas, porém, pela dificuldade do desenvolvimento de atividades laboratoriais devido à pandemia de COVID-19 na UFSC desde 2020.1 essas atividades propostas para o trabalho não puderam ser concluídas.

Nas reações de PCR foram utilizados *primers* do tipo ISSR, bem como o kit TopTaq MasterMix, da empresa Qiagen (as reações de amplificações tinham um volume total de 10 µl, contendo 200 µM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 1.25 U de *Taq* DNA polymerase). Ao utilizar esse kit, os volumes da reação foram adaptados (Tabela 2) conforme resultados prévios de PCR. Para cada reação adicionaram-se 9 µl da mistura da Tabela 2 e mais 1 µl de DNA do respectivo indivíduo da população, totalizando 10 µl.

Tabela 2: Mistura para reação de PCR com base no kit Top Taq Master Mix.

Componente	Quantidade
Top Taq Master Mix 2x	5 µl
H ₂ O	2 µl

CoralLoad 10x	1 μ l
<i>Primer</i>	1 μ l

O DNA extraído passou por diluições em H₂O MiliQ, conforme os melhores resultados de PCR. Após o preparo da reação, os microtubos foram colocados em termociclador, no qual programas foram testados e otimizados. Foram testados *primers* do tipo ISSR que já estavam disponíveis no estoque do laboratório e já haviam sido otimizados para outros grupos vegetais em outros trabalhos. Os *primers* do tipo ISSR que foram testados com amostras do complexo foram cinco: pr5 (CA)₆RYN, Oligo 4 (CA)₈G, Oligo 5 (CTC)₆T (para estes foi utilizada a temperatura de anelamento de 48 °C no ciclo do termociclador) e o 889 (AC)₇RG, com temperatura de anelamento de 52 °C. Desses *primers* testados com o marcador ISSR todos tiveram bons resultados de amplificação com amostras do complexo. Porém, para o presente trabalho, foram utilizados nas ampliações de populações somente os *primers* 889 (AC)₇RG e Oligo 4 (CA)₈G.

Após o preparo da reação, os *ependorfs* eram colocados no termociclador, no qual um programa era configurado para a reação: desnaturação inicial de 95 °C por 3 minutos, 32 ciclos de 95 °C por 15 segundos, temperatura específica de anelamento do *primer* por 40 segundos, 72 °C por 2 minutos, e uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Para verificar os resultados obtidos nas reações de amplificação de DNA, também foram feitos géis de agarose após cada ciclo de amplificação, utilizando-se TBE 1x e agarose em pó. Após o preparo do gel, este foi colocado na cuba de eletroforese e em cada poço foi adicionado Bluejuice/Red gel junto com DNA de cada indivíduo respectivo. Vale ressaltar que no primeiro poço adicionou-se um *ladder* (100 pb) e no último uma amostra chamada de “branco” (controle negativo), que contém apenas a mistura com o kit Top Taq Master Mix, a fim de verificar se os resultados da PCR não foram contaminados por material biológico. Os parâmetros da corrente elétrica foram ajustados em 100v e 400mA por 180 minutos. Após esse período, o gel foi transferido da cuba para o transiluminador sob luz ultravioleta, onde foi analisado e registrado por meio de fotos.

No caso do *primer* 889 (AC)₇RG, foram feitas ampliações de DNA para as seguintes populações: MCr - Florianópolis, MCc - Urubici, MCc - Antônio Carlos, ML

- Laguna, MCc - Cambará do Sul, MCc - Campos do Jordão, MCr - Jacupiranga, MCc - Silva Jardim e MP - Petrópolis. Na Figura 3 do material suplementar está ilustrado um gel de eletroforese com resultados obtidos com a população de MCc - Silva Jardim, RJ. Já com o *primer* Oligo 4 (CA)₈G foram amplificadas as seguintes populações: MCr - Florianópolis, MCc - Urubici, MCc - Antônio Carlos, ML - Laguna, MCc - Cambará do Sul, MCc - Campos do Jordão e MCc - Silva Jardim. Na Figura 4 do material suplementar está ilustrado um gel de eletroforese da população de MCc - Cambará do Sul com o *primer* Oligo 4. De maneira geral, as ampliações de DNA com os *primers* de ISSR em cada população de cada táxon foram sumarizados na Tabela 1 do material suplementar.

2.6 GENOTIPAGEM

Para obter os dados moleculares de cada população amostrada, as imagens dos géis obtidos com a PCR foram alinhadas com base nas bandas obtidas com o *ladder*, como ilustrado na Figura 5 do material suplementar. A presença ou ausência de bandas de mesmo peso molecular foi considerada como a presença ou ausência de um alelo no locus analisado. A partir de então, foi construída uma matriz de dados indicando a presença (representada por 1) ou ausência (representada por 0) das bandas em um mesmo locus, como representado na Figura 6 do material suplementar.

Com o *primer* 889, a genotipagem foi feita com as populações de MCr - Florianópolis, MCc - Antônio Carlos, MCc - Urubici, ML - Laguna, MCc - Cambará do Sul, MCc - Campos do Jordão, MCr - Jacupiranga, MCc - Silva Jardim e MP - Petrópolis. Já com o *primer* Oligo 4, com as populações de MCr - Florianópolis, MCc - Antônio Carlos, MCc - Urubici, ML - Laguna, MCc - Cambará do Sul, MCc - Campos do Jordão e MCc - Silva Jardim. Porém, como é possível visualizar nos géis de PCR, apesar de bons resultados nas PCR, alguns indivíduos tiveram amplificação insatisfatória, sendo que estes foram representados com “NA” (não avaliável) e excluídos da genotipagem.

Vale mencionar que foram geradas três matrizes de dados, uma apenas com os dados do *primer* 889, uma apenas com os de Oligo 4 e uma com os dados de ambos os *primers* para as populações amplificadas com ambos, que foram: MCr - Florianópolis,

MCc - Antônio Carlos, MCc - Urubici, ML - Laguna, MCc - Cambará do Sul, MCc - Campos do Jordão e MCc - Silva Jardim. As três matrizes foram utilizadas porque, como explicado anteriormente, nem todas as populações foram amplificadas com os dois *primers* escolhidos, como no caso da população de MP - Petrópolis.

2.7 ANÁLISE DOS DADOS DA GENOTIPAGEM

Uma das análises feitas com os dados provenientes da genotipagem utilizou o *software* STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000). O *software* é uma ferramenta que utiliza inferência bayesiana para inferir o número de agrupamentos geneticamente estruturados (K) dentro de uma amostra com base nas frequências alélicas, de forma a minimizar o desequilíbrio em Hardy-Weinberg e, assim, deduzir a contribuição genética de cada agrupamento na composição genotípica de cada indivíduo (PRITCHARD et al., 2000; CARSTENS et al., 2013). Assim, é possível acessar padrões genéticos por meio da atribuição de uma “assinatura genética” (*fingerprint*) aos indivíduos que pode delinear grupos, auxiliando na circunscrição de táxons.

Para tal, foram adotados os modelos “Admixture” e “Allelic Frequencies Correlated”. Foram simulados valores de K variando de acordo com o número de populações amostradas. Cada valor de K foi otimizado em dez simulações com 50.000 buscas de Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC), com um período de *burn-in* de 10.000. Ao longo da análise, é possível que alguns resultados se mostrem muito similares, não variando muito de um cenário para outro, o que pode tornar a interpretação dos dados arbitrária. Dessa maneira, foi também utilizado um gráfico de Evanno (2005), que avalia qual cenário possui maior ajuste aos dados de genotipagem, com base na variação de K (ΔK), para determinar o melhor número de agrupamentos dentro da amostragem total.

Outra análise realizada foi a Análise de Componentes Principais (PCA), que é uma alternativa aos algoritmos de inferência Bayesiana, sendo utilizada por identificar estruturamentos genéticos em grandes conjuntos de dados com diferentes variáveis envolvidas, expondo uma correlação (JOMBART et al., 2010). Essa análise multivariada objetiva sumarizar, de maneira geral, a variabilidade entre indivíduos e também dentro dos grupos de indivíduos, assim como sintetiza as informações mais importantes do conjunto de dados (ABDI et al., 2010; JOMBART et al., 2010). Vale

ressaltar que esta análise já foi utilizada em trabalhos utilizando o marcador molecular ISSR para auxiliar na delimitação de um complexo de espécies, como em Nery et al. (2020). A matriz de dados utilizada foi a mesma na análise com o Structure, exceto por conter outras informações como a localização geográfica de cada indivíduo e a identificação taxonômica de cada um destes. Esses dados foram analisados com os pacotes “adegenet” e “poppr” na plataforma R (R Core Team, 2020). Para identificar o melhor número de grupos geneticamente estruturados foi utilizada também uma análise de k-means, que utiliza os componentes principais para identificar grupos de indivíduos na amostra total (JOMBART *et al.*, 2010). Para isso, essa análise considerou a variação de K conforme o número de populações na amostra.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a hipótese filogenética obtida pela análise de Máxima Verossimilhança (Figura 2), com exceção das duas amostras de *M. proteoides*, nenhuma amostra se agrupou conforme seria esperado pela taxonomia. Além disso, as amostras do complexo não formaram um grupo monofilético, já que *Miconia formosa* Cogn. foi resolvida como irmã de *M. proteoides*, enquanto outra amostra de *Miconia formosa* como irmã do grupo *M. cinerascens* + *M. lagunensis*. Cabe explicar que a espécie *Miconia formosa* não pertence ao complexo *Miconia cinerascens*, mas assim como em Caddah (2013), também foi incluída nas análises filogenéticas. Nesse trabalho, é possível inferir com 73% de confiabilidade que o complexo a que pertence *M. formosa* é irmão do complexo *M. cinerascens*. Inclusive, de acordo com Caddah (2013), os dois grupos possuem a exclusividade de que dentro de uma mesma espécie a cor das anteras pode variar de branca a amarela, como é presente nas variedades de *M. cinerascens*, não sendo isto visto dentro da mesma espécie em outras espécies do gênero, com exceção desses dois grupos. Porém, o complexo *M. cinerascens* e o de *M. formosa* possuem diferenças morfológicas, de hábito e de distribuição geográfica que os distinguem e os circunscrevem como grupos distintos.

