



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA,
CONSERVAÇÃO E BIODIVERSIDADE



**EFEITOS DA DISTÂNCIA DE CRUZAMENTOS SOBRE O SUCESSO
REPRODUTIVO E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL EM UMA ESPÉCIE
DE VEREDA**

JÉSSYCA SANTANA DOS SANTOS

Dr. Paulo Eugênio Oliveira
Orientador
Instituto de Biologia

Dr^a. Rafaela Cabral Marinho
Coorientadora
Instituto de Biologia

UBERLÂNDIA - MG

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA
CONSERVAÇÃO E BIODIVERSIDADE



**EFEITOS DA DISTÂNCIA DE CRUZAMENTOS SOBRE O SUCESSO
REPRODUTIVO E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL EM UMA ESPÉCIE DE
VEREDA**

JÉSSYCA SANTANA DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Biodiversidade, Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Dr. Paulo Eugênio Oliveira
Orientador
Instituto de Biologia

Dr^a. Rafaela Cabral Marinho
Coorientadora
Instituto de Biologia

UBERLÂNDIA - MG

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S237e Santos, Jéssyca Santana dos, 1996-
2022 Efeito da distância de cruzamentos sobre o sucesso reprodutivo e estrutura genética populacional em uma espécie de vereda [recurso eletrônico] / Jéssyca Santana dos Santos. - 2022.

Orientador: Paulo Eugênio Alves Macedo Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Biodiversidade.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.5071>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ecologia. I. Oliveira, Paulo Eugênio Alves Macedo, 1959-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Biodiversidade. III. Título.

CDU: 574

André Carlos Francisco
Bibliotecário - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e
 Biodiversidade

Av. Pará, 1720, Bloco 2D, Sala 26 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38405-320
 Telefone: (34) 3225-8641 - www.ppgeco.ib.ufu.br - ecologia@umuarama.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ecologia, Conservação e Biodiversidade				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, número 315, PPGECB				
Data:	dezenove de agosto de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	[hh:mm]
Matrícula do Discente:	12012ECR008				
Nome do Discente:	Jessyca Santana dos Santos				
Título do Trabalho:	Efeito da distância de cruzamentos sobre o sucesso reprodutivo e estrutura genética populacional de <i>Costus spiralis</i>				
Área de concentração:	Ecologia				
Linha de pesquisa:	Ecologia vegetal				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Alternativas reprodutivas, interações bióticas e diversidade funcional no Cerrado				

Reuniu-se por videoconferência a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Biodiversidade assim composta pelos doutores Vinicius Lourenço Garcia de Brito - INBIO/UFU; Ana Paula de Souza Caetano - UFMT e Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira - INBIO/UFU, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira, apresentou a Comissão Examinadora e o(a) candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao(à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do(a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as) que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/08/2022, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius Lourenço Garcia de Brito, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/08/2022, às 12:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula de Souza Caetano, Usuário Externo**, em 19/08/2022, às 17:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3781827** e o código CRC **7C2F2772**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA CONSERVAÇÃO E
BIODIVERSIDADE

EFEITOS DA DISTÂNCIA DE CRUZAMENTOS SOBRE O SUCESSO
REPRODUTIVO E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL EM UMA ESPÉCIE
DE VEREDA

JÉSSYCA SANTANA DOS SANTOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente (Orientador): Prof. Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo Oliveira
(Universidade Federal de Uberlândia)

Examinadora externa
Prof. Dra. Ana Paula de Souza Caetano
(Universidade Federal do Mato Grosso-UFTM)

Examinador interno
Prof. Dr. Vinícius Lourenço Garcia Brito
(Universidade Federal de Uberlândia-UFU)
Suplente

Dr. João Fernandes Custódio
(Universidade Federal de Uberlândia-UFU)

Dissertação aprovada em 19/08/2022

UBERLÂNDIA - MG

2022

AGRADECIMENTOS

Adupé a todos os orixás e a ancestralidade que permitiu a realização desse sonho, minha alma preta e feminina agradece a cada caminho aberto, proteção e ensinamento. Ya mi Yemonja que me ensinou a nadar entre todas as turbulências de um mar agitado, mas também nas águas tranquilas, adupé por ser fazer presente durante todo o processo. Gostaria de agradecer também aos minha família por me apoiar nessa caminhada em meio a uma pandemia. Ao meu padrinho que não se faz mais presente orún, vítima da covid-19. Ao meu companheiro Yuri por ser a minha rede de apoio e estar sempre comigo, me dando suporte nas minhas decisões. Aos meu amigos que me ajudaram durante o trabalho de campo, compilação dos dados, suporte emocional e boas conversas que renderam muitos aprendizados. E aos meus orientadores Paulo e Rafaela que aceitaram e me apoiaram durante toda essa etapa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRAT	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
CAPÍTULO 1:.....	10
O EFEITO DA DISTÂNCIA DE CRUZAMENTO NO SUCESSO REPRODUTIVO DE <i>Costus spiralis</i>	10
INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODOS	12
Área de estudo.....	12
Espécie Modelo.....	13
Desenho experimental dos cruzamentos	14
Avaliação dos frutos e sementes	15
Análise Estatística	15
RESULTADOS	15
Formação de frutos e número de sementes	17
Peso das sementes	20
DISCUSSÃO	24
REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 2:.....	36
TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS MICROSSATÉLITES DE <i>Costus scaber</i> (Ruiz e Pav) e <i>C. pulverulentus</i> PARA <i>Costus spiralis</i> (Jacq) Roscoe, UMA ESPÉCIE DE VEREDA	36
INTRODUÇÃO	37
MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
Área de estudo.....	39
Procedimentos Laboratoriais.....	39
Análise de dados	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	46

CONCLUSÕES GERAIS.....	50
------------------------	----

RESUMO

As veredas possuem grande relevância já que estão diretamente associadas ao afloramento do lençol freático. Mudanças no uso da terra como o avanço das atividades agropecuárias, podem alterar as características desses ambientes contribuindo para uma rápida degradação. Em alguns casos as espécies expressam estratégias para reprodução afim de maximizar o sucesso reprodutivo em ambientes como o de vereda. O sucesso reprodutivo pode ser influenciado a diversos fatores, entre eles, o fluxo polínico (modulado pela vagilidade dos polinizadores e distância espacial) e pela diversidade genética (distância genética e fatores como depressão de endogamia e alogamia). Para isso, os marcadores moleculares temsido uma ferramenta importante nos estudos variabilidade genotípica e fluxo gênico em populações naturais de plantas. Com isso, estudos genéticos voltados para plantas do cerrado ,podem ajudar a entender e mensurar os fatores evolutivos que atuaram e atuam neste bioma. Pressupõe-se que o tipo de polinização e a ocorrência em ambientes hidromórficos de veredas podem estar associados à estrutura genética. O fluxo de póle nem *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe, típicos de áreas mais úmidas, deve ser garantido pela capacidade dos beija-flores de voar a longas distâncias em ambientes lineares de veredas. Para avaliar o efeito da distância foram realizados cruzamentos a diferentes distâncias e analisado o sucesso reprodutivo. Utilizamos primers microsatelites para análise da diversidade genética para *Costus spiralis*. Para tanto, testamos a transferabilidade de primers SSR desenvolvidos para espécies congenéricas e selecionamos aqueles efetivamente amplificados e que se mostraram polimórficos para a população estudada. Neste estudo, observamos que *Costus spiralis* é uma espécie autocompatível, que apresenta maior sucesso reprodutivo com a polinizaçãoa curtas distâncias entre o doador e o receptor, oque é corroborado pelos dados preliminares do segundo capítulo, que indicam uma variabilidade genética maior dentro dos agrupamentos de plantas (distâncias menores que 60m) do que entre plantas mais distantes. Pode-se concluir que o polinizador transporta de forma eficiente os genes, de modo a não haver diferenças entre as regiões selcionadas da vereda.

Palavras-chave: Diversidade genética; distância espacial de cruzamento; sucesso reprodutivo e veredas.

ABSTRAT

The vereda palm swamps have great relevance as they are directly associated with the upwelling of the water table. Changes in land use, such as the advance of agricultural activities, can change the characteristics of these environments, contributing to rapid degradation. In some cases, plant species shows strategies for reproduction in order to maximize reproductive success in environments such as vereda. Reproductive success can be influenced by pollen flow (modulated by pollinator vagility and spatial distance) and by genetic diversity (genetic distance and factors such as inbreeding depression and allogamy). Genetic studies with Cerrado plants can help to understand and measure the evolutionary factors that act in this biome, such as molecular markers experiments that have been an important tool in the studies genotypic variability and gene flow in natural plant populations . The underlying idea is that the type of pollination and their occurrence in hydromorphic environments of veredas may be associated with different genetic structures. Thus, the pollen flow in *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe, a typical plant of such humid areas, must be assured by the hummingbirds' ability to fly long distances in linear vereda environments. To assess the effect of distance on reproductive patterns, hand cross pollinations were performed at different distances and reproductive success was analyzed. We used microsatellite markers (SSR) to analyze genetic diversity for *Costus spiralis*. To do so, we tested the transferability of primers developed for other species of the same genus and selected the effectively amplified and polymorphic ones to evaluate the population structure. In this study, we observed that *Costus spiralis* is a self-compatible species, which presents greater reproductive success after pollination among plants in a given cluster (less than 60m distant) than between plants further away. This was corroborated by the preliminary data of the second chapter, which indicated a greater genetic variability within clusters. than between them. We conclude that the hummingbird pollinators efficiently transports the genes, so that there were no differences between the selected clusters along the studied Vereda.

Keywords: Genetic diversity, crossing spatial distance, reproductive success, Palm swamps, Cerrado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 -** Área da vereda presente no Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU). Os cruzamentos realizados a diferentes distâncias (destacadas em metros: 800m, 1300m e 2000m) foram marcados por setas laranjadas entre as 3 áreas destacadas (A, B e C).....13
- Figura 2 -** Morfologia e estrutura das flores de *Costus spiralis*, vista frontal de uma flor (A) Início de abertura e maturação dos frutos, (B) fruto, (C) flor, (D) posição dos órgãos reprodutivos na flor, onde o estigma encontra-se entre as anteras, facilitando a autopolinização, (E) inserção da flor na inflorescência, (F) vista lateral da flor, (G) e após a abertura do botão, sem polinização, (H) *Costus spiralis*, logo após a polinização realizada pelo beija-flor.....16
- Figura 3 -** Foto retirada em campo, *Eupetomena macroura* apoiado em um galho de árvore logo acima dos clusters de *Costus spiralis*.....17
- Figura 4 -** Área da vereda presente no Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU), áreas de coleta de material biológico para extração de DNA . Imagem retirada do google earth e editada manualmente.....41
- Figura 5 -** A e B mostram detalhes da espécie de planta *Costus spiralis*. A: Inflorescência com duas flores abertas. B: Indivíduo de *C. spiralis* na vereda da reserva do Clube Caça e Pesca Itororó. As imagens C e D mostram o resultado da amplificação do primer D9. C: Teste de amplificação a 60° C com excesso de bandas inespecíficas. D: Teste de amplificação a 60,5° C com apenas as bandas específicas definidas a partir do tamanho descrito por Kay (2011).42
- Gráfico 1-** Resultados dos testes de polinizações controladas a diferentes distâncias geográfica (tratamentos) em *Costus spiralis* (Costaceae) na Reserva Ecológica do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, MG. Porcentagem de frutos formados entre os tratamentos nos anos de 2021 e 2022.....18
- Gráfico 2 -** Peso das sementes (massa em gramas) provenientes dos frutos das polinizações realizadas em *Costus spiralis* (Costaceae), em 2021, na vereda da Reserva Ecológica do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, MG. Polinização natural, cruzamento a 10 metros, cruzamento a 60 metros, cruzamento realizados 800, cruzamentos realizados a 1300 e 2000 metros respectivamente.....21
- Gráfico 3 -** Peso das sementes (massa em gramas) dos frutos dos tratamentos de polinização realizadas em *Costus spiralis* (Costaceae), em 2022, na vereda da Reserva Ecológica do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, MG.