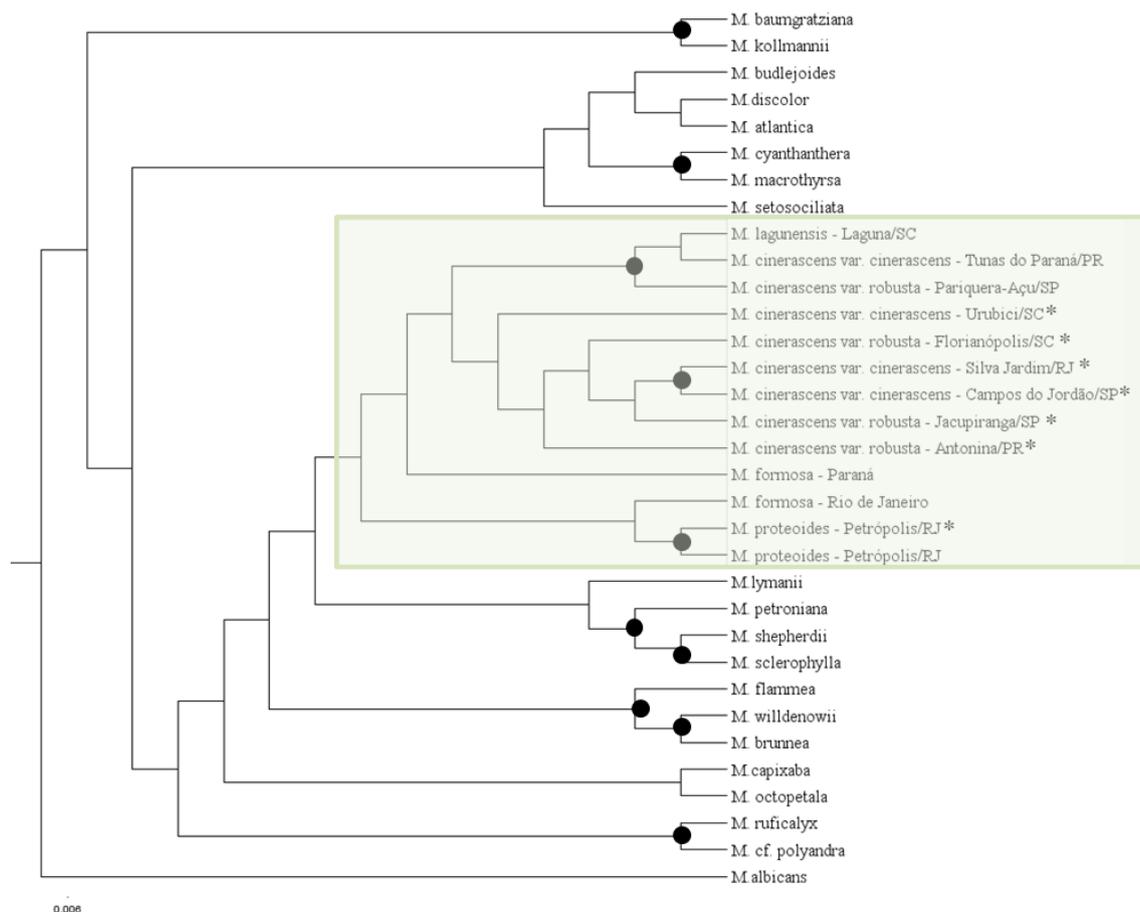


Figura 2: Árvore filogenética gerada a partir do marcador ETS e análise com o RAxML. O retângulo em destaque representa as amostras que pertencem ao complexo *Miconia cinerascens*, sendo que as com asterisco foram sequenciados para este trabalho. Os pontos em preto representam clados com sustentação estatística.

No entanto, é possível visualizar que a maioria dos clados da árvore, principalmente que envolvem terminais do complexo *Miconia cinerascens*, não obteve sustentação estatística e, logo, não possuem confiabilidade. Portanto, a relação filogenética entre populações, por meio desses resultados é inconclusiva. Diante dessas informações, é possível suportar que uma análise mais aprofundada no complexo *Miconia cinerascens* é extremamente necessária, visto que a presente análise filogenética não foi suficiente para circunscrever o grupo e auxiliar na decisão taxonômica em relação à delimitação dos espécies. De acordo com Crawford e Mort (2004), há casos em que os métodos de inferência filogenética mostram-se insuficientes na resolução do relacionamento entre espécies intimamente relacionadas e com divergência recente, bem como entre táxons infraespecíficos.

O número de indivíduos e de locos genotipados com os marcadores ISSR encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Número de indivíduos do complexo *Miconia cinerascens* e número de locos genotipados para os marcadores ISSR.

marcador ISSR	n° ind.	n° locos
889	186	38
Oligo 4	146	40
889 + Oligo 4	146	78

Na análise com o *primer* 889, o melhor cenário foi obtido com K=3 (Figura 3), sendo este escolhido com base no maior valor do gráfico de Evanno (Figura 7, no material suplementar).

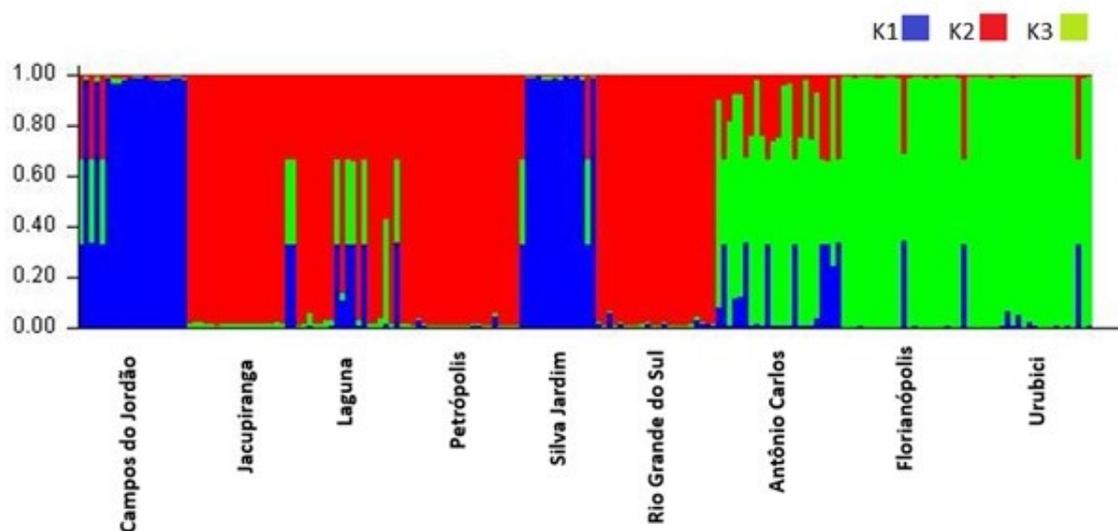


Figura 3: Gráfico gerado pelo Structure com o melhor cenário de K (K=3) utilizando o marcador ISSR “889”, para as amostras das populações do complexo *Miconia cinerascens*.

Neste cenário de K, foram agrupadas as populações MCc – Campos do Jordão e MCc - Silva Jardim (azul); MCr – Jacupiranga, ML – Laguna, MP - Petrópolis e MCc – Cambará do Sul (vermelho); populações MCc - Antônio Carlos, MCc - Urubici e de MCr – Florianópolis (verde). Esperava-se, seguindo a hipótese de possíveis espécies distintas, que houvesse na simulação um delineamento entre populações das variedades *cinerascens* e *robusta*, bem como da população de *Miconia lagunensis*, de Laguna, e de *Miconia proteoides*, de Petrópolis, o que não foi obtido, como é possível observar nos agrupamentos vermelho e verde, que possuem diferentes táxons juntos. Também é

possível observar que os grupos genéticos possuem indivíduos com diferentes partes de seu genótipo compartilhado com diferentes agrupamentos, o que é presente no caso das populações de ML – Laguna e MCc - Antônio Carlos.

Na análise feita com o *primer* Oligo 4, as simulações de K foram feitas com k variando de 1 a 7 (conforme o número de populações inclusas), sendo que o melhor cenário de K pelo Structure foi de K= 4 (Figura 4), como apontado pelo gráfico de Evanno (Figura 8 no material suplementar).

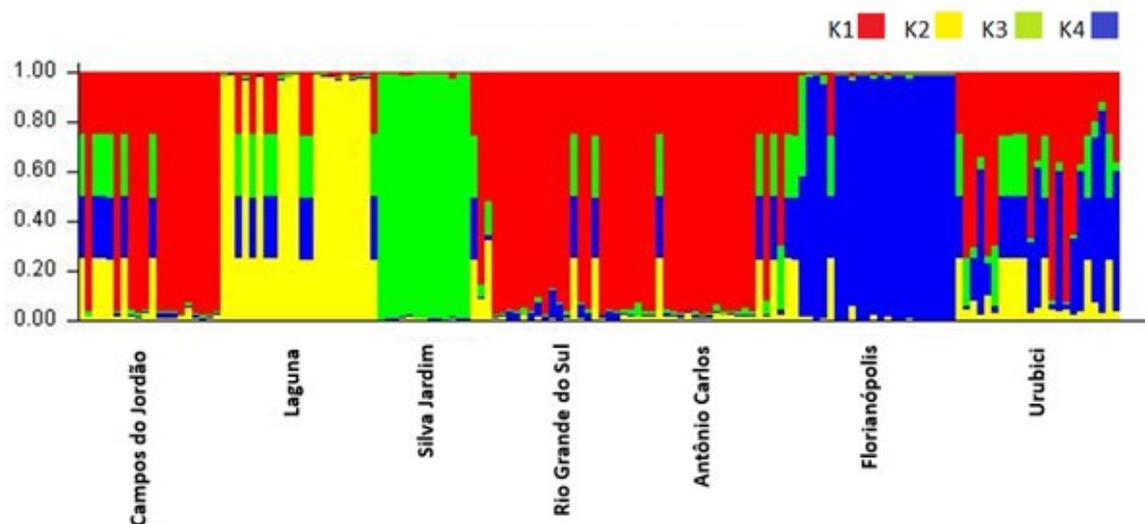


Figura 4: Gráfico gerado pelo Structure com o melhor cenário de K (K=4) utilizando o marcador ISSR “Oligo 4”, para as amostras das populações do complexo *Miconia cinerascens*.

A simulação apontou quatro agrupamentos: um vermelho contendo as populações MCc - Campos do Jordão, MCc – Cambará do Sul, MCc - Antônio Carlos e MCc - Urubici, um amarelo contendo a população ML - Laguna, um verde contendo uma população de MCc - Silva Jardim e um azul contendo uma população MCr - Florianópolis. Apesar de algumas populações estarem majoritariamente pertencendo a um agrupamento, um número considerável de indivíduos tem seu genótipo compartilhado com outros agrupamentos, como é o caso das populações de MCc - Campos do Jordão, MCc - Laguna e MCc - Urubici. É interessante observar que a população de MCc - Silva Jardim constitui um agrupamento distinto, em verde. Cabe mencionar que essa população, apesar de identificada como *M. cinerascens* var. *cinerascens*, foi coletada numa região de Mata Atlântica *sensu stricto*, uma característica da distribuição de *M. cinerascens* var. *robusta*, além de possuir a base das folhas cordadas uma característica não vista até então em nenhuma outra população, já

que estas possuem base cuneada. Apesar de diversas populações de *M. cinerascens* var. *cinerascens* estarem agrupadas em um grupo genético distinto, como no caso do agrupamento vermelho, percebe-se o compartilhamento do genótipo de indivíduos com outros agrupamentos genéticos. Além disso, apesar da população de ML - Laguna estar num agrupamento genético distinto (em amarelo), este agrupamento também possui indivíduos que compartilham partes do genótipo com os outros agrupamentos genéticos.

Por fim, a última análise feita, que juntou os dados genéticos obtidos da genotipagem dos *primers* 889 e Oligo 4 obteve como melhor cenário K=5, representado no gráfico do Structure (Figura 5) e pelo gráfico de Evanno (Figura 9, no material suplementar).

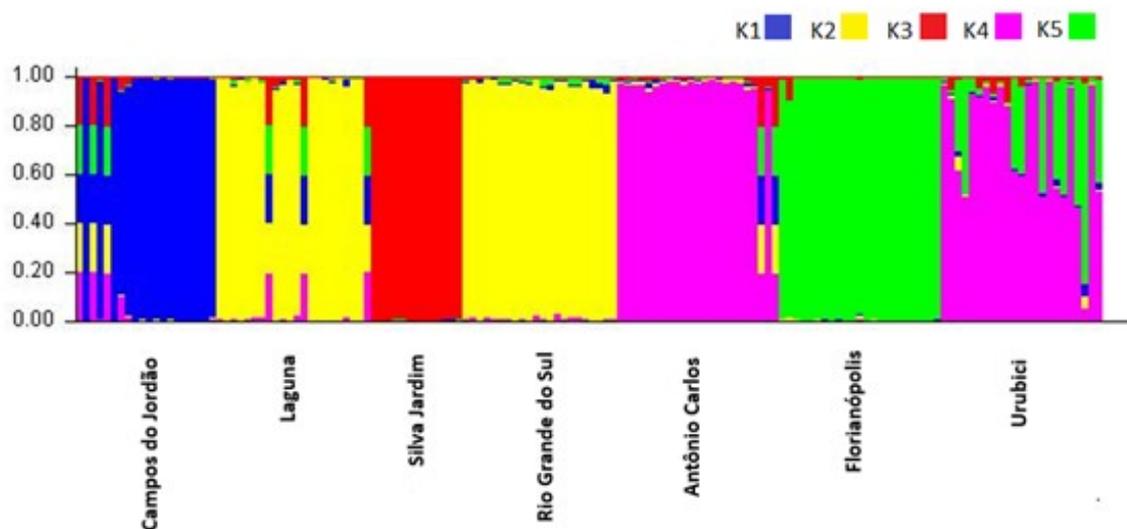


Figura 5: Gráfico gerado pelo Structure com o melhor cenário de K (K=5), utilizando os marcadores ISSR "889" e "Oligo 4", para as amostras das populações do complexo *Miconia cinerascens*.

O melhor cenário de K apontou cinco agrupamentos: um azul, com a população MCc – Campos do Jordão, um amarelo, com as populações ML – Laguna e MCc – Cambará do Sul, em vermelho com a população MCc – Silva Jardim, em rosa as populações MCc - Antônio Carlos, MCc – Urubici, e em verde a população MCr – Florianópolis. Nesta simulação, importante por trazer mais dados genéticos advindos de dois *primers* juntos, é possível ver que, novamente, o delineamento esperado das duas variedades de *M. cinerascens*, bem como de *Miconia lagunensis* não foi obtido, visto que as populações da variedade *cinerascens* pertencem a diferentes agrupamentos genéticos, como no caso dos agrupamentos azul, amarelo e rosa, e a população ML – Laguna encontra-se no mesmo grupo genético (amarelo) da população MCc – Cambará

do Sul. Além disso, é interessante observar o agrupamento vermelho, que contém a população MCc - Silva Jardim, que novamente constitui um agrupamento distinto, sendo que esta população apresenta características peculiares em sua morfologia e distribuição, que necessitam de mais investigação. Apesar do agrupamento verde de MCr - Florianópolis, ser um agrupamento bem delimitado, a população MCc – Urubici compartilha uma proporção significativa de seu genótipo com a mesma.

O fator geográfico parece ter alguma influência nos agrupamentos genéticos formados com a análise do Structure. Por exemplo, o agrupamento rosa apresenta populações de *M. cinerascens* var. *cinerascens* de Santa Catarina que estão mais próximas geograficamente (ver Figura 1). O agrupamento verde contém apenas a população MCr - Florianópolis, o agrupamento azul apenas MCc - Campos do Jordão e o agrupamento vermelho a população de MCc - Silva Jardim, estando estas mais isoladas geograficamente em relação às outras populações da mesma variedade, como as de Santa Catarina. O agrupamento amarelo, de ML - Laguna e de MCc – Cambará do Sul encontram-se no mesmo grupo genético, provavelmente pela proximidade geográfica entre as mesmas, o que é interessante pois não há distinção da população de ML – Laguna em relação as de *M. cinerascens*, e também por essa constituir um grupo com MCc – Cambará do Sul, mais isolada geograficamente em relação às outras da mesma variedade de Santa Catarina. Vale notar que, curiosamente, pelo fator geográfico, esperava-se, levando em consideração o visível compartilhamento de proporções do genótipo entre populações de Santa Catarina (mesmo entre as variedades de *M. cinerascens*), que a população MCc – Antônio Carlos estaria mais relacionada com a de MCr - Florianópolis, dada a proximidade entre as localidades. Porém, pela estruturação dos agrupamentos pelo Structure, há um compartilhamento genotípico da população MCr - Florianópolis muito evidente com a de MCc - Urubici, sugerindo que o fluxo gênico pode não ser recente e a população de MCc - Urubici pode possuir um *pool* de alelos ancestrais do grupo, dada a distância geográfica atual entre as populações (ver Figura 1).