Polinização natural, cruzamentos de autopolinização, cruzamento a 10 metros, cruzamento a 60 metros, cruzamento realizados 800 e 2000 metros respectivamente.....22

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Número de frutos formados a partir de polinização cruzada a diferentes distâncias no ano 2021, polinizações manuais (10m, 60m, 800m, 1300m, 2000m e polinização natural) em *Costus spiralis* (Costaceae). Análise de regressão logística foi utilizada par a par para avaliar diferenças entre os tratamentos, tendo apresentado valores significativos no tratamento de 10 metros quando comparado com a 2000m, e polinização natural quando comparado aos demais tratamentos (valores em negrito) $P < 0,05$19
- Tabela 2 -** Número de frutos formados a partir de polinização cruzada a diferentes distâncias no ano 2022, polinizações manuais (Autopolinização, 10m, 60m, 800m, 2000m e polinização natural) em *Costus spiralis* (Costaceae). Análise de regressão logística foi utilizada par a par para avaliar diferenças entre os tratamentos, tendo apresentado valores significativos no tratamento de 10 metros quando comparado com a 800m, e polinização natural quando comparado aos demais tratamentos (valores em negrito) $P < 0,05$20
- Tabela 3 -** Peso das sementes formadas a partir de polinização cruzada em cada tratamento com diferentes distâncias geográficas em *Costus spiralis* (Costaceae) no ano 2021. Análise utilizada para avaliar as diferenças entre os tratamentos foi o GLM distribuição gamma, com o pós-hoc para comparação par a par, onde os valores significativos estão marcados de azul na tabela e apresentaram $P < 0,05$23
- Tabela 4 -** Peso das sementes formadas a partir de polinização cruzada em cada tratamento com diferentes distâncias geográficas em *Costus spiralis* (Costaceae) no ano 2022. Análise utilizada para avaliar as diferenças entre os tratamentos foi o GLM distribuição gamma, com o pós-hoc para comparação par a par, onde os valores significativos estão marcados de azul na tabela e apresentaram $P < 0,05$24
- Tabela 5 -** Loci testados, temperaturas utilizadas e o tamanho de bandas. TeA = Temperatura de anelamento; TaB = Tamanho de banda; Trans = Transferibilidade.....44
- Tabela 6 -** Análise de variância molecular (AMOVA) nas 4 subpopulações de *C. spiralis* localizadas na área de vereda pertencente à Reserva Particular do Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU).....45

1 INTRODUÇÃO GERAL

2
3 No Brasil as veredas são consideradas zonas úmidas que ocorrem comumente no
4 domínio do Cerrado (Ribeiro & Walter 1998), e possuem grande relevância para o bioma, uma
5 vez estão diretamente associadas ao afloramento do lençol freático (Ribeiro & Walter 1998).
6 Essas zonas úmidas criam fisionomias vegetais lineares que aparecem sobre solos com alto teor
7 de matéria orgânica e com umidade variando em gradientes que vão desde áreas
8 permanentemente inundadas até regiões onde o solo é mais seco. A vegetação desta
9 fitofisionomia é adaptada a estas condições hidromórficas, que podem ser permanentes ou
10 sazonais, e é tipicamente composta por um estrato herbáceo-arbustivo, com agrupamentos da
11 palmeira buriti (*Mauritia flexuosa*) nas áreas de alagamento permanente (Ribeiro e Walter
12 2008). O gradiente topográfico e as zonas de umidade do solo criam um mosaico de micro-
13 habitats com peculiaridades florísticas e estruturais, justificando o alto número de espécies
14 endêmicas encontrado nessas áreas (Oliveira et al. 2009, Kurtz et al. 2013, Nogueira 2022).
15 Esse alto grau de endemismo e os fatores ambientais ressaltam a singularidade das veredas e
16 reforça sua importância não só na manutenção da diversidade vegetal, mas como fontes
17 essenciais de abrigo, alimento e local de reprodução da fauna do Cerrado (Carvalho 1991). Para
18 além disto, as veredas são de grande relevância para a provisão e manutenção dos recursos
19 hídricos do Cerrado, estando associadas as nascentes de importantes rios do bioma (Araújo et
20 al. 2002, Oliveira et al. 2009)

21 As veredas são ecossistemas sensíveis que apresentam baixa resiliência a distúrbios
22 antrópicos (Meirelles et al. 2004), e estão inseridas na legislação ambiental brasileira como
23 “Áreas de Preservação Permanente” (Kurtz et al., 2013, 2015). Apesar da proteção legal, essas
24 áreas continuam sendo negligenciadas e vem sofrendo constante degradação. Mudanças no uso
25 da terra como, por exemplo, o avanço das atividades agropecuárias, supressão de vegetação
26 para construção de estradas e canais de drenagem podem alterar os níveis de umidade,
27 características do solo, os padrões de heterogeneidade ambiental e composição da vegetação,
28 contribuindo para uma rápida degradação desses ambientes (Araújo et al. 2002). Quando
29 associadas às mudanças climáticas as degradações desses ambientes provocam alterações no
30 regime de água e diminuição do nível do lençol freático levando à seca das áreas de vereda
31 (Oliveira et al., 2014, 2015, 2017, Avila et al., 2016). Como resultado dessas alterações, a
32 invasão de espécies exóticas tem se tornado algo cada vez mais comum (Junk et al. 2014), além

33 do domínio de espécies pioneiras e uma alta expansão de espécies arbóreas de cerrado nas áreas
34 abertas de vereda, levando assim a perda de suas características iniciais (Nunes et al. 2022).

35 Neste contexto, as plantas de veredas apresentam estratégias de reprodução que
36 maximizam o sucesso reprodutivo nesses ambientes (Batista e Biachetti 2003, Maciel et al.
37 2016, Cardoso e Oliveira, Dias 2018). Algumas plantas apresentam flores hermafroditas e um
38 sistema de autocompatibilidade que permite que os gametas presentes no grãos de pólen
39 fecundem os óvulos de uma mesma flor e produzam sementes viáveis. Plantas autoférteis
40 parecem ser comuns em ambientes de veredas (Ramirez & Brito 1990), e garantem a produção
41 de frutos e sementes e a segurança reprodutiva mesmo na ausência de polinizadores e fluxo de
42 pólen mais amplo (Villegas 2020). Por outro lado, o sucesso reprodutivo muitas vezes não
43 depende somente do fluxo de pólen e da disponibilidade dos gametas para potencializar o
44 sucesso reprodutivo. Mesmo plantas autoférteis vão ser beneficiadas por vetores que realizem
45 um efetivo serviço de polinização, que na maioria das vezes funciona como um sistema de troca
46 entre planta e polinizador, sendo vantajosa para ambos (Justino et al. 2012). O polinizador
47 otimiza o fluxo polínico e, em contrapartida, a planta fornece recursos florais, nutritivos ou
48 energéticos, que permitem a sobrevivência dos animais polinizadores. Então, mesmo em
49 plantas autoférteis e relativamente independentes dos serviços de polinização, na prática a
50 disponibilidade desses vetores e de recursos energéticos podem potencializar as interações e
51 garantir o sucesso reprodutivo das plantas (Sletvold 2012, Villegas 2020). Dentre as várias
52 consequências do sucesso reprodutivo, a evolução, continuidade e a conservação dos genes na
53 prole são as mais importantes (Moza e Bhatnagar 2007).

54 Os serviços de polinização vão afetar o fluxo de pólen entre plantas. A deposição de
55 pólen pode acontecer entre plantas vizinhas ou distantes, entre flores dentro de um mesmo
56 indivíduo ou até mesmo dentro da mesma flor (Jersáková & Johnson 2006, Cardoso et al. 2018,
57 Villegas 2020). Logo, quando essa movimentação do pólen ocorre a curtas distâncias,
58 associado a uma dispersão local das sementes, há um aumento na probabilidade de ocorrência
59 de cruzamentos entre indivíduos vizinhos. Tal movimentação pode acarretar em depressão por
60 endogamia ou consanguinidade, devido o parentesco entre os indivíduos próximos e a
61 possibilidade de expressão de genes deletérios (Price e Waser 1979, Villegas 2020). Por outro
62 lado, a movimentação de pólen entre indivíduos muito distintos geneticamente pode ocasionar
63 outros problemas, como isolamento reprodutivo devido à distância. Os problemas decorrentes
64 do cruzamento entre indivíduos muito distintos geneticamente são denominados depressão por
65 exogamia/alogamia (Price e Waser 1979). Aparentemente a alta heterozigosidade pode levar a

66 diminuição do sucesso reprodutivo, afetando uma ou mais características fenotípicas e ou
67 genotípicas (Lynch 1991, Frankam et al. 2002). Dessa maneira, a estrutura genética
68 populacional pode afetar o sucesso reprodutivo das plantas de maneira mais ou menos
69 independente do fluxo de pólen e dos serviços de polinização (Waser e Price 1989, 1994). Isto
70 implica que, mesmo garantidas as condições para o fluxo de pólen, a estrutura genética das
71 plantas envolvidas pode afetar o sucesso reprodutivo.

72 Estudos genéticos com plantas do Cerrado podem ajudar a entender e mensurar os
73 fatores evolutivos que atuaram e atuam no bioma, além de apresentar dados para subsidiar a
74 criação de medidas para conservá-lo (Buzatti 2012). Os marcadores moleculares tem sido uma
75 ferramenta importante nos estudos variabilidade genotípica e fluxo gênico em populações
76 naturais de plantas (Provan et al. 2001, Kalia 2011). Os microssatélites (SSR) são um tipo de
77 marcador molecular que apresenta repetições em tandem de 1 a 6 nucleotídeos encontrados com
78 frequência nos genomas, e são muito utilizados em trabalhos de genética populacional devido
79 aos seus atributos, tais como hipervariabilidade, natureza multialélica, herança codominante,
80 reprodutibilidade abundância relativa, que auxiliam na caracterização da diversidade genética
81 em plantas (Parida et al. 2009 e Kalia 2011). Além da diversidade, os SSR podem auxiliar em
82 análise de paternidade, construção de mapas genômicos, tamanho da população, parentesco
83 entre outros (Selkoe 2006, Parida et al. 2009). Estes marcadores moleculares podem ser
84 utilizados para estimar a similaridade-dissimilaridade genética entre plantas e explicar
85 processos de depressão de endogamia e alogamia (Parida et al. 2009 e Kalia 2011).

86 *Costus spiralis* é frequentemente encontrada em áreas de vereda onde os beija-flores são
87 os visitantes florais e polinizadores mais importantes, contribuindo com o fluxo de pólen e
88 produção de sementes. Apesar de autocompatível/autofértil a espécie é beneficiada pelas visitas
89 dos beija-flores e depende deles para a produção de frutos, já que tem mecanismos morfológicos
90 para evitar autogamia (autopolinização automática). Mais do que simplesmente afetar a
91 produção das sementes de *Costus spiralis*, os serviços de polinização realizados pelos beija-
92 flores aparentemente resultam em sementes com maior vigor e capacidade de crescimento
93 quando comparadas mesmo às sementes resultantes de polinizações cruzadas manuais (Araújo
94 e Oliveira 2007). Os autores sugerem que o fluxo de pólen mais heterogêneo e a maiores
95 distâncias poderia explicar as diferenças de vigor.

96 A partir disto, o objetivo deste trabalho é testar o efeito de cruzamentos realizados entre
97 indivíduos a diferentes distâncias para o sucesso reprodutivo em uma população *Costus spiralis*,
98 evidenciando os possíveis efeitos de depressão endogâmica ou alogâmica. Além disso, este

99 trabalho tem o objetivo avaliar a variabilidade genética da população desta espécie modelo
100 utilizando marcadores moleculares codominantes (SSR – Sequências Simples Repetidas ou
101 microssatélites). Ainda, avaliar se as possíveis diferenças entre cruzamentos realizados a
102 distâncias diferentes poderiam ser explicadas pelas diferenças genéticas entre os indivíduos na
103 população.

104 Essa dissertação foi dividida em dois capítulos. O primeiro reuniu os experimentos
105 realizados em campo para confirmar os aspectos reprodutivos de *Costus spiralis* e avaliar os
106 efeitos das distâncias entre indivíduos no sucesso reprodutivo. O sucesso reprodutivo (fitness)
107 foi estimado pela produção de frutos e sementes, e pelo vigor da progênie resultante. Neste
108 sentido, o capítulo inicial pretendeu responder as seguintes perguntas: 1) A produção de frutos
109 varia com a distância espacial entre o doador e receptor de pólen? 2) Qual das distâncias
110 apresenta o maior sucesso reprodutivo? 3) A distância afeta apenas produção de frutos ou afeta
111 também o peso das sementes? Em relação a última questão o peso das sementes foi usado como
112 um proxy complementar para o sucesso reprodutivo. A ideia foi que o fluxo de pólen entre
113 indivíduos distantes pode não afetar a fecundidade em termos de produção de frutos, mas pode
114 afetar a qualidade e vigor das sementes formadas, o que poderia ser refletido no peso relativo
115 entre tratamentos de distâncias.