Novamente, cabe mencionar que existem populações que possuem indivíduos que compartilham partes do genótipo com outros agrupamentos, como as populações de MCc - Campos do Jordão, ML - Laguna, MCc - Antônio Carlos e MCc - Urubici. Dessa forma, pode-se inferir que existe (ou já existiu no passado, como mencionado ao discutir o fator geográfico) um fluxo gênico entre as populações amostradas em Santa

Catarina, principalmente na população de MCc – Urubici, visto que possui muitos indivíduos que possuem genótipo compartilhado com a população de MCr – Florianópolis, e na população de ML - Laguna, que contém indivíduos que compartilham proporções do genótipo com todos os outros agrupamentos genéticos, não só aos que pertencem as populações catarinenses. Além disso, em relação à presença de diversos indivíduos nos agrupamentos genéticos que possuem partes do genótipo compartilhado com outros agrupamentos, é possível que entre populações mais próximas possa ocorrer fluxo gênico e em populações mais distantes geograficamente a retenção de alelos ancestrais. Vale ressaltar que a espécie *Miconia cinerascens*, que já foi foco de estudos sobre biologia reprodutiva, produz frutos em abundância e é uma espécie zoocórica, com estudos de dispersão de sementes por avifauna (CAMPOS, 2010; SOUZA, 2018). É possível que em populações geograficamente mais próximas essa dispersão por avifauna possibilite o fluxo gênico, sendo esta uma hipótese.

Dessa maneira, os resultados obtidos com a análise estatística com o Structure contrastam com o esperado, de quatro linhagens distintas com variações morfológicas e de distribuição bem delineadas. Assim, infere-se que, apesar de haver uma diferenciação morfológica e de distribuição entre as variedades em *M. cinerascens*, de *M. lagunensis* e de *M. proteoides*, esse delineamento não coincidiu com os grupos genéticos obtidos. Assim, pode-se hipotetizar que o complexo *Miconia cinerascens* é composto por uma espécie muito variável e, por ser uma espécie amplamente distribuída pela Mata Atlântica, adquiriu variações morfológicas distintas conforme o ambiente. Portanto, não há diferenciação a nível infraespecífico, no caso de *M. cinerascens*, e interespecífico, em relação à *M. cinerascens*, *M. lagunensis* e *M. proteoides*. Porém, é importante destacar que para uma decisão taxonômica são necessários mais dados advindos de mais marcadores do tipo ISSR, bem como a inclusão de todas as populações amostradas do complexo nas análises.

Com os dados advindos da amplificação com os *primers* 889 e Oligo 4, foi feita uma ordenação por PCA, sendo gerados gráficos com a correlação entre as variáveis de dados genéticos com a identificação taxonômica (Figura 6) e com a localização geográfica (Figura 7). Cada eixo de “PC” representa porcentagens de variação genética. Nas Figuras 6 e 7, é possível visualizar que nos dois eixos de PC, 27% da variação alélica está representada.

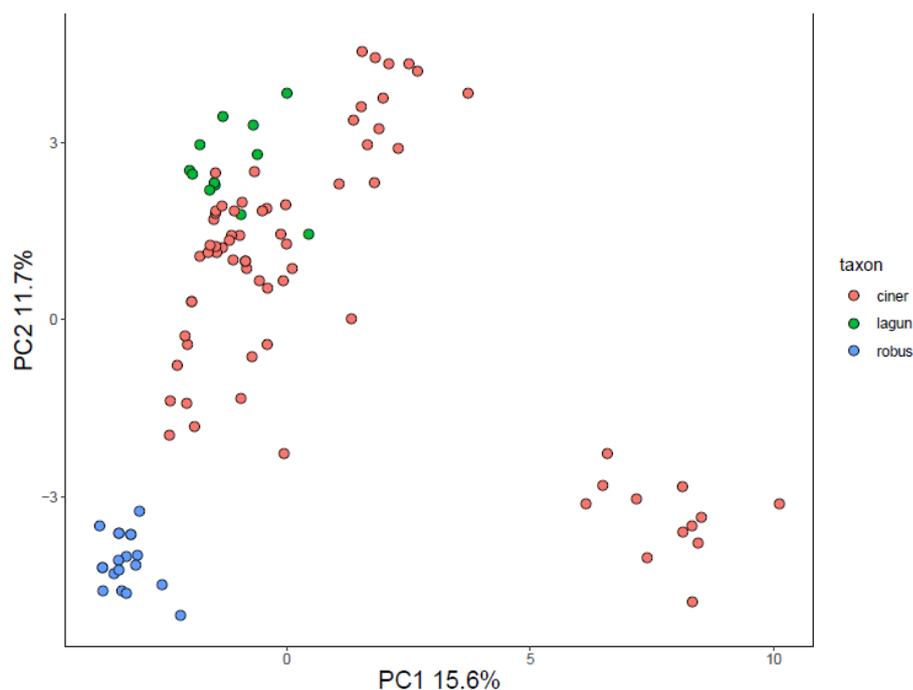


Figura 6: Gráfico da ordenação por PCA com a correlação dos dados genéticos e de identificação taxonômica das populações. Em rosa, estão representados indivíduos de *M. cinerascens* var. *cinerascens*, em verde de *M. lagunensis* e em azul *M. cinerascens* var. *robusta*.

Nesse *plot* (Figura 6), é possível inferir que *M. lagunensis* não difere de *M. cinerascens* em nenhum eixo (PC1 e PC2) e a população de *M. cinerascens* var. *robusta* difere apenas na representação do eixo PC2. Além disso, é possível notar uma população de *M. cinerascens* mais distanciada das outras pertencentes a mesma variedade, correspondendo à população de MCc - Silva Jardim, já mencionada anteriormente por possuir uma combinação diferente de características morfológicas e de distribuição.

Já na Figura 7 abaixo, que plota a variável “localidade” com a variação genética, a localização geográfica de cada população analisada está representada na legenda com um símbolo. Nesse gráfico, é interessante observar que parece haver um fator geográfico envolvido na correlação exposta pela PCA, pois, de maneira geral, no eixo PC1 parece haver uma relação geográfica envolvida na variação genética, com populações do sul do Brasil ocupando valores na extrema esquerda, a população de MCc – Campos do Jordão valores medianos e a população MCc - Silva Jardim ocupando valores da extrema direita. Assim, de maneira muito geral, parece haver uma correlação genética com a distribuição geográfica ao longo da Serra do Mar, em que as populações se distribuem. Além disso, é possível ver que, curiosamente, em relação ao

eixo PC2, a população de MCc - Silva Jardim compartilha uma similaridade com a população de MCr - Florianópolis, o que não suporta o esperado, a correlação de grupos genéticos e morfológicos delimitados. Essa similaridade, porém, é possível considerando um *pool* de alelos ancestrais compartilhados, visto que o fluxo gênico parece pouco provável devido à distribuição geográfica dessas populações (ver Figura 1).

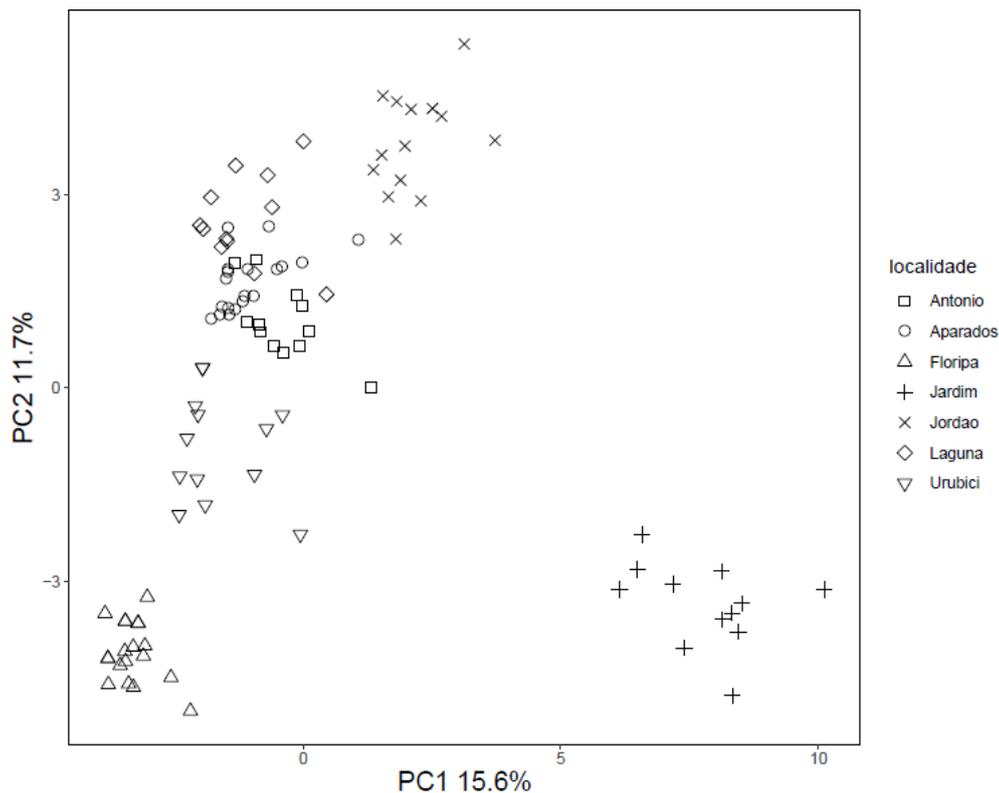


Figura 7: Gráfico da ordenação por PCA com a correlação dos dados genéticos e de distribuição geográfica das populações. As populações estão representadas por diferentes símbolos, sendo as populações: “Antonio” = MCc-Antônio Carlos, “Aparados” = MCc-Cambará do S Sul, “Floripa” = MCr -Florianópolis, “Jardim” = MCc-Silva Jardim, “Jordao” = MCc-Campos do Jordão, “Laguna” = ML – Laguna, “Urubici” = MCc-Urubici.

Por fim, foi também feita a análise de *k-means*, com base no Critério Informativo Bayesiano (BIC), que, assim como o *software* Structure, utiliza diferentes cenários de K e valores de verossimilhança associados para indicar o melhor número de grupos geneticamente estruturados na amostra, sendo este de $k=5$, como representado na Figura 8.

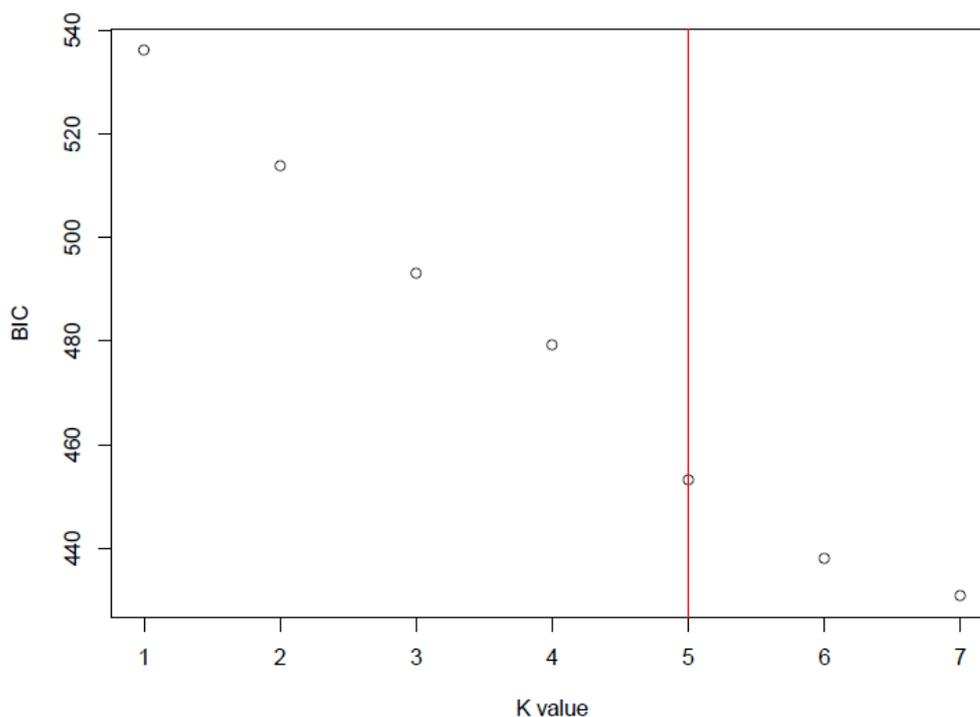


Figura 8: Gráfico de k-means, que indica o melhor cenário de agrupamentos geneticamente estruturados na amostra, sendo igual a 5 grupos.

Segundo a definição de espécie de de Queiroz (2005), a confusão histórica no delineamento de espécies se dá porque os diferentes conceitos levam em conta critérios específicos de diferentes momentos da especiação, sendo este um processo evolutivo contínuo e não linear. Dessa forma, segundo o CFGE de de Queiroz (1998), em que espécies são segmentos de linhagens de metapopulações evoluindo independentemente, considerando os dados moleculares aqui analisados, as variedades de *Miconia cinerascens*, *M. lagunensis* e *M. proteoides* não seriam consideradas unidades discretas, pois as populações amostradas desses táxons não se mostraram independentes e coesas. No entanto, vale lembrar que, ainda de acordo com o autor, a presença de uma das propriedades (isolamento reprodutivo, diferenciação morfológica e diferenciação geográfica, por exemplo) constitui uma evidência para separação da linhagem, mas a ausência de uma mesma propriedade não constitui uma evidência contra a separação de linhagens. Assim, a ausência de uma correlação entre a genética das populações e suas respectivas designações taxonômicas, como obtido neste trabalho, não corrobora a atual circunscrição dos táxons, mas sugere a existência de uma única espécie. São necessários estudos adicionais, correlacionando analiticamente dados morfológicos e biogeográficos, por exemplo, para sustentar esta hipótese. Vale lembrar que, no caso de uma proposição definitiva de uma única espécie para circunscrever todo o complexo, o

nome *Miconia proteoides* tem prioridade sobre qualquer outro nome na categoria de espécie.

4 CONCLUSÃO

O presente trabalho explorou diferentes propriedades de linhagens do complexo *Miconia cinerascens*, como os dados genéticos, de distribuição geográfica e de morfologia em uma abordagem integrativa, a fim de gerar mais informações e possíveis linhas de evidência para circunscrição do complexo *Miconia cinerascens*. As análises filogenéticas mostraram-se inconclusivas no relacionamento entre indivíduos das populações, dada a falta de confiabilidade da árvore filogenética, de maneira geral. Além disso, também foi inconclusivo o monofiletismo do grupo devido também a falta de suporte estatístico dos ramos da árvore. Dessa forma, os resultados dessa análise sustentam a necessidade de um estudo mais aprofundado, a nível populacional, para compreender melhor as relações entre os espécimes envolvidos no complexo.

Os resultados obtidos com a análise estatística dos dados do marcador ISSR, tanto com o Structure quanto com a PCA, contrastam com a hipótese inicial esperada, de quatro linhagens distintas com variações morfológicas e de distribuição bem delineadas. A análise com o Structure, assim como a de PCA com *k-means*, apontou que o melhor cenário de K nos dados com os dois *primers* seriam de cinco agrupamentos, sendo que nestes agrupamentos a delimitação esperada não foi observada. A análise ainda apontou que parece haver fluxo gênico, possivelmente ancestral em algumas populações devido à distância atual entre as mesmas, ou atual, principalmente em Santa Catarina, o que já era cogitado como possível em estudos anteriores, já que algumas populações compartilham proporções significativas do genótipo com diversos agrupamentos genéticos. Existe também a possibilidade de indivíduos mais distantes compartilharem alelos ancestrais do grupo, como nas populações de MCc – Urubici, ML - Laguna e MCc - Campos do Jordão. Além disso, a população de MCc – Silva Jardim amostrada mostrou um isolamento genético maior em relação às demais populações, sendo que essa possui combinações de características diferentes entre as entidades do complexo, o que sugere a necessidade de um estudo mais aprofundado com a mesma.

Além disso, em todas as análises parece haver um fator geográfico envolvido nos agrupamentos genéticos. Aparentemente, esse fator geográfico gera um padrão nos agrupamentos genéticos mais evidente que o delineamento pelas diferenças morfológicas e da distribuição típicas dos espécimes, como seria o esperado pela hipótese inicial.

Infere-se, portanto, que, apesar de haver uma diferenciação morfológica e de distribuição entre as variedades de *M. cinerascens* e de *M. lagunensis*, esta não coincidiu com os agrupamentos genéticos obtidos, e pode-se hipotetizar que o complexo *Miconia cinerascens* é composto por apenas uma espécie muito variável de acordo com o ambiente, dada sua ampla distribuição pela Mata Atlântica. Dessa forma, a hipótese atual seria de uma espécie apenas, em que não há diferenciação a nível infraespecífico, no caso de *M. cinerascens*, e interespecífico, em relação à *M. cinerascens* e *M. lagunensis*. É necessário, ainda, gerar mais dados genéticos da população de *Miconia proteoides* para incluir nas análises. Ademais, para uma análise mais aprofundada e para uma decisão taxonômica, é também necessário incluir nas análises todas as populações amostradas que não puderam ser amplificadas até o momento, bem como gerar mais dados genéticos com mais marcadores do tipo ISSR para todas as populações.