116 No capítulo seguinte, foram utilizados marcadores SSR para avaliar a similaridade-
117 dissimilaridade genética entre os indivíduos de *Costus spiralis* na mesma população. Os primers
118 de marcadores microssatélites (SSR), construídos para outras espécies do mesmo gênero foram
119 testados para transferibilidade e, posteriormente, usados para analisar a diversidade genética
120 da população amostrada ao longo da vereda. Neste capítulo, pretendeu-se responder as
121 seguintes perguntas: 1) É possível transferir marcadores microssatélites entre espécies
122 correlacionadas de *Costus*? 2) Essa transferibilidade apresenta marcadores polimórficos para
123 uso e análise da diversidade genética em *Costus spiralis*? 3) A variabilidade genética
124 encontrada na população estudada é comparável a outras espécies de *Costus* e a outras plantas
125 de vereda? 4) E, finalmente, se haveria uma correlação entre as distâncias espaciais e as
126 distâncias genéticas entre os indivíduos amostrados? Devido ao custo de construção de novos
127 marcadores microssatélites, uma série de estudos mostra que é viável a transferibilidade de
128 primers deste tipo de marcador entre espécies correlacionadas (Valderrama 2020) e isso
129 aumenta a capacidade de estudo da diversidade genética de espécies nativas.

130 Vários fatores ecológicos, reprodutivos e evolutivos podem interferir na diversidade
131 genética da população, como isolamento através de barreiras físicas e fenotípicas, presença de

132 polinizador e dispersor de semente, a autocompatibilidade, dentre outros. Isso ressalta a
133 necessidade de estudos específicos em espécies modelos como *Costus spiralis*, que apresenta
134 autocompatibilidade, polinização por beija-flores e é representativa de uma área que sofre
135 intensas ameaças a sua conservação, a vereda.
136

CAPÍTULO 1:

O EFEITO DA DISTÂNCIA DE CRUZAMENTO NO SUCESSO REPRODUTIVO DE *Costus spiralis*

1 INTRODUÇÃO

2
3 Devido à imobilidade das plantas, a maioria das espécies dependem de vetores bióticos
4 (polinizadores) para realização do fluxo polínico (Barrett 1998). No processo de forrageamento,
5 esses polinizadores são capazes de movimentar grãos de pólen de doadores a diferentes
6 distâncias, podendo aumentar o sucesso reprodutivo das plantas (Araújo e Oliveira 2007, Kropf
7 e Renner 2008). Assim, o fluxo de pólen é um dos mecanismos responsáveis pela
8 movimentação dos genes, e conseqüentemente, pela variabilidade genética dentro de uma
9 população de plantas. Quando baixo, o fluxo de pólen pode vir a afetar a distribuição e a
10 variabilidade genética populacional e associado a dispersão local, pode promover uma série de
11 efeitos deletérios (Charlesworth e Charlesworth 1999). Por outro lado, o fluxo de pólen e genes
12 pode evitar a fixação de genótipos especializados e a capacidade das plantas de sobreviver em
13 ambientes extremos (Jain 1976). Entender os fatores modulando o fluxo de pólen pode ser vital
14 para delinear estratégias de conservação.

15 O fluxo de pólen realizado por polinizadores é o grande responsável pela variabilidade
16 genética na população, uma vez que durante as visitas, ocorre a deposição de pólen pelas anteras
17 em partes do corpo do polinizador, que ao chegar em outra flor é capaz de depositar esse pólen
18 na superfície estigmática, garantindo a movimento do pólen de uma flor para outra (Rech et al.
19 2014). Neste sentido, pode-se pensar que quanto maior a distância espacial entre o receptor e o
20 doador de pólen, maior são as chances de que ocorra variabilidade genética (Waser 2000). As
21 espécies podem apresentar distâncias espaciais ótimas de polinização, sendo que alguns
22 trabalhos demonstram um efeito negativo com a redução da distância da fonte de pólen (Rigney
23 1995, Souto et al., 2002). Estes efeitos deletérios são comumente descritos como depressão de
24 endogamia e estariam associados à expressão de genes recessivos.

25 Por outro lado, a depressão por xenogamia ou alogamia pode acontecer quando os
26 indivíduos estão localizados a grandes distâncias espaciais, e com isso apresentam uma
27 adaptação fenotípica/genotípica a cada micro-habitat que estão inseridos. Essas adaptações
28 podem gerar diferenças que, quando acumuladas, podem levar a um isolamento reprodutivo
29 entre esses indivíduos distantes (Waser 2000).

30 Estudos realizados em algumas regiões do mundo têm mostrado que mesmo espécies
31 autocompatíveis podem ser limitadas no fluxo gênico, podendo ser influenciadas pela
32 efetividade/comportamento dos polinizadores (Waser & Price 1994). A singularidade dos
33 ambientes de veredas reforça a importância de entender os processos reprodutivos e a

34 interdependência dessas plantas com seus polinizadores, para considerações sobre políticas de
35 conservação.

36 O Cerrado brasileiro é conhecido como hotspot de biodiversidade (Strassburg 2017),
37 devido a alta diversidade de espécies, condições geográficas, climáticas e de disponibilidade de
38 água, que variam ao longo de toda a extensão do bioma. As veredas são formações que ocorrem
39 em solos hidromórficos, em áreas de emergência do lençol freático, que as distingue das demais
40 fitofisionomias conhecidas do Cerrado, e que selecionam a composição florística e as
41 características estruturais. Além dos recursos hídricos, as veredas apresentam uma flora
42 endêmica e uma grande diversidade beta (Silva et al. 2018). Esses recursos ambientais, como
43 solos hidromórficos, com grande quantidade de matéria orgânica e afloramento de lençol
44 freático, podem selecionar uma série de adaptações locais nos indivíduos. Mas apesar do
45 endemismo associado a condições específicas de crescimento, as plantas de veredas, como as
46 espécies de Cerrado de uma maneira geral (Oliveira & Gibbs 2002, Rechet al. 2014), necessitam
47 dos serviços de polinização biótica para produção de frutos e sementes. Apesar dos estudos
48 ainda serem relativamente raros, a flora das veredas parece ser predominantemente
49 autocompatível/autofértil, mas depende de vetores bióticos para produção de frutos e sementes,
50 e capacidade de regeneração (Ramirez e Brito 1990).

51 *Costus spiralis* é uma espécie comum em áreas de veredas no triângulo mineiro. É uma
52 planta herbácea rizomatosa, com inflorescências chamativas polinizadas primariamente por
53 beija-flores. As flores têm antese diurna, são autocompatíveis e apresentam hercogamia de
54 aproximação, como um mecanismo para evitar a autopolinização espontânea (Araujo e Oliveira
55 2007). Essa espécie exibe uma distribuição agrupada, formando várias touceiras ao longo da
56 vereda, o que pode sugerir que a dispersão das sementes ocorra próximo à planta progenitora.
57 O principal polinizador de *C. spiralis* na região é o beija-flor *Phaethornis pretrei*, que visita de
58 forma sistemática às flores existentes em um grupo de indivíduos, e em seguida, migra para
59 outros agrupamentos. Esse comportamento pode ser benéfico para a planta, uma vez que, ao
60 apresentar rotas de forrageamento, o polinizador mantém o fluxo polínico e, conseqüentemente,
61 aumenta o número de grãos de pólen de doadores diferentes chegando ao estigma (Araujo e
62 Oliveira 2007). Os autores acreditam que esta diversidade polínica poderia explicar o maior
63 vigor encontrado nas sementes resultantes de polinizações mesmo quando comparadas às
64 sementes de polinizações cruzadas controladas.

65 Estudos mostram que a taxa de diversificação tem sido maior entre espécie polinizadas
66 por beija-flores do que nas polinizadas por abelhas (Valderrama 2020). Este parece ser o caso

67 de espécies Neotropicais de *Costus*, que apresentaram várias mudanças nas síndromes de
68 polinização ao longo do tempo, entre aves e insetos (entre abelhas e beija-flores), demonstrando
69 rápido isolamento ecológico e diversificação (Kayet al., 2005, Specht et al, 2012, Salzman et
70 al. al., 2015).

71 Diferentes tipos de polinização podem afetar o sucesso reprodutivo em *Costus*. Em
72 *Costus allenii* e *Costus laevis* as sementes provenientes de autopolinização, são menores do que
73 as de polinização cruzada (Schemske 1983, Araújo e Oliveira 2007). Além disso, a capacidade
74 de germinação varia com a qualidade e tipo de habitat, influenciando a aptidão das sementes
75 (Schemske 1983).

76 Em *C. spiralis*, os polinizadores parecem produzir sementes mais vigorosas mesmo
77 quando comparadas aquelas provenientes de polinizações manuais com até trinta metros de
78 distância entre o doador de pólen e o receptor (Araújo e Oliveira 2007). A distância e
79 heterogeneidade polínica parecem ter um efeito sobre a qualidade das sementes formadas.

80 Tendo em vista estas considerações, este estudo pretende avaliar o efeito de diferentes
81 distâncias do doador de pólen para o sucesso reprodutivo em *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe
82 (Costaceae) uma espécie autocompatível e polinizada por beija-flores. Mais especificamente,
83 procurou-se responder as seguintes perguntas: 1) A produção de frutos varia com a distância
84 espacial entre o doador e receptor de pólen? 2) Existe uma distância que apresenta maior
85 sucesso reprodutivo? 3) A distância afeta apenas produção de frutos ou afeta também o peso
86 das sementes? Em relação a última questão o peso das sementes foi usado como um proxy
87 complementar para o sucesso reprodutivo. A ideia foi que o fluxo de pólen entre indivíduos
88 distantes pode não afetar a fecundidade em termos de produção de frutos, mas pode afetar a
89 qualidade e vigor das sementes formadas, o que poderia ser refletido no peso relativo entre
90 tratamentos de distâncias.

91

92 **MATERIAL E MÉTODOS**

93

94 *Área de estudo*

95

96 O presente estudo foi realizado em uma área de vereda pertencente à Reserva Particular
97 do Patrimônio Natural do Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU). A reserva do
98 CCPIU está localizada entre as coordenadas 48°18'06"O e 18°59'21"S e possui ca. 400 ha de
99 Cerrado, contemplando várias fitofisionomias do bioma. A área efetivamente protegida pela

100 RPPN é uma área de vereda com ca. 4km de entre extensão (Maruyama et al. 2013). O CCPIU
101 é marcado pela sazonalidade bem definida, com uma estação fria e seca a partir de maio a
102 setembro, e outro quente e chuvosa de outubro a abril (Köppen 1948).

103

104 **Figura 1.** Área da vereda presente no Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU). Os
105 cruzamentos realizados a diferentes distâncias (destacadas em metros: 800m, 1300m e 2000m)



106 foram marcados por setas laranjadas entre as 3 áreas destacadas (A, B e C).

107

108 *Espécie Modelo*

109

110 *Costus spiralis* é uma monocotiledônea, da família Costaceae, pertencente à ordem
111 Zingiberales. Possui o hábito de erva rizomatosa e apresenta inflorescência do tipo racemosa
112 com o formato de espiga. Essa espiga é envolvida por brácteas vermelhas sobrepostas,
113 desenvolvendo os botões florais, flores e frutos em seu interior. A maturação das flores e frutos
114 ocorre em espiral e cada indivíduo abre uma ou duas flores por dia no formato tubular. As flores
115 são vermelhas e possuem um estilete com fixação terminal posicionado entre as duas tecas da
116 antera. O estigma é bilobulado e úmido, apresentando um dos lóbulos um pouco mais curto do
117 que o outro. Em sua morfologia, o estigma apresenta um apêndice dorsal que aparentemente
118 possui a função de se reposicionar após as visitas dos polinizadores. Esta espécie apresenta

119 hercogamia de movimento, que é a separação espacial dos órgãos reprodutivos com a
120 movimentação dos mesmos, durante os processos de deiscência (Araújo & Oliveira 2007). A
121 família Costaceae Nakai (Zingiberales) possui uma ampla distribuição pantropical totalizando
122 125 espécies representante dos gêneros Cheilocostus C. Specht, Chamaecostus C. Specht & D.
123 W. Stevenson, Costus L., Dimerocostus O. Kuntze, Monocostus K. Schumann, Paracostus C.
124 Specht e Tapeinochilos Miquel (Valderrama 2020, Stevens 2021). *C spiralis* é polinizada por
125 Beija-flores , porém a produção de nectar extra- floral faz com que suas inflorescências sejam
126 constantemente visitadas por formigas (Stevens 2021). Sua floração ocorre de Dezembro a
127 Março, tendo seu pico no mês de fevereiro e iniciando a frutificação em Junho no ano de 2021,
128 ao passo que em 2022 a floração teve início no final de Janeiro e se estendeu até Junho, tendo
129 seu pico em Fevereiro e Março, iniciando a frutificação em Julho.