REFERÊNCIAS

- ABDI, H.; WILLIAMS, L. J. Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, v. 2, n. 4, p. 433–459, 2010.
- ALEIXO, A. Conceitos de espécie e suas implicações para a conservação. *Megadiversidade*, v.5, n.1-2, p. 87-95, 2009.
- BAUMGRATZ, J.F.A. et al. **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil - Melastomataceae**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010.
- BAUMGRATZ, J.F.A.; GOLDENBERG, R. New Species of *Miconia* (Melastomataceae; Miconieae) from Brazilian Atlantic Forest. *Systematic Botany*, v.42, n.4, p.920-924, 2017.
- BENZAQUEM, D. C. **Estudo do polimorfismo genético de espécies do gênero *Aniba* (Lauraceae) utilizando marcadores ISSRs**. 2009. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2009.
- BFG. Growing knowledge: An overview of seed plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, v.66, p.1085–1113, 2015.
- CADDAH, M.K. **Estudos taxômicos e filogenéticos em *Miconia* sect. *Discolor* (Melastomataceae, Miconieae)**. 2013. 257 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
- CAMPOS, R. P. **Espécies lenhosas pioneiras apresentam diferentes potenciais de facilitação da regeneração natural em pastagens abandonadas?** 2010. 45 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- CARSTENS, B. C et al. How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*, v.22, n.17, p.4369–4383, 2013.
- CHENG, C.; JIA, J.L.; RAN, S.Y. Polyethylene glycol and divalent salt-induced DNA reentrant condensation revealed by single molecule measurements. *Soft Matter*, v. 11, n. 19, p. 3927–3935, 2015.
- CLAUSING, G.; RENNER, S.S. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. *American Journal of Botany*, v.88, n.3, p. 486-498, 2001.
- CRAWFORD, D.J.; MORT, M.E. Single-locus molecular markers for inferring relationships at lower taxonomic levels: observations and comments. *Taxon*, v.53, n.3, p.631–635, 2004.

- CRUZ, G.A.S. **Diversidade genética populacional nas espécies pioneiras *Cyperus ligularis* L. *C. odoratus* L. (Cyperaceae) e *Miconia prasina* (Sw.) DC. (Melastomataceae) ocorrentes em remanescentes da Floresta Atlântica de Pernambuco detectada pelos marcadores moleculares DAF e ISSR.** 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.
- DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, v.85, n.3, p.407-415, 2005.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15, 1987.
- ESSI, L. **Análise Filogenética e Taxonômica do Complexo *Briza* (Poaceae: Poeae).** 2007. 277 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- EVANNO, G; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, v. 14, p. 2611–2620, 2005.
- FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos.** 1. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007.
- GOLDENBERG, R.; SHEPHERD, G. J. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in “Cerrado” vegetation. *Plant Systematics and Evolution*, v. 211, p. 13-29, 1998.
- GOLDENBERG, R. *Miconia Ruiz & Pav., nom. cons.* In: Wanderley et al (Org.). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. São Paulo: Wanderley et al., 2009. p. 73-102.
- GOLDENBERG, R.; CADDDAH, M.K. *Miconia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2015.
Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB9666>>. Acesso em: 01 maio de 2021.
- HAUSDORF, B.; HENNIG, C. Species Delimitation Using Dominant and Codominant Multilocus Markers. *Systematic Biology*, v.59, n.5, p.491–503, 2010.
- JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, v.11, n.1, p. 94, 2010.
- LIMA, D.F. **Estudos biossistemáticos e taxonômicos sobre o Complexo *Myrcia laruotteana* Cambess. (Myrtaceae).** 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
- LONGO A., et al. Evolution from DNA to RNA recognition by the bI3 LAGLIDADG maturase. *Natural Structure & Molecular Biology*, v. 12, n. 9, p. 779-87, 2005.
- MASSENSINI JÚNIOR, A. **Filogenia molecular de *Acianthera* Scheidw. (Orchidaceae) com ênfase nas espécies rupícolas do gênero e variabilidade genética**

- do complexo *Acianthera prolifera* Lindl.** 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
- MEIRELLES, J. **Filogenia de *Miconia* Seção *Miconia* Subseção *Seriatiflorae* e revisão do clado *Albicans* (Melastomataceae, Miconieae).** 2015. 219 f. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.
- MEYER, F. S. **Estudos sistemáticos no clado *Chaetogastra* DC. e gêneros aliados (Melastomataceae: Melastomeae).** 2016. 295 f. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.
- MICHELANGELI, F. A. et al. **PBI Miconieae: A complete web-based monograph of the tribe Miconieae (Melastomataceae).** The New York Botanical Garden, disponível em:
<http://sweetgum.nybg.org/science/projects/melastomataceae/?_ga=2.21198971.1355885185.1560641394-1651633510.1560641394>. Acesso em: junho de 2020.
- MICHELANGLI, F.A. et al. A Guide to Curating New World Melastomataceae Collections with a Linear Generic Sequence to World-Wide Melastomataceae. *Preprints*, 2020100203, 2020.
- MILLER, M.A., PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *In*: Institute of Electrical and Electronics Engineers. **Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**. Nova Orleans: Institute of Electrical and Electronics Engineers, 2010, p. 1–8.
- NERY, E.K. et al. Delimiting a constellation: integrative taxonomy of a star-shaped *Hydrocotyle* species complex (Araliaceae) from the Brazilian Atlantic forest. *Plant Systematics and Evolution*, v. 306, n. 57, 2020.
- OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetic Molecular Biology*, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.
- PASSOS, V. M. **Delimitação específica de *Passiflora galbana* Mast. e *Passiflora mucronata* Lam. através de Marcadores Moleculares, Dados Morfométricos e Citogenéticos.** 2007. 167 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2007.
- PADIAL, J. M. et al. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, v.7, n.16, 2010.
- PRITCHARD, J.K. et al. P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v. 155, p. 945–959, 2000.
- de QUEIROZ, K. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. *In*: D. J. Howard, and S. H. Berlocher (Eds.). *Endless forms: Species and speciation*. Oxford: Oxford University Press, 1988. p. 57-75.

de QUEIROZ, K. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, p. 6600- 6607, 2005.

De QUEIROZ, K. Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology*, v.56, n.6, p.879–886, 2007.

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

REGINATO, M.; MICHELANGELI, F. A. (2016). Untangling the phylogeny of *Leandra* s.str. (Melastomataceae, Miconieae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.96, p.17–32. 2016.

RENNER, S.S. A survey of reproductive biology in neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 76, p. 496-518, 1989.

RODRIGUES, J.F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ROUX, J.J.L.E; WIECZOREK, A.M.; MEYER, J. Genetic diversity and structure of the invasive tree *Miconia calvescens* in Pacific islands. *Diversity and Distributions*, v. 14, p. 935-946, 2008.

SILVA, A.S. **Delimitação taxonômica e variabilidade genética de *Paspalum polyphyllum* Nees ex Trin. e *Paspalum bicilium* Mez (Poaceae, Paspaleae)**. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2013. 15

SOUZA, L. R. **Modelos matemáticos aplicados a restauração ecológica: caracterização, avaliação e valorização dos serviços ecossistêmicos promovidos pela avifauna**. 2018. 138 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Setor de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

SPECIESLINK. 2011. Disponível em: <<http://smlink.cria.org.br/>>. Acesso em: mai. 2020.

STEHMANN, J.R. *et al.* **Plantas da Floresta Atlântica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009.

WIENS, J.J. Species delimitation: New approaches for discovering diversity. *Systematic Biology*, v. 56, p. 875–878, 2007.

WOLFE, A. D. ISSR Techniques for Evolutionary Biology. *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data*, p.134–144, 2005.

WURDACK, J. J. Melastomataceae of Santa Catarina. *Sellowia* v.14, p.109-207, 1962.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A., LABUDAD. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, v. 20, p. 176–183, 1994.

APÊNDICE A - MATERIAL SUPLEMENTAR

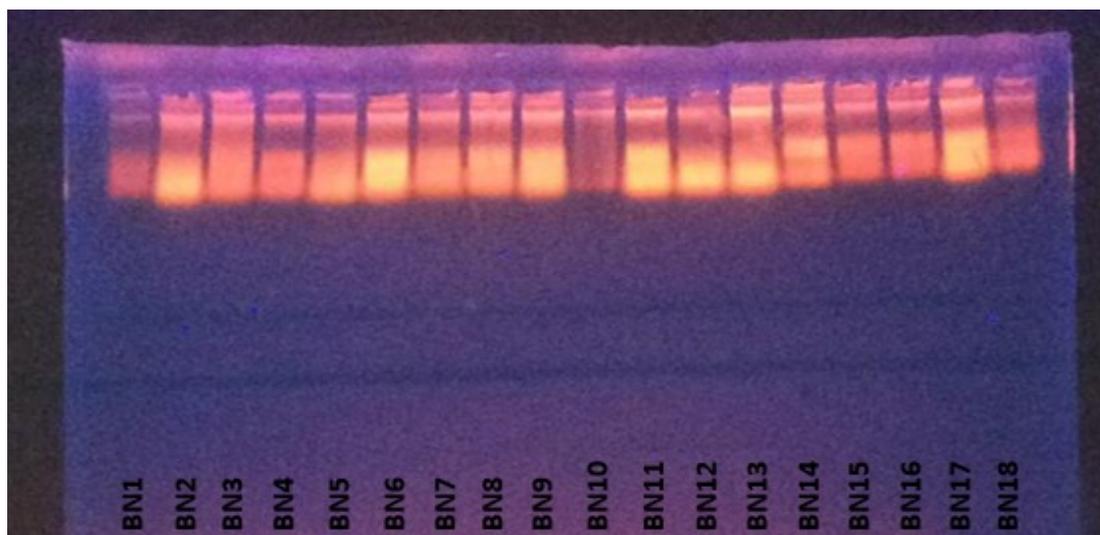


Figura 1: Gel de eletroforese contendo amostras da extração de DNA feita em indivíduos da população de Balsa Nova-PR, representados por BN1-BN18.

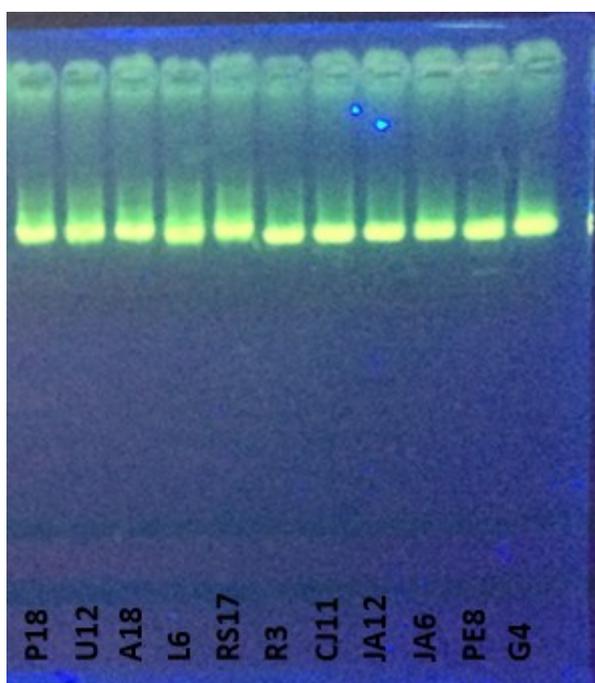


Figura 2: Gel de eletroforese de amostras amplificadas com primers do marcador ETS. P18=Florianópolis, U12=Urubici, A18=Antônio Carlos, L6=Laguna, RS17=Cambará do Sul, R3=Silva Jardim, CJ11=Campos do Jordão, JA12 e JA6=Jacupiranga, PE8=Petrópolis, G4=Antonina.

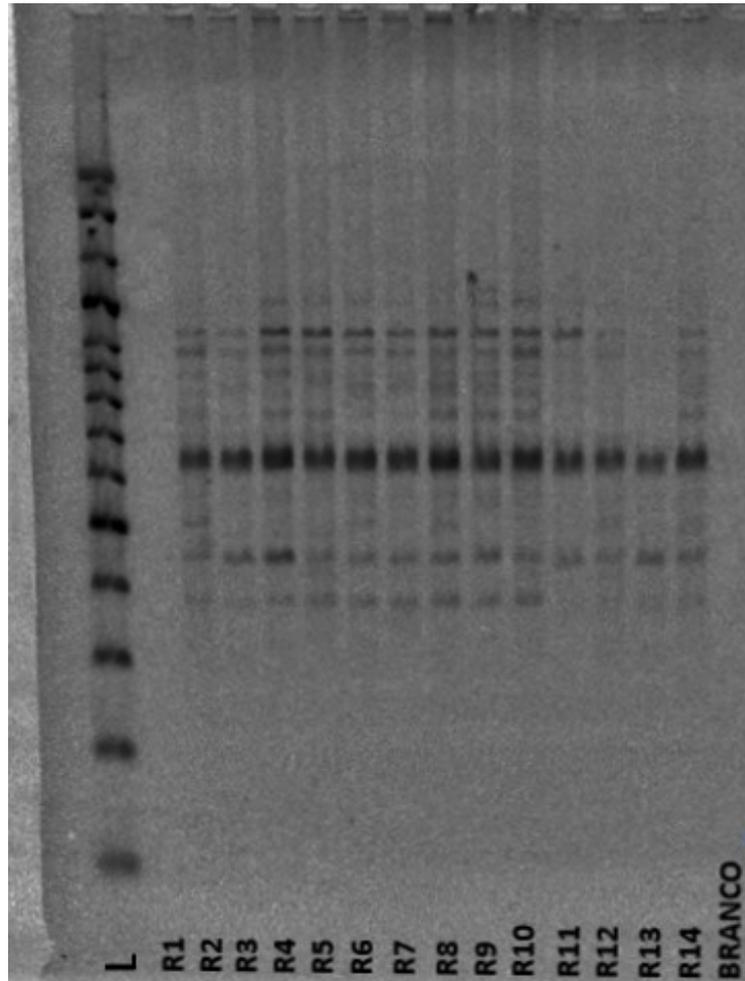


Figura 3: Amplificações com o primer 889. Indivíduos da população de Silva Jardim-RJ representados por R1-R14. L representa o Ladder de 100bp.

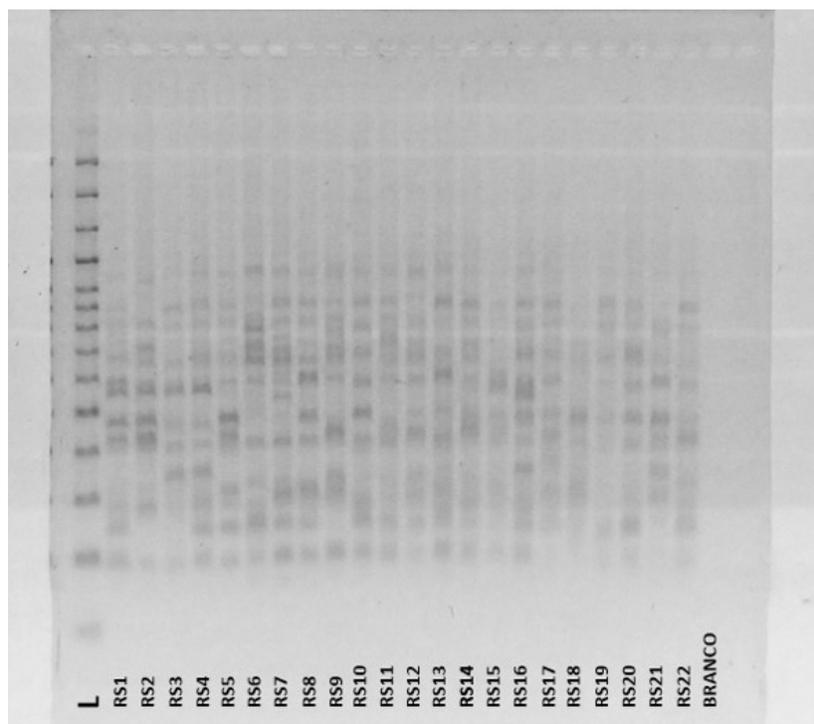


Figura 4: Amplificações com *primer* Oligo 4. Indivíduos da população de Cambará do Sul-RS, representados por RS1-RS22. L representa o Ladder de 100bp

Tabela 1: Amplificações com os marcadores ISSR e ETS para cada população de cada táxon.