130

131 *Desenho experimental dos cruzamentos*

132

133 Para averiguar o efeito da distância de cruzamentos no sucesso reprodutivo de *Costus*
134 *spiralis* foram realizados cinco tratamentos e cada tratamento correspondeu a uma distância
135 entre doador e receptor de pólen. As distâncias encontradas entre os grupos de indivíduos que
136 foram utilizadas para o cruzamento foram 10m, 60m, 800m, 1300m e 2000m. Os grãos de pólen
137 foram coletados no início da abertura da flor com auxílio de uma pinça e armazenados em
138 microtubos. Logo em seguida foram transportados até os outros pontos onde foram realizados
139 os demais cruzamentos, totalizando 200 flores (40 flores por cada tratamento) (Fig.1). As
140 inflorescências foram previamente ensacadas para evitar qualquer tipo de interferência externa
141 e os cruzamentos foram realizados de Dezembro de 2020 à Abril de 2021. Após a passagem do
142 fogo em Outubro de 2021, houve uma perda significativa da vegetação na área, inclusive da
143 espécie modelo deste trabalho. Com o início do período chuvoso as rebrotas tomaram força e
144 em Janeiro de 2022. Foram feitos novos cruzamentos que incluíram autopolinização (onde o
145 pólen de uma mesma flor foi colocado sobre o estigma), 60m, 800m, 2100m totalizando 320
146 cruzamentos em 2022, com 80 flores para cada tratamento/distância. Após a realização dos
147 cruzamentos, as inflorescências foram ensacadas novamente a fim de evitar qualquer
148 interferência externa até a formação dos frutos.

149

150 Durante os dois experimentos de campo, os tratamentos foram realizados em blocos
151 casualizados por indivíduo. Foram feitos todos os tratamentos de polinizações controladas em
152 números similares por indivíduo de maneira a evitar pseudoreplicação. Uma flor foi utilizada

152 como doadora de pólen e receptora de pólen de outra flor. Além das polinizações manuais
153 controladas, foram coletados frutos resultantes de polinizações naturais (em flores marcadas,
154 não isoladas e expostas à polinização aberta).

155

156 *Avaliação dos frutos e sementes*

157

158 Os frutos provenientes de cada tratamento foram coletados separadamente e levados
159 para o laboratório. Além do número de frutos, foram analisados o número de sementes formadas
160 e os pesos (massa em gramas) das sementes. Essas medidas foram realizadas com auxílio de
161 uma balança de precisão (BEL -ENGINEERING).

162

163 *Análise Estatística*

164

165 Para realização da análise comparativa da formação de frutos provenientes do
166 experimento de polinização a diferentes distâncias, foi utilizado o teste de regressão logística
167 par a par. De maneira a averiguar se houve diferença no peso das sementes entre os tratamentos,
168 foi utilizado o teste GLM família Gamma para o ano de 2021, já em 2022 foi utilizadoGamma
169 família Gaussian e para analisar os números de sementes por fruto, foi utilizado GLM família
170 binomial negativo utilizado nos dois anos. Depois de rodar os glms, foi utilizado um test pós
171 hoc para verificar a diferença par a par entre os tratamentos. O pacote utilizado para esse fim
172 foi o emmeans. Os melhores modelos foram selecionados pelo método de AIC usando a função
173 AICctab do pacote bbmle. Para as análises estatísticas foram utilizados os pacotes ‘lme4’ e ‘car’
174 e ‘ggplot2’ para construção dos gráficos. Todas as análises estatísticas foram conduzidas
175 usando o aplicativo R versão 4.0.2 (R Development Core Team, 2020).

176

177 **RESULTADOS**

178

179 *Costus spiralis* apresenta autocompatibilidade e devido à morfologia e posição dos
180 órgãos reprodutivos, a deposição de pólen do mesmo indivíduo pode vir a acontecer até mesmo
181 durante as visitas, uma vez que o pistilo de *C. spiralis* está posicionado entre as anteras, e a
182 estigma encontra-se um pouco acima (Figura 2). A corola tubular facilita o processo de retirada
183 e deposição dos grãos de pólen durante a visita, além de que esse processo de dispersão é feito
184 de forma agrupada, semelhante a uma nuvem de pólen. De qualquer forma, a hercogamia e a

185 estrutura do estigma requer visitas efetivas ou manipulação da flor para que ocorra a polinização
186 e produção de frutos. Flores ensacadas e deixadas sem manipulação nunca produziram frutos
187 como descrito por Araujo e Oliveira (2007).

188 Além do sistema de compatibilidade, esta espécie conta também com uma hercogamia
189 de aproximação relativamente pequena. Uma observação sistemática e direcionada aos
190 polinizadores não foi realizada,mas foi possível verificar que *Eupetomena macroura*, o
191 polinizador que realizou as visitas durante a realização dos experimentos, apresentou um
192 comportamento territorialista com outras espécies e até mesmo com outros indivíduos que
193 tentavam chegar próximo aos grupos de flores de *C. spiralis*. Quando não estavam visitando,
194 os indivíduos de *E. macroura* pousavam em galhos acima das flores e apresentavam uma
195 postura observadora, chegando a realizar voos próximos a cabeça dos pesquisadores, a medida
196 que chegávamos perto das inflorescências.

197



198 **Figura 2:** Morfologia e estrutura das flores de *Costus spiralis*, vista frontal de uma flor (A)
199 Início de abertura e maturação dos frutos, (B) fruto, (C) flor, (D) posição dos órgãos
200 reprodutivos na flor, onde o estigma encontra-se entre as anteras, facilitando a autopolinização,
201 (E) inserção da flor na inflorescência, (F) vista lateral da flor, (G) e após a abertura do botão,
202 sem polinização, (H)*Costus spiralis*, logo após a polinização realizada pelo beija-flor.

203

205
206
207
208
209
210
211
212
213
214



Figura 3:

216 Foto retirada em campo, *Eupetomena macroura* apoiado em um galho de árvore logo acima
217 dos clusters de *Costus spiralis*.

218

219 *Formação de frutos e número de sementes*

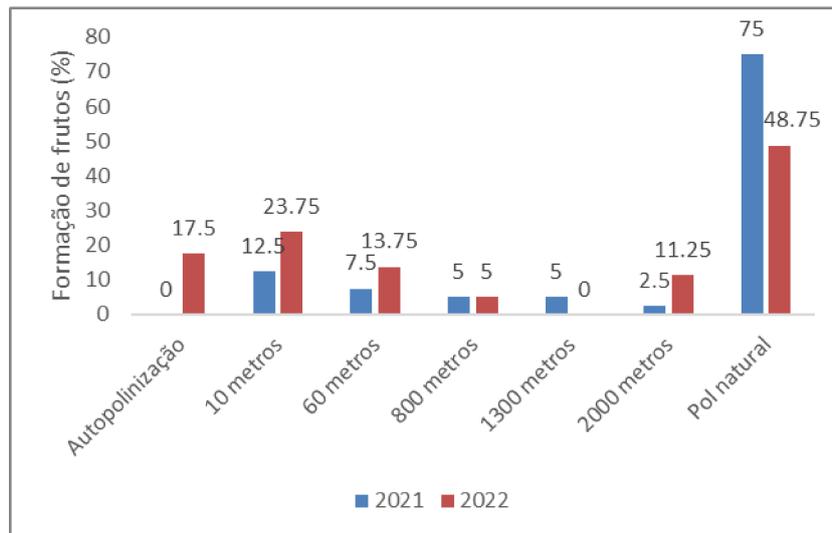
220

221 No ano de 2021, o desenvolvimento dos frutos deu-se por volta de quatro meses após a
222 realização dos tratamentos. O tratamento que resultou no maior número de frutos foi o da
223 distância de 10 metros totalizando 35% dos cruzamentos realizados, seguido por 60 metros com
224 12,5% dos frutos formados, 1300 metros com 7,5% e 800 metros com 5% de frutificação. A
225 menor taxa de frutificação foi a 2000 metros, onde somente ca. 2,5% dos cruzamentos resultou
226 em frutos. Em contrapartida as polinizações naturais, flores não ensacadas e expostas a
227 polinização pelos beija-flores e outros visitantes, atingiram 75% de frutificação.

228 No ano de 2022, foram realizados 80 cruzamentos por tratamento. As maiores taxas de
229 frutificação foram, em ordem decrescente, polinização natural com 48,5%, 10 metros com
230 23,75%, autopolinização com 17,5%, 60 metros 13,75%, 2000 metros com 11,25% de
231 frutificação, e a menor taxa de frutificação foi no tratamento de 800 metros com apenas 5%
232 (Figura 1).

233

234
235
236
237
238
239
240
241
242
243



244 **Gráfico 1:** Resultados dos testes de polinizações controladas a diferentes distâncias gerográfica
245 (tratamentos) em *Costus spiralis* (Costaceae) na Reserva Ecológica do Clube Caça e Pesca
246 Itororó de Uberlândia, MG. Porcentagem de frutos formados entre os tratamentos nos anos de
247 2021 e 2022.

248

249 No ano de 2021, o teste de regressão logística apontou que o tratamento de 10 metros
250 apresentou uma diferença significativa em relação à produção de sementes quando comparado
251 com tratamento de 2000m ($p < 0.05$). A polinização natural foi significativamente diferente de
252 todos os tratamentos, produzindo mais frutos que as polinizações manuais (10m, 1300m,
253 2000m, 60m, 800m respectivamente, $p < 0.05$) (Tabela 1). O número total de sementes obtidas
254 de cada tratamento foi 79 sementes provenientes do tratamento de 10 metros, 52 sementes do
255 tratamento de 60 metros, 25 sementes do tratamento de 800 metros, 10 sementes do tratamento
256 de 1300 metros e 4 sementes provenientes do tratamento de 2000 metros.

257 No ano de 2022, o teste de regressão logística apontou que o tratamento de 10 metros
258 novamente apresentou uma diferença significativa em relação à produção de sementes quando
259 comparado com tratamento de 800 metros ($p < 0.05$). A polinização natural foi
260 significativamente diferente de todos os tratamentos, produzindo mais frutos que as
261 polinizações manuais (10m, 1300m, 2000m, 60m, 800m, $p < 0.05$) (Tabela 2). O número total
262 de sementes obtidas de cada tratamento foi de 141 sementes provenientes do tratamento de
263 autopolinização, 176 sementes referentes ao tratamento de 10 metros, 98 sementes do
264 tratamento de 60 metros, 25 sementes do tratamento de 800 metros e 81 sementes provenientes
265 do tratamento de 2000 metros. Em 2022, após a passagem do fogo, houve o comprometimento
266 dos indivíduos localizados a 1300, portanto não foram realizados cruzamentos a essa distância.

267

268 **Tabela 1:** Número de frutos formados a partir de polinização cruzada a diferentes distâncias no
 269 ano 2021, polinizações manuais (10m, 60m, 800m, 1300m, 2000m e polinização natural) em
 270 *Costus spiralis* (Costaceae). Análise de regressão logística foi utilizada par a par para avaliar
 271 diferenças entre os tratamentos, tendo apresentado valores significativos no tratamento de 10
 272 metros quando comparado com a 2000m, e polinização natural quando comparado aos demais
 273 tratamentos (valores em negrito) $P < 0,05$.

Contraste		Estimativa	SE	df	Z.ratio	Valor P	
10m	-	1300m	1.893	0.686	Inf	2.761	0.0639
10m	-	2000m	3.045	1.066	Inf	2.857	0.049
10m	-	60m	1.327	0.582	Inf	2.281	0.2019
10m	-	800m	2.325	0.798	Inf	2.915	0.0414
10m	-	pol_nat	-1.718	0.493	Inf	-3.483	0.0066
1300m	-	2000m	1.151	1.177	Inf	0.978	0.9251
1300m	-	60m	-0.566	0.767	Inf	-0.738	0.9772
1300m	-	800m	0.432	0.942	Inf	0.459	0.9975
1300m	-	pol_nat	-3.611	0.703	Inf	-5.139	<.0001
2000m	-	60m	-1.718	1.12	Inf	-1.534	0.6423
2000m	-	800m	-0.719	1.246	Inf	-0.577	0.9925
2000m	-	pol_nat	-4.762	1.077	Inf	-4.424	0.0001
60m	-	800m	0.999	0.869	Inf	1.149	0.8606
60m	-	pol_nat	-3.045	0.602	Inf	-5.061	<.0001
800m	-	pol_nat	-4.043	0.812	Inf	-4.978	<.0001

274

275

276 **Tabela 2:** Número de frutos formados a partir de polinização cruzada a diferentes distâncias no
 277 ano 2022, polinizações manuais (Autopolinização, 10m, 60m, 800m, 2000m e polinização
 278 natural) em *Costus spiralis* (Costaceae). Análise de regressão logística foi utilizada par a par
 279 para avaliar diferenças entre os tratamentos, tendo apresentado valores significativos no
 280 tratamento de 10 metros quando comparado com a 800m, e polinização natural quando
 281 comparado aos demais tratamentos (valores em negrito) $P < 0,05$.