Táxon	População	Amplificações		
		ISSR (<i>primer</i> 889)	ISSR (<i>primer</i> Oligo 4)	<i>Primers</i> ETS
<i>Miconia cinerascens</i> var. <i>cinerascens</i>	Cambará do Sul (RS)	X	X	
	Urubici (SC)	X	X	X
	Antônio Carlos (SC)	X	X	
	Balsa Nova (PR)			
	Campos do Jordão (SP)	X	X	X
	Silva Jardim (RJ)	X	X	X
<i>Miconia cinerascens</i> var. <i>robusta</i>	Florianópolis (SC)	X	X	X
	Antonina (PR)			X
	Jacupiranga (SP)	X		X
<i>Miconia lagunensis</i>	Laguna (SC)	X	X	
<i>Miconia proteoides</i>	Petrópolis (RJ)	X		X

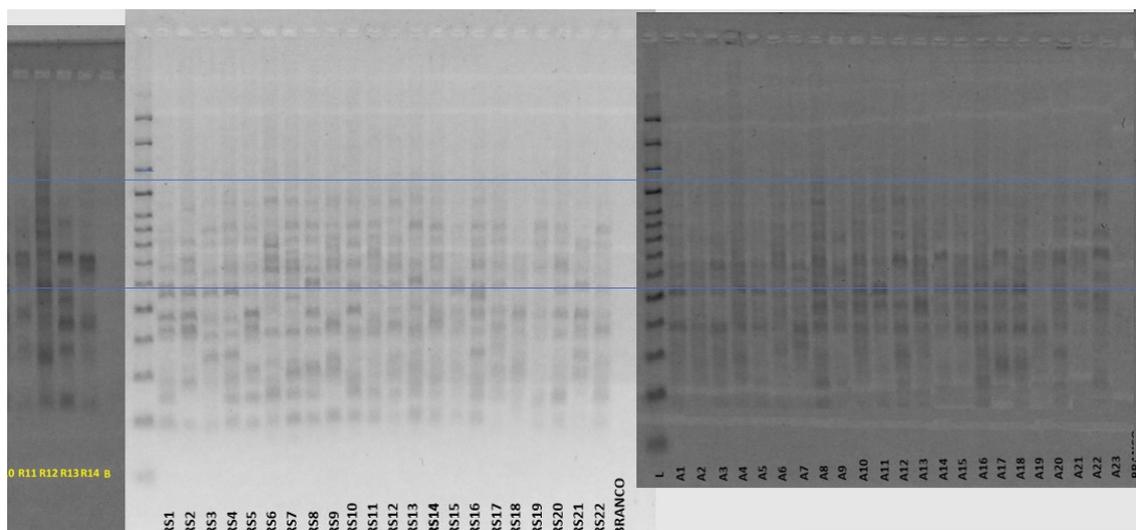


Figura 5: Alinhamento de géis de eletroforese das populações de Silva Jardim, representados por R, Rio Grande do Sul, representados por RS, e Antônio Carlos, representados por A, para genotipagem.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1	pr889.1-2, pr889.1-2, pr889.2.P pr889.2-3, pr889.3.P pr889.3-4r pr889.4-5, pr889.4-5, pr889.5-6, pr889.5-6, pr889.6-7r pr889.6-7, pr889.7.P pr889.7-8, pr889.7-8, pr889.8.P pr889.8-9, pr889.8-9,																			
2	P1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1
3	P2	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1
4	P3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1
5	P4	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1
6	P5	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1
7	P6	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
8	P7	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
9	P8	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1
10	P9	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1
11	P10	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1
12	P11	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1
13	P12	NA																		
14	P13	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1
15	P14	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1
16	P15	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0
17	P16	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1
18	P17	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1
19	P18	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1
20	P19	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
21	P20	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1
22	P21	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
23	P22	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1

Figura 6: Matriz de dados construída a partir da genotipagem das populações.

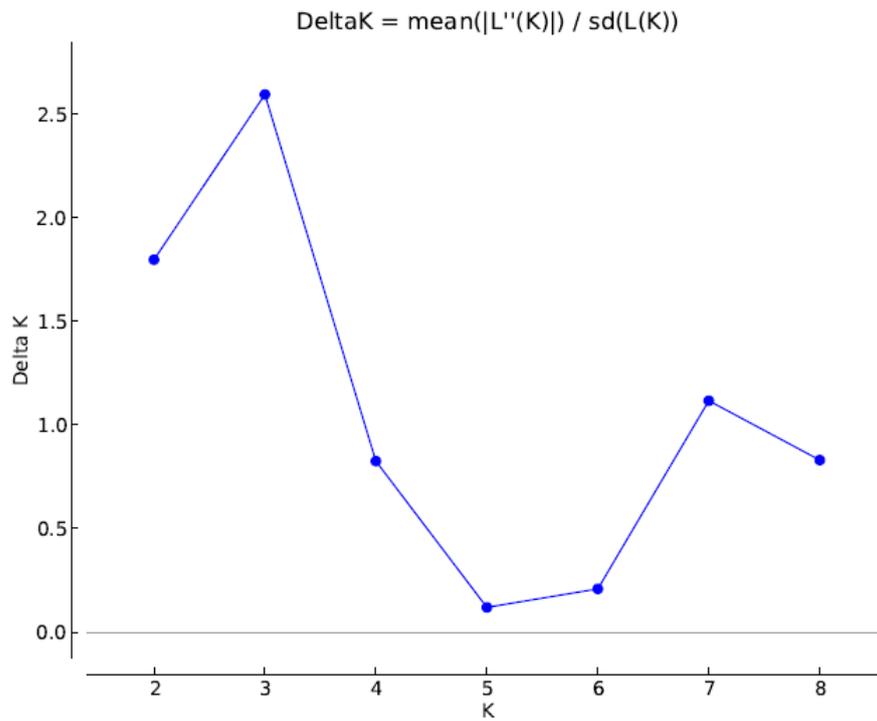


Figura 7: Gráfico de Evanno indicando o melhor cenário de K (K=3), de acordo com a variação da verossimilhança de k.

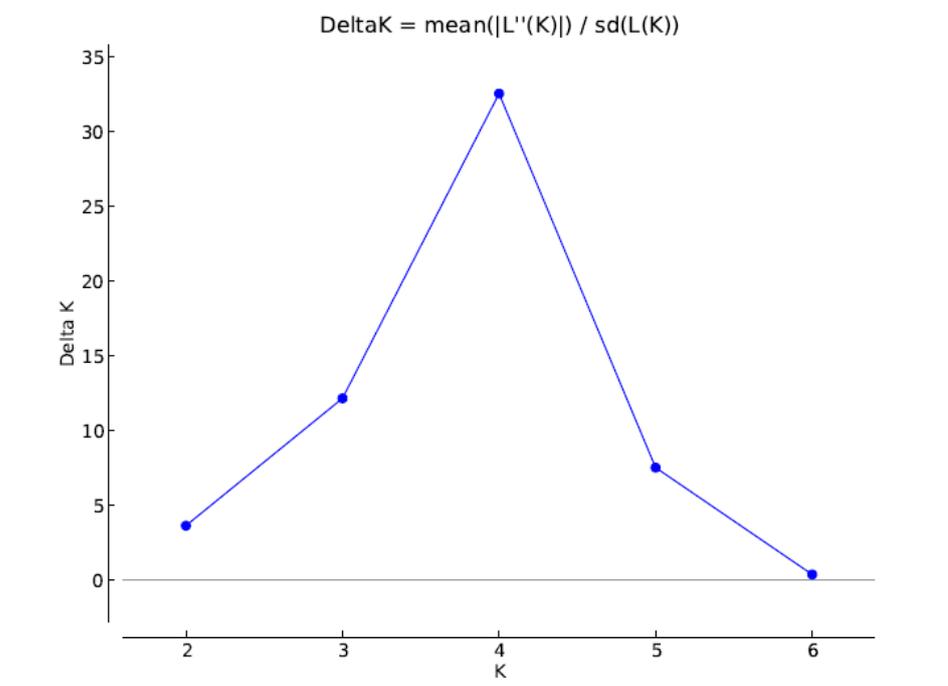


Figura 8: Gráfico de Evanno indicando o melhor cenário de K (K=4), de acordo com a variação da verossimilhança de k.

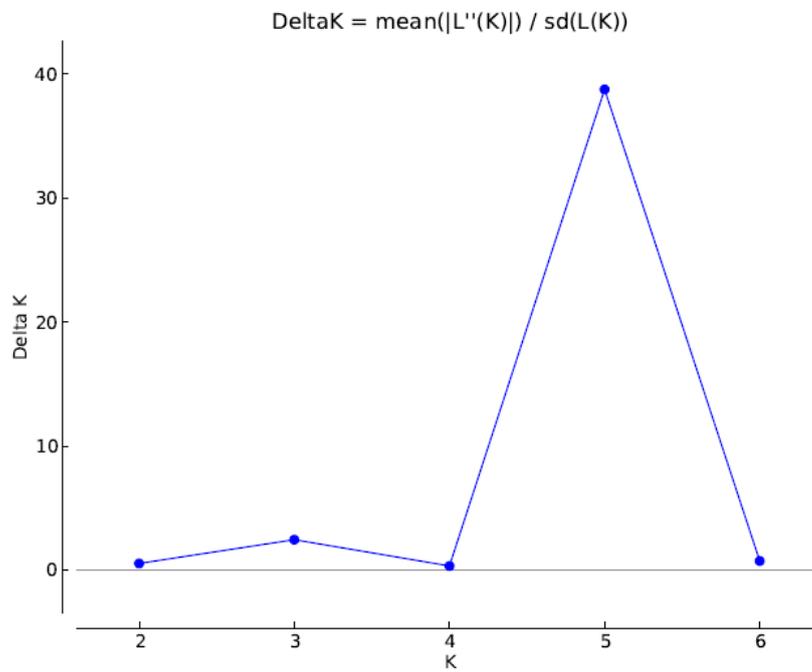


Figura 9: Gráfico de Evanno indicando o melhor cenário de K (K=5), de acordo com a variação da verossimilhança de k.