Contraste	Estimativa	SE	df	Z.ratio	Valor P
-----------	------------	----	----	---------	---------

10m	-	2000m	0.899	0.441	Inf	2.04	0.3196
10m	-	60m	0.67	0.418	Inf	1.604	0.5961
10m	-	800m	1.778	0.576	Inf	3.085	0.0249
10m	-	auto	0.384	0.394	Inf	0.974	0.9263
10m	-	pol_nat	-1.116	0.345	Inf	-3.236	0.0154
2000m	-	60m	-0.229	0.48	Inf	-0.477	0.9969
2000m	-	800m	0.879	0.623	Inf	1.411	0.7207
2000m	-	auto	-0.515	0.46	Inf	-1.119	0.8738
2000m	-	pol_nat	-2.015	0.419	Inf	-4.815	<.0001
60m	-	800m	1.108	0.607	Inf	1.826	0.4491
60m	-	auto	-0.286	0.438	Inf	-0.652	0.9869
60m	-	pol_nat	-1.786	0.394	Inf	-4.531	0.0001
800m	-	auto	-1.394	0.591	Inf	-2.357	0.1716
800m	-	pol_nat	-2.894	0.56	Inf	-5.172	<.0001
auto	-	pol_nat	-1.501	0.37	Inf	-4.06	0.0007

282

283

284 *Peso das sementes*

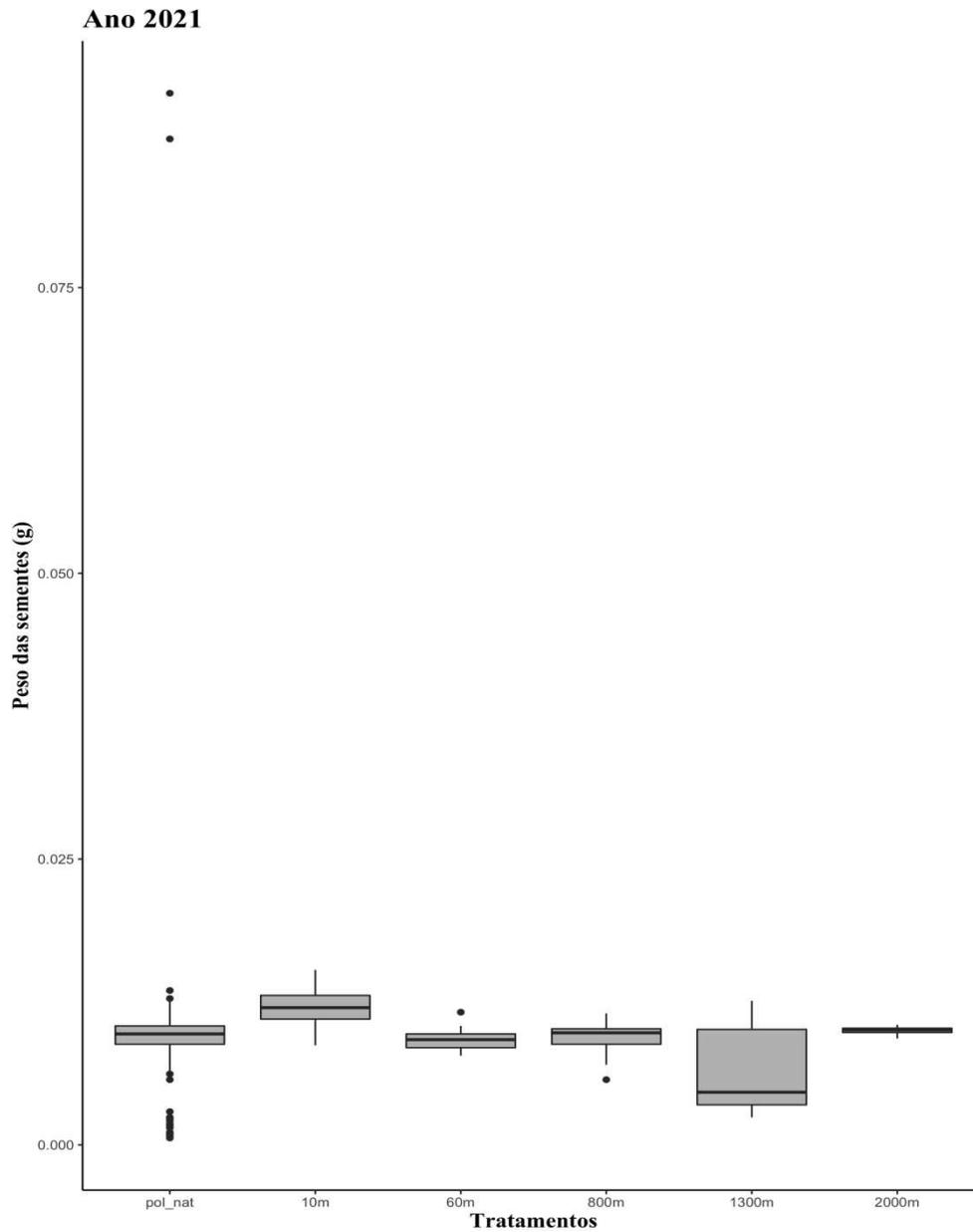
285

286 A média dos pesos das sementes provenientes da polinização do ano de 2021 foi
 287 respectivamente: tratamento de polinização natural - 0.0098g, 10 metros - 0.0121g, seguido por
 288 1300 metros - 0.0063g, 60 metros - 0.092g, 800 metros - 0.094g e 2000 metros - 0.0100g. No
 289 ano de 2022, a média dos pesos encontrados foi polinização natural (0.0117g), seguido por 10
 290 metros (0.0105g), 60 metros (0.0096g), autopolinização (0.0094g) 2000 metros (0.0094g) e 800
 291 metros com (0.0086g). No primeiro ano a maior média foi proveniente do tratamento de 10
 292 metros e a menor de 800 metros, já no segundo ano a maior média foi polinização natural e a
 293 menor média foi no 800 metros.

294 No ano de 2021 foi realizado também um teste GLM com distribuição gamma, para
 295 comparar peso das sementes em cada tratamento, a partir deste teste foi possível verificar uma
 296 diferença significativa entre o peso das sementes do tratamento de 10 metros, quando
 297 comparado a 60 metros e 1300 metros ($P < 0,05$). Outro tratamento que também obteve
 298 diferenças significativas foi da polinização natural quando comparado aos tratamentos de 10
 299 metros e 1300 metros ($P < 0,05$) (Tabela 3). Para o ano de 2022 as diferenças significativas
 300 foram entre 10 metros quando comparado aos tratamentos de autopolinização, 800 e 2000

301 metros ($P < 0,05$), e polinização natural quando comparado a todos os tratamentos de distâncias
302 ($P < 0,05$) (Tabela 4).

303

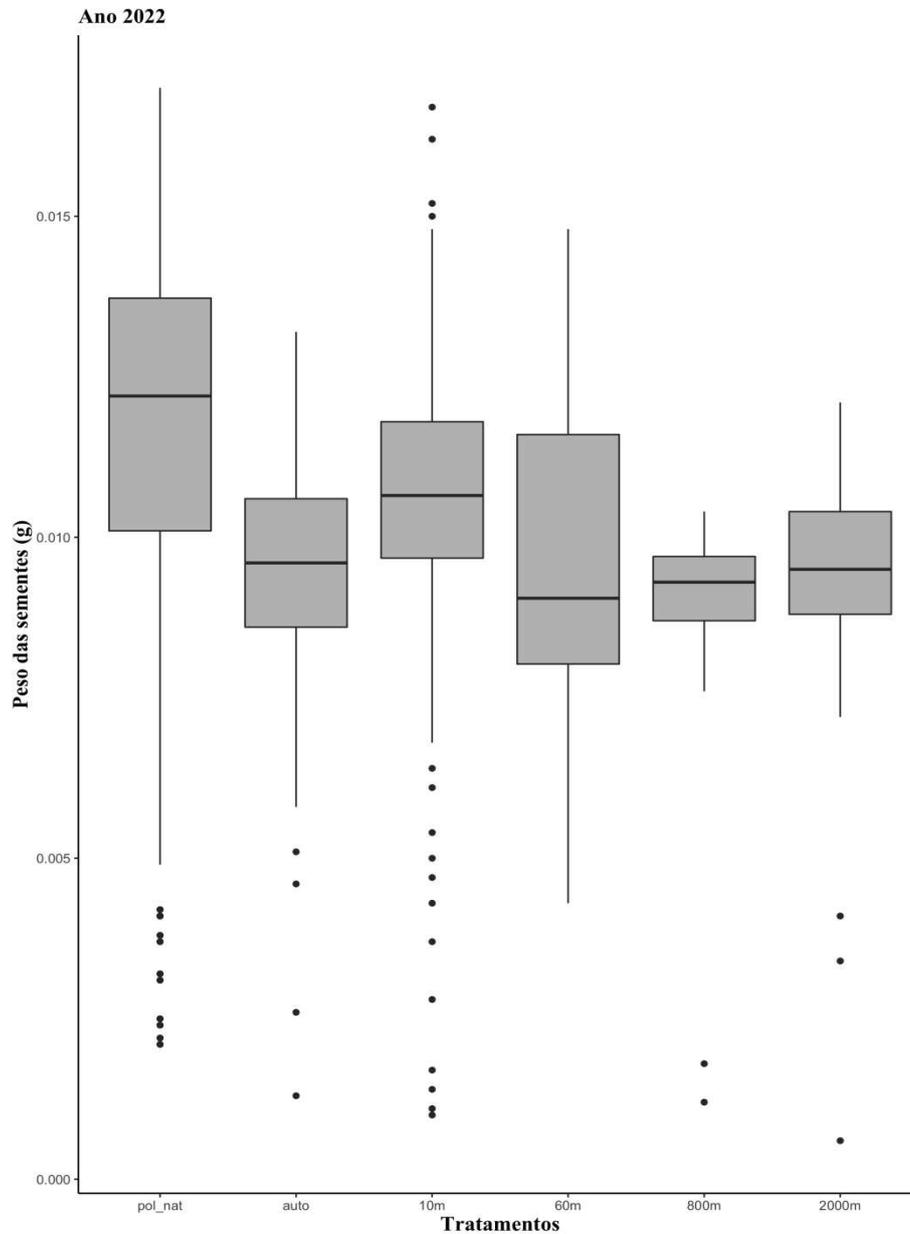


304

305 **Gráfico 2:** Peso das sementes (massa em gramas) provenientes dos frutos das polinizações
306 realizadas em *Costus spiralis* (Costaceae), em 2021, na vereda da Reserva Ecológica do Clube
307 Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, MG. Polinização natural, cruzamento a 10 metros,
308 cruzamento a 60 metros, cruzamentos realizados 800, cruzamentos realizados a 1300 e 2000
309 metros respectivamente.

310

311



313

314 **Gráfico 3:** Peso das sementes (massa em gramas) dos frutos dos tratamentos de polinização
 315 realizadas em *Costus spiralis* (Costaceae), em 2022, na vereda da Reserva Ecológica do Clube
 316 Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, MG. Polinização natural, cruzamentos de autopolinização,
 317 cruzamento a 10 metros, cruzamento a 60 metros, cruzamento realizados 800 e 2000 metros
 318 respectivamente.

319

320 **Tabela 3:** Peso das sementes formadas a partir de polinização cruzada em cada tratamento com
 321 diferentes distâncias geográficas em *Costus spiralis* (Costaceae) no ano 2021. Análise utilizada
 322 para avaliar as diferenças entre os tratamentos foi o GLM distribuição gamma, com o pós-hoc
 323 para comparação par a par, onde os valores significativos estão marcados de azul na tabela e
 324 apresentaram $P < 0,05$.

Contraste			Estimativa	SE	df	Z.ratio	Valor P
1300m	-	2000m	-0.00368	0.002491	Inf	-1.476	0.68
1300m	-	60m	-0.00287	0.00117	Inf	-2.452	0.1387
1300m	-	800m	-0.00312	0.001323	Inf	-2.356	0.172
1300m	-	auto	-0.00576	0.001117	Inf	-5.155	<.0001
1300m	-	pol_nat	-0.00345	0.000985	Inf	-3.507	0.006
2000m	-	60m	0.000807	0.002388	Inf	0.338	0.9994
2000m	-	800m	0.000558	0.002467	Inf	0.226	0.9999
2000m	-	auto	-0.00209	0.002363	Inf	-0.882	0.9508
2000m	-	pol_nat	0.000222	0.002303	Inf	0.096	1
60m	-	800m	-0.00025	0.001119	Inf	-0.223	0.9999
60m	-	auto	-0.00289	0.000865	Inf	-3.342	0.0108
60m	-	pol_nat	-0.00059	0.000685	Inf	-0.853	0.9573
800m	-	auto	-0.00264	0.001064	Inf	-2.485	0.1285
800m	-	pol_nat	-0.00034	0.000923	Inf	-0.363	0.9992
auto	-	pol_nat	0.002307	0.000591	Inf	3.903	0.0013

325

326 **Tabela 4:** Peso das sementes formadas a partir de polinização cruzada em cada tratamento com
 327 diferentes distâncias geográficas em *Costus spiralis* (Costaceae) no ano 2022. Análise utilizada
 328 para avaliar as diferenças entre os tratamentos foi o GLM distribuição gamma, com o pós-hoc
 329 para comparação par a par, onde os valores significativos estão marcados de azul na tabela e
 330 apresentaram $P < 0,05$.

Contraste			Estimativa	SE	df	Z.ratio	Valor P
10m	-	2000m	0.11217	0.0342	Inf	3.278	0.0134
10m	-	60m	0.08531	0.0314	Inf	2.718	0.0718
10m	-	800m	0.19273	0.0598	Inf	3.224	0.016
10m	-	auto	0.10615	0.0283	Inf	3.751	0.0024
10m	-	pol_nat	-0.1089	0.0215	Inf	-5.059	<.0001
2000m	-	60m	-0.02686	0.0391	Inf	-0.687	0.9834
2000m	-	800m	0.08056	0.0641	Inf	1.256	0.809
2000m	-	auto	-0.00602	0.0366	Inf	-0.164	1
2000m	-	pol_nat	-0.22107	0.0317	Inf	-6.975	<.0001
60m	-	800m	0.10742	0.0627	Inf	1.714	0.5226
60m	-	auto	0.02084	0.034	Inf	0.613	0.9902
60m	-	pol_nat	-0.19421	0.0286	Inf	-6.786	<.0001
800m	-	auto	-0.08658	0.0612	Inf	-1.415	0.718
800m	-	pol_nat	-0.30162	0.0584	Inf	-5.167	<.0001
auto	-	pol_nat	-0.21505	0.0252	Inf	-8.537	<.0001

331

332

333 DISCUSSÃO

334

335 As polinizações manuais controladas realizadas a distâncias diferentes em *Costus*
 336 *spiralis* resultaram numa maior formação de frutos e sementes em distâncias mais próximas e
 337 nas polinizações naturais. De maneira similar, as sementes foram em maior número e mais
 338 pesadas nos frutos resultantes de polinizações a distâncias menores e nas polinizações naturais.
 339 Estes resultados indicam que as polinizações entre indivíduos próximos parecem resultar num
 340 maior sucesso reprodutivo e que cruzamentos a distâncias maiores têm um efeito inverso,
 341 resultando em menos frutos e sementes menores. Os detalhes e as consequências destes
 342 resultados são discutidos abaixo.

343 *Costus spiralis* é uma espécie polinizada por beija flores e o presente trabalho partiu do
344 presuposto de que o número de frutos e sementes teria uma estreita relação com esses
345 polinizadores. Os resultados de polinização natural obtidos aqui confirmaram as observações
346 do estudo anterior (Araujo e Oliveira 2007) e foram similares até mesmo em termos
347 quantitativos. Porém a média do peso das sementes encontradas por Araujo e Oliveira (2007)
348 foi menor do que média encontrada no presente trabalho. Apesar da passagem do fogo entre os
349 anos de 2021 e 2022, a partir das análises é possível observar uma estabilidade reprodutiva para
350 *Costus spiralis*, uma vez que a média das sementes apresentou se estável, durante os dois anos.
351 Nas duas florações as taxas de formação de frutos foram maiores para as curtas distâncias de
352 reprodução, autopolinização, 10 e 60 metros. A passagem do fogo parece ter propiciado uma
353 maior taxa de frutificação a 2000 metros, possivelmente devido a mudanças nas condições num
354 grupo mais distante, que recebeu a maior parte das polinizações nessa distância no ano de 2022.
355 A queima libera grandes quantidades de nutrientes e estas plantas cresciam numa área que foi
356 particularmente queimada, o que explicaria o aumento no número de número de sementes no
357 ano 2022.

358 O estudo anterior observou que há diferenças significativas entre autopolinização e
359 polinização cruzada (onde os grãos pólen foram coletados a pelo menos 30 metros de distância
360 do receptor). Com isso, imaginamos que, em maiores distâncias, o sucesso das polinizações
361 cruzadas poderia ser até maior. Porém, os dados deste trabalho apesar de corroborar os
362 resultados encontrados por Araujo e Oliveira (2007) para autopolinização e distâncias menores,
363 não diferiu com as outras distancias maiores testadas. Isto implica que as curtas distâncias
364 reprodutivas tem um efeito positivo no sucesso reprodutivo de *Costus spiralis*.

365 Então como explicar o maior sucesso reprodutivo obtido para polinizações naturais tanto
366 no presente estudo quanto no estudo anterior? A ideia aventada por Araújo e Oliveira (2007)
367 era que os polinizadores, trazendo pólen de distâncias maiores, poderiam aumentar a
368 heterozigose e o vigor das sementes. Mas os cruzamentos a distâncias maiores feitos no presente
369 estudo resultaram em menos frutos e sementes sem diferenças significativas em termos de peso
370 que pudessem indicar diferenças de vigor. É possível que os beija-flores sejam mais eficientes
371 no processo de polinização que as polinizações experimentais realizadas. Mas não conseguimos
372 ver evidências claras de que as polinizações manuais fossem menos eficientes.

373 *Costus spiralis* foi visitada regularmente por beija flores ao longo dos dois anos do
374 estudo. *Eupetomena macroura* foi o principal polinizador avistado para a espécie,
375 diferentemente do observado por Araujo e Oliveira (2007) onde o principal polinizador foi o

376 *Phaethornis pretrei*. Araujo e Oliveira (2007) observaram que *Phaethornis pretrei* visita de
377 forma sistemática as flores existentes em um grupo de indivíduos, e em seguida, migra para
378 outros agrupamentos, o que favorece a dispersão de pólen a curtas distâncias. Mas *P. pretrei* é
379 descrito em outros estudos (e.g. Araújo et al 2018) como um beija-flor que visita flores num
380 comportamento de trap-line (linha de captura), o que poderia garantir o fluxo entre grupos
381 inclusive mais distantes de plantas de *Costus spiralis*. Por outro lado, o comportamento
382 territorialista do *Eupetomena macroura*, não somente implica em polinizações principalmente
383 entre plantas muito próximas, incluídas no território defendido, como ainda impede que outras
384 espécies de beija-flores visitem as plantas naquela área, afetando a dispersão dos grãos de pólen
385 e diminuindo a guilda de visitantes de *C. spiralis*.

386 Alguns estudos realizados com espécies de Cerrado mostraram que a floração em massa
387 e a distribuição aglomerada de indivíduos, como é o caso de *C. spiralis*, pode interferir na
388 dispersão de pólen. Quanto maior o número de flores abertas em um agrupamento, maior será
389 o de forrageamento dos polinizadores naquela área, aumentando o fluxo polínico entre plantas
390 vizinhas (Collevatti 2020). O comportamento territorial pode ampliar ainda mais esse efeito,
391 facilitando a polinização entre indivíduos próximos. Caso as plantas não tenham barreiras
392 contra endogamia ou não tenham carga genética, tal padrão de polinizações próximas pode
393 inclusive ser favorecido, como parece acontecer com *C. spiralis*.

394 Este estudo sugere então que a distância ótima dispersão do pólen para *C. spiralis* ocorre
395 entre 10 e 60 metros, que provavelmente corresponde a distância de polinização pelos beija-
396 flores mais comuns durante o estudo. Polinizações a maiores distâncias não são inviáveis, mas
397 resultaram em menos frutos formados. Este padrão também foi observado para outras espécies
398 não polinizadas por insetos no Cerrado. Em *Cariocar brasiliensis*, uma espécie polinizada por
399 morcegos, a distância de dispersão do pólen pode ser superior a 500 m, porém a maior parte do
400 fluxo polínico ocorreu em distâncias inferiores a 200 m (80%), e a distância média de dispersão
401 do pólen foi de 132m (Collevatti 2010). Ao contrário de *C. spiralis*, *Platypodium elegans*
402 (Fabaceae) apresentou uma alta proporção na dispersão de pólen à longa distância, superior a
403 750 m (Hamrick e Murawski 1990).

404 Pensava-se que por apresentar crescimento vegetativo e dispersão de sementes por
405 gravidade, os indivíduos de um mesmo grupo (até uns 10 metros de distância) seriam muito
406 aparentados, podendo levar a depressão por endogamia. Porém, as polinizações realizadas a 10
407 metros apresentaram frutificação e produção de sementes significativamente maiores que os
408 outros tratamentos nos dois anos (inclusive peso das sementes eram maiores). A frutificação foi

409 inclusive maior que o tratamento de autopolinização em 2022. Isso indica, portanto, que esta
410 espécie não só não apresenta depressão por endogamia, como os indivíduos localizados a 10
411 metros de distâncias, são diferentes o suficiente para gerar variabilidade genética (capítulo 2) e
412 produzir mais frutos do que as autopolinizações ou outras polinizações experimentais.

413 Mas apesar de explicar o sucesso de frutificação a curta distância, a ausência de
414 depressão endogâmica e o comportamento territorial dos beija-flores mais frequentes não
415 explicam o maior sucesso das polinizações naturais. A polinização natural foi
416 significativamente maior nos dois anos de experimento. Isto é provavelmente devido à
417 eficiência do polinizador no processo de dispersão e deposição do pólen no estigma. Além
418 disso, os beija-flores realizam visitas repetidas ao longo do dia, provavelmente depositando um
419 número maior e mais heterogêneo de grãos de pólen. Mas estas vantagens não parecem
420 estar associadas à polinização a distâncias maiores como preconizada por Araújo e Oliveira
421 (2007).

422 Apesar da polinização por beija-flores ser vista como eficiente para o transporte de pólen
423 a distâncias maiores, diferenças comportamentais entre espécies pode afetar o fluxo efetivo de
424 pólen. Um estudo selecionou cerca de seis espécies de *Justicia* (Acanthaceae) polinizadas por
425 beija-flores e quatro espécies polinizadas por abelhas e fez um comparativo das distâncias de
426 dispersão de grãos de pólen entre beija flores territoriais e abelhas (Lebuhn et al 2019). Neste
427 estudo as distâncias de dispersão de pólen mais curtas foram encontradas em espécies
428 polinizadas por beija-flores e não nas espécies polinizadas por abelhas.

429 Estudos com *Costus* indicam que a deposição de pólen e polinização efetiva não é tão
430 simples (Yost 2009). Os grãos de pólen têm baixa adesão nas papilas estigmáticas e talvez as
431 visitas repetidas dos beija-flores ao longo do dia otimizem o processo. Tais peculiaridades
432 poderiam explicar o maior sucesso de frutificação, mas ainda resta explicar as diferenças de
433 vigor das sementes observadas nos estudos anteriores e corroboradas pelos resultados atuais.

434

435 REFERÊNCIAS

436 Araújo, G. M., Barbosa, A. A., Arantes, A. A., & Amaral, A. F. (2002). Composição
437 florística de veredas no Município de Uberlândia, MG. *Brazilian Journal of Botany*, 25, 475-
438 493. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042002012000012>

439 Araújo, F. P. D., & Oliveira, P. E. (2007). Biologia floral de *Costus spiralis* (Jacq.)
440 Roscoe (Costaceae) e mecanismos para evitar a autopolinização. *Brazilian Journal of*
441 *Botany*, 30, 61-70. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042007000100007>

442 Araújo, F. P., Hoffmann, D., & Sazima, M. (2018). The planalto hermit,
443 *Phaethornis pretrei*—a key species in a Neotropical savanna community in Central
444 Brazil. *Journal of Natural History*, 52(37-38), 2385-2396.
445 <https://doi.org/10.1080/00222933.2018.1536767>

446 II, APG et al. (2003). Uma atualização da classificação Angiosperm Phylogeny Group
447 para as ordens e famílias de plantas com flores: APG II. *Revista botânica da Linnean Society*,
448 v. 141, n. 4, pág. 399-436. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.t01-1-00158.x>

449 Ávila, M. A., Souza, S. R., Veloso, M. D. D. M., Santos, R. M., Fernandes, L. A., &
450 Nunes, Y. R. F. (2016). Structure of natural regeneration in relation to soil properties and
451 disturbance in two swamp forests. *Cerne*, 22, 1-10.
452 <https://doi.org/10.1590/01047760201622012086>

453 Barrett, S. C. (1998). The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in*
454 *plant science*, 3(9), 335-341. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01299-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01299-0)

455 Batista, J. A. N., & Bianchetti, L. D. B. (2003). Lista atualizada das Orchidaceae do
456 Distrito Federal. *Acta botânica brasílica*, 17, 183-201. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062003000200003>

458 Buzatti, R. S. D. O., Ribeiro, R. A., Lemos Filho, J. P. D., & Lovato, M. B. (2012). Fine-
459 scale spatial genetic structure of *Dalbergia nigra* (Fabaceae), a threatened and endemic tree of
460 the Brazilian Atlantic Forest. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 838-
461 846. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012005000066>

462 Cardoso, J. C., de Deus, F. F., Silva, S., & Oliveira, P. E. (2018). Bow to the middle:
463 reproductive system and style behaviour of *Tococaguianensis*, a widespread Melastomataceae
464 from the Neotropics. *Plant Systematics and Evolution*, 304(2), 259-
465 267. <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1473-0>

466 Cardoso, J. C. & Oliveira, P. E. (2018) Expandindo o escopo do dimorfismo
467 ressupinado: o caso das orquídeas *Catasetum* Rich. ex Kunth. Resumo apresentado no 38º
468 Encontro Regional de Botânicos. MG, BA, ES. Porto Seguro.

469 Carvalho, P. D. S. (1991). As veredas e sua importância no domínio dos
470 cerrados. *Informe agropecuário*, 168(15), 54-56.

471 Charlesworth, B., & Charlesworth, D. (1999). The genetic basis of inbreeding
472 depression. *Genetics Research*, 74(3), 329-340. <https://doi.org/10.1017/S0016672399004152>

473 Collevatti, R. G., Estolano, R., Garcia, S. F., & Hay, J. D. (2010). Short-distance pollen
474 dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated neotropical tree. *Tree Genetics &*
475 *Genomes*, 6(4), 555-564. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0271-4>

476 Collevatti, R. G., Dos Santos, J. S., Rosa, F. F., Amaral, T. S., Chaves, L. J., & Ribeiro,
477 M. C. (2020). Multi-scale landscape influences on genetic diversity and adaptive traits in a
478 Neotropical savanna tree. *Frontiers in genetics*, 11,
479 259. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00259>

480 Cronquist, A., Takhtadzhian, ArmenLeonovich (1981) Um sistema integrado de
481 classificação de plantas com flores . Columbia University Press.

482 Frankham, R., Ballou, S. E. J. D., Briscoe, D. A., & Ballou, J. D. (2002). *Introduction*
483 *to conservation genetics*. Cambridge university press. Hamrick, J. L., & Murawski, D. A. (1990).
484 The breeding structure of tropical tree populations. *Plant species biology*, 5(1), 157-165.
485 <https://doi.org/10.1017/CBO9780511808999>

486 Jain, S. K. (1976). The evolution of inbreeding in plants. *Annual review of ecology and*
487 *systematics*, 469-495. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.07.110176.002345>

488 Jersakova, J., & Johnson, S. D. (2006). Lack of floral nectar reduces self-pollination in
489 a fly-pollinated orchid. *Oecologia*, 147(1), 60-68. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0254-6>

490 Justino, D. G., Maruyama, P. K., & Oliveira, P. E. (2012). Floral resource availability
491 and hummingbird territorial behaviour on a Neotropical savanna shrub. *Journal of*
492 *Ornithology*, 153(1), 189-197. <https://doi.org/10.1007/s10336-011-0726-x>

493 Junk, W. J., Piedade, M. T. F., Lourival, R., Wittmann, F., Kandus, P., Lacerda, L. D.,
494 ... & Agostinho, A. A. (2014). Brazilian wetlands: their definition, delineation, and
495 classification for research, sustainable management, and protection. *Aquatic Conservation:*
496 *marine and freshwater ecosystems*, 24(1), 5-22. <https://doi.org/10.1002/aqc.2386>

497 Kay, K. M., Reeves, P. A., Olmstead, R. G., & Schemske, D. W. (2005). Rapid
498 speciation and the evolution of hummingbird pollination in neotropical *Costus* subgenus *Costus*
499 (*Costaceae*): evidence from nrDNA ITS and ETS sequences. *American Journal of*
500 *Botany*, 92(11), 1899-1910. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.11.1899>

501 Koeppen, W. (1948). *Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra* (No.
502 QC861 K6).

503 Kropf, M., & Renner, S. S. (2008). Pollinator-mediated selfing in two deceptive orchids
504 and a review of pollinium tracking studies addressing geitonogamy. *Oecologia*, 155(3), 497-
505 508. <https://doi.org/10.1007/s00442-007-0919-4>

506 Kurtz, B. C., Gomes, J. C., & Scarano, F. R. (2013). Structure and phytogeographic
507 relationships of swamp forests of Southeast Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 27, 647-
508 660. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062013000400002>

509 Kurtz, B. C., Valentin, J. L., & Scarano, F. R. (2015). Are the neotropical swamp forests
510 a distinguishable forest type? Patterns from southeast and Southern Brazil. *Edinburgh Journal*
511 *of Botany*, 72(2), 191-208. <https://doi.org/10.1017/S096042861400033X>

512 Lynch, M. (1991). The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding
513 depression. *Evolution*, 45(3), 622-629. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1991.tb04333.x>
514

- 515 Maas, P. J. M. (1972). Costoideae (Zingiberaceae). *Flora Neotropica*, 8, 1–139.
516 <http://www.jstor.org/stable/4393675>
517
- 518 Maruyama, P. K., Borges, M. R., Silva, P. A., Burns, K. C., & Melo, C. (2013). Avian
519 frugivory in *Miconia* (Melastomataceae): contrasting fruiting times promote habitat
520 complementarity between savanna and palm swamp. *Journal of Tropical Ecology*, 29(2), 99-
521 109. <https://doi.org/10.1017/S0266467413000138>
- 522 Maciel A. A., Cardoso J.C.F., Oliveira P.E. (2016) A chuva e a florivoria aumentam o
523 sucesso reprodutivo de uma orquídea polinizada por engano. In: II Simpósio Brasileiro de
524 Polinização, Catalão. Anais do II Simpósio Brasileiro de Polinização.
- 525 Meirelles, M. L., Guimarães, A. J., Oliveira, R. D., Araújo, G. D., & Ribeiro, J. F.
526 (2004). Impactos sobre o estrato herbáceo de áreas úmidas do Cerrado. *Cerrado: ecologia e*
527 *caracterização*, 1, 41-68.
- 528 Moza, M. K., & Bhatnagar, A. K. (2007). Plant reproductive biology studies crucial for
529 conservation. *CURRENT SCIENCE-BANGALORE-*, 92(9), 1207.
- 530 Nogueira, E. V., Bijos, N. R., Trindade, V. L., Heusi, G. P., Togni, P. H., & Munhoz,
531 C. B. (2022). Differences in soil properties influence floristic changes in the Veredas of the
532 Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Botany*, 45(2), 763-774. [https://doi.org/10.1007/s40415-](https://doi.org/10.1007/s40415-022-00795-3)
533 [022-00795-3](https://doi.org/10.1007/s40415-022-00795-3)
- 534 Nunes, Y. R. F., Souza, C. S., de Azevedo, I. F. P., de Oliveira, O. S., Frazão, L. A.,
535 Fonseca, R. S., ... & Neves, W. V. (2022). Vegetation structure and edaphic factors in veredas
536 reflect different conservation status in these threatened areas. *Forest Ecosystems*, 9, 100036.
537 <https://doi.org/10.1016/j.fecs.2022.100036>
- 538 Oliveira, PE, & Gibbs, PE (2002). 17. Polinização e Biologia Reprodutiva em
539 Comunidades Vegetais do Cerrado. *Os cerrados do Brasil*, 329-348.

540 Oliveira, G. C., Araújo, G. M., & Barbosa, A. A. A. (2009). Florística e zonação de
541 espécies vegetais em veredas no Triângulo Mineiro, Brasil. *Rodriguésia*, 1077-1085
542 <https://doi.org/10.1590/2175-7860200960417>

543 Oliveira, P. T. S., Nearing, M. A., Moran, M. S., Goodrich, D. C., Wendland, E., &
544 Gupta, H. V. (2014). Trends in water balance components across the Brazilian Cerrado. *Water*
545 *Resources Research*, 50(9), 7100-7114. <https://doi.org/10.1002/2013WR015202>

546 Oliveira, P. T. S., Wendland, E., Nearing, M. A., Scott, R. L., Rosolem, R., & Da Rocha,
547 H. R. (2015). The water balance components of undisturbed tropical woodlands in the Brazilian
548 cerrado. *Hydrology and Earth System Sciences*, 19(6), 2899-2910. [https://doi.org/10.5194/hess-](https://doi.org/10.5194/hess-19-2899-2015)
549 [19-2899-2015](https://doi.org/10.5194/hess-19-2899-2015)

550 Oliveira, P. T. S., Leite, M. B., Mattos, T., Nearing, M. A., Scott, R. L., de Oliveira
551 Xavier, R., ... & Wendland, E. (2017). Groundwater recharge decrease with increased
552 vegetation density in the Brazilian cerrado. *Ecohydrology*, 10(1),
553 e1759. <https://doi.org/10.1002/eco.1759>

554 Price, M. V., & Waser, N. M. (1979). Pollen dispersal and optimal outcrossing in
555 *Delphinium nelsoni*. *Nature*, 277(5694), 294-297. <https://doi.org/10.1038/277294a0>

556 Ramirez, N., & Brito, Y. (1990). Reproductive biology of a tropical palm swamp
557 community in the Venezuelan llanos. *American Journal of Botany*, 77(10), 1260-1271.
558 <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1990.tb11378.x>

559 R Development core team. R: A language and environment for statistical computing. R
560 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2020). Disponível em: [https://www.r-](https://www.r-project.org/)
561 [project.org/](https://www.r-project.org/). Acesso em: 11/09/20.

562 Rech, A. R., Agostini, K., Oliveira, P. E., & Machado, I. C. (Eds.). (2014). *Biologia da*
563 *polinização* (p. 524). Rio de Janeiro: Projecto Cultural.

- 564 Rigney, L. P. (1995). Postfertilization causes of differential success of pollen donors in
565 *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae): nonrandom ovule abortion. *American Journal of*
566 *Botany*, 82(5), 578-584. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1995.tb11502.x>
- 567 Ribeiro, J. F., & Walter, B. M. T. (1998). Fitofisionomias do bioma Cerrado.
- 568 Ribeiro, J. F., & Walter, B. M. T. (2008). As principais fitofisionomias do bioma
569 Cerrado. *Cerrado: ecologia e flora*, 1, 151-212.
- 570 Rosa, R. L. S. C. "Abordagem preliminar das condições climáticas de Uberlândia
571 (MG)." *Sociedade e natureza* 3 (1991): 91-108. <https://doi.org/10.14393/SN-v3-1991-60693>
- 572 Salzman, S., Driscoll, H. E., Renner, T., André, T., Shen, S., & Specht, C. D. (2015).
573 Spiraling into history: a molecular phylogeny and investigation of biogeographic origins and
574 floral evolution for the genus *Costus*. *Systematic Botany*, 40(1), 104-115.
575 <https://doi.org/10.1600/036364415X686404>
- 576 Schemske, D. W. (1983). Breeding system and habitat effects on fitness components in
577 three neotropical *Costus* (Zingiberaceae). *Evolution*, 523-539. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1983.tb05569.x>
- 579 Schmidt-Lebuhn, A. N., Müller, M., Pozo Inofuentes, P., Encinas Viso, F., & Kessler,
580 M. (2019). Pollen analogues are transported across greater distances in bee-pollinated than in
581 hummingbird-pollinated species of *Justicia* (Acanthaceae). *Biotropica*, 51(2), 99-
582 103. <https://doi.org/10.1111/btp.12633>
- 583 Silva, D. P. D., Amaral, A. G., Bijos, N. R., & Munhoz, C. B. R. (2017). Is the herb-
584 shrub composition of veredas (Brazilian palm swamps) distinguishable?. *Acta Botanica*
585 *Brasilica*, 32, 47-54. <https://doi.org/10.1590/0102-33062017abb0209>
- 586 Souto, C. P., Aizen, M. A., & Premoli, A. C. (2002). Effects of crossing distance and
587 genetic relatedness on pollen performance in *Alstroemeria aurea* (Alstroemeriaceae). *American*
588 *Journal of Botany*, 89(3), 427-432. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.3.427>

589 Souza, V. C., & Lorenzi, H. (2012). Botânica Sistemática: guia ilustrado para
590 identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III.

591 Sletvold, N., Grindeland, J. M., Zu, P., & Ågren, J. (2012). Strong inbreeding depression
592 and local outbreeding depression in the rewarding orchid *Gymnadeniacaenopsea*. *Conservation*
593 *Genetics*, 13(5), 1305-1315. <https://doi.org/10.1007/s10592-012-0373-7>

594 Stevens, P. F. (2021). Angiosperm phylogeny website, Version 14, July 2017 [and more
595 or less continuously updated since], page last updated 21/05/2021.

596 Specht, C. D., Yockteng, R., Almeida, A. M., Kirchoff, B. K., & Kress, W. J. (2012).
597 Homoplasy, pollination, and emerging complexity during the evolution of floral development
598 in the tropical gingers (Zingiberales). *The Botanical Review*, 78(4), 440-
599 462. <https://doi.org/10.1007/s12229-012-9111-6>

600 Strassburg, Bernardo BN et al. (2017) Moment of truth for the Cerrado hotspot. *Nature*
601 *Ecology & Evolution*, 1 (4), 1-3. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0099>

602 Valderrama, E., Sass, C., Pinilla-Vargas, M., Skinner, D., Maas, P. J., Maas-Van De
603 Kamer, H., ... & Specht, C. D. (2020). Unraveling the spiraling radiation: a phylogenomic
604 analysis of Neotropical *Costus* L. *Frontiers in plant science*, 11, 1195.
605 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01195>

606 Villegas, S. et al. (2020) Effects of crossing distance on fitness components in the
607 carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae). *Plant Species Biology* 35(3): 175–
608 184. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12271>

609 Waser, N. M. Price, M. V. (1989). Optimal outcrossing in *ipomopsis aggregate*: seed set
610 and offspring fitness. *Evolution*, 43 (5), 1097-1109. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb02554.x>

612 Waser, N. M., & Price, M. V. (1994). Crossing-distance effects in *Delphinium nelsonii*:
613 outbreeding and inbreeding depression in progeny fitness. *Evolution*, 48(3), 842-852.
614 <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1994.tb01366.x>

615 Waser, N. M., Price, M. V., & Shaw, R. G. (2000). Outbreeding depression varies
616 among cohorts of *Ipomopsis aggregata* planted in nature. *Evolution*, 54(2), 485-491.
617 <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00051.x>

618 Yost, J. M., & Kay, K. M. (2009). The evolution of postpollination reproductive
619 isolation in *Costus*. *Sexual Plant Reproduction*, 22(4), 247-255. [https://doi.org/10.1007/s00497-](https://doi.org/10.1007/s00497-009-0113-4)
620 [009-0113-4](https://doi.org/10.1007/s00497-009-0113-4)

CAPÍTULO 2:

TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS MICROSSATÉLITES DE *Costus scaber* (Ruiz e Pay) e *C. pulverulentus* PARA *Costus spiralis* (Jacq) Roscoe, UMA ESPÉCIE DE VEREDA

1 INTRODUÇÃO

2
3 A diversidade genética depende de interações ecológicas, uma vez que o sucesso deste
4 sistema de troca é a manutenção do fluxo de genes na população (Hunghe et al. 2008). Em
5 tese, indivíduos geneticamente diferentes podem interagir de maneiras diferentes (Crutsinger et
6 al. 2006, Hunghe et al. 2008). A genética em plantas também pode influenciar e/ou até mesmo
7 explicar a variação em características ecológicas de grande relevância para sobrevivência, como
8 a taxa de crescimento, capacidade competitiva e função imunológica (Schweitzer et al. 2005,
9 Crutsinger et al. 2006, Johnson et al. 2006, Hunghe et al. 2008). Além disso, a heterogeneidade
10 espacial dos indivíduos dentro da população, a diversidade genética juntamente com sistemas
11 e mecanismos reprodutivos podem moldar a estrutura genética de uma população (Hamrick e
12 Schnabel 1985).

13 Com o avanço das análises genéticas voltadas para questões ecológicas, estas se
14 tornaram mais eficientes, flexíveis e difundidas (Selkoe e Toonen 2006). Diversos tipos de
15 marcadores genéticos foram desenvolvidos para abordagens ecológicas, sendo que dentre eles
16 os microssatélites ou sequências simples repetidas (*Single Sequence Repeat* SSR) são os mais
17 utilizados devido à capacidade de se analisar uma herança codominante, por serem multialélicos
18 e também altamente variáveis em relação aos demais marcadores (Nybom 2004, Kalia 2011).

19 Os microssatélites são constituídos por um par de primers (geralmente com 1 a 6
20 nucleotídeos) que são complementares e desenvolvidos para promover a amplificação de
21 regiões do DNA com sequências que se repetem também chamadas de sequências em tandem.
22 O número de unidades repetitivas pode ser diferente entre indivíduos ou populações devido a
23 erros da DNA polimerase durante a replicação ou por outros mecanismos como o *crossing over*
24 (Eisen 1999, Kalia 2011). Essas são passíveis de observação através da eletroforese em gel de
25 alta resolução, que permite a uma primeira análise de genotipagem dos indivíduos (Schlotterer
26 2000, Kalia 2011), ou ainda trabalhos mais recentes utilizam, quando disponível,
27 sequenciadores que permitem que a genotipagem seja realizada com maior acurácia e
28 facilidade. As análises destas modificações são capazes fornecer dados como, diversidade
29 genética, inferir relações genéticas intraespecíficas e interespecíficas, que permitem uma
30 análise mais apurada da estrutura populacional das espécies (Maia et al. 2017).

31 Algumas regiões do DNA vizinha a um locus de microssatélite são conservadas, e essas
32 regiões são chamadas de flanqueadoras. A partir delas, é possível identificar um locus
33 microssatélite e desenvolver primers que se ligam de forma complementar a essa região e que

34 conseguem conduzir o processo de amplificação (PCR) (Kalia 2011). A limitação do uso destes
35 marcadores moleculares está na necessidade de desenvolvimento de iniciadores específicos
36 para todas as espécies, principalmente para espécies de plantas nativas. Para desenvolver um
37 iniciador com estas características, é necessário conhecer a sequência de DNA e após isso
38 projetar primers para cada locus de cada espécie (Paglia 1998, Ellis e Burke 2007). Devido à
39 necessidade de sequenciamento, o desenvolvimento de primers microsatélites é trabalhoso e
40 tem um alto custo financeiro. Todavia, uma solução possível para muitas espécies é a
41 transferência de marcadores SSR já desenvolvidos para espécies correlacionadas. A
42 transferebilidade de primers SSR permite que estudos de diversidade genética sejam
43 desenvolvidos de forma mais rápida e abrangente para alguns grupos (Soares et al. 2013).

44 O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e considerado um hotspot de
45 biodiversidade, com mais de 4000 espécies de plantas endêmicas na região (Strassburg et al
46 2017). Mas ainda não existem marcadores SSR desenvolvidos especificamente para muitas
47 espécies de plantas da região, o que limita o uso desses marcadores para estudos populacionais
48 (Collevatti 2010).

49 *Costus spiralis*(Jacq.) Roscoe é uma espécie comum em áreas de veredas do triângulo
50 mineiro. É uma espécie autocompatível, mas que depende de polinização ativa para a formação
51 de frutos (Araújo & Oliveir 2007). Essa espécie exibe uma distribuição agrupada, formando
52 várias touceiras ao longo da vereda, o que pode sugerir que a dispersão das sementes ocorra
53 próximo à planta progenitora. O principal visitante de *C. spiralis* é *Phaethornis pretrei*, que
54 visita de forma sistemática as flores existentes em um grupo de indivíduos, e em seguida, migra
55 para outros agrupamentos. Esse comportamento pode ser benéfico para a planta, uma vez que,
56 ao apresentar rotas de forrageamento, o polinizador mantém o fluxo polínico e,
57 consequentemente, aumenta o número de grãos de pólen de doadores diferentes chegando ao
58 estigma. Um estudo anterior observou diferenças na taxa de germinação de sementes
59 provenientes de polinizações naturais e manuais em *C. spiralis* com até trinta metros de
60 distância entre o doador de pólen e o receptor, o que pode indicar que esse comportamento do
61 visitante pode promover o transporte de pólen a distâncias maiores, aumentando o fluxo gênico
62 (Araújo e Oliveira 2007).

63 Essa espécie de monocotiledônea é importante para a composição florística de uma
64 fitofisionomia do Cerrado que está constantemente ameaçada, a vereda. Além disso, *C. spiralis*
65 apresenta uma biologia reprodutiva e floral interessante como descrito anteriormente e pouco
66 estudada e por isso torna-se o modelo para estudos de diversidade genética neste ambiente. No

67 entanto, não há marcadores microsatélites desenvolvidos especificamente para essa espécie.
68 Existem sim marcadores SSR desenvolvidos para espécies do mesmo gênero, *C. Scaber* Ruiz
69 & Pav e *C. pulverulentus* C. Presl (Kay 2011), que ocorrem em outros ambientes tropicais.
70 Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a transferibilidade de marcadores
71 microsatélites de *C. scaber*. e *C. pulverulentus* para *Costus spiralis*. Além disso, usamos alguns
72 dos primers efetivamente transferidos e polimórficos para comparar a diversidade genética
73 entre indivíduos de *C spiralis* numa vereda do triângulo mineiro.

74

75 **MATERIAIS E MÉTODOS**

76

77 *Área de estudo*

78

79 O trabalho foi desenvolvido com amostras de indivíduos da espécie *Costus spiralis*
80 coletados em uma área de vereda pertencente à Reserva Particular do Clube de Caça e Pesca
81 Itororó de Uberlândia (CCPIU) (Figura 1A e B). Suas coordenadas geográficas são 48°18'06"O
82 e 18°59'21"S. A área natural ocupa ca. 400 ha de Cerrado (Maruyama et al. 2013), sendo que
83 em torno de um quarto desta área está efetivamente incluída na RPPN. O Cerrado possui duas
84 estações bem definidas, onde a estação fria e mais seca ocorre entre os meses de Maio e
85 Setembro e a estação chuvosa e quente ocorre entre os meses de Outubro a Abril (Köppen
86 1948, Rosa et al. 1991). As plantas floresceram de Dezembro a Junho, tendo seu pico de
87 floração em Fevereiro e Março e apresentam folhas jovens principalmente no período de
88 Dezembro a Março (período chuvoso).

89

90 *Procedimentos Laboratoriais*

91

92 Foram coletadas e armazenadas amostras de folhas jovens de 45 indivíduos de *Costus*
93 *spiralis*. As folhas foram armazenadas separadamente em saquinhos de papel devidamente
94 identificados de acordo com o número do indivíduo e a área da vereda. Após a coleta, o material
95 foi levado ao Laboratório de Morfologia Vegetal e Imagem - LAMOVI do Instituto de Biologia
96 da Universidade Federal de Uberlândia e foram armazenados em sílica gel.

97 Para a extração do DNA foi utilizado nitrogênio líquido para fracionar as folhas sem
98 perda ou danos no material genético. Foram utilizados kits de extração DNeasy Plant mini
99 (QIAGEN) e Plant/Fungi DNA Isolation Kit (NORGEN). A quantidade de DNA extraída foi

100 averiguada com auxílio de um Nanodrop (Thermo Fisher). A qualidade da extração utilizando
101 os diferentes kits não foi comparada, mas ambos foram eficientes na obtenção do DNA.

102 Os primers foram selecionados a partir do estudo de Kay (2011) (Tab. 1), que foram
103 desenvolvidos e testados para *Costus scaber* e *C. pulverulentus*. Inicialmente, um teste com
104 apenas três indivíduos de *C. spiralis* foi realizado para obter as melhores temperaturas de
105 anelamento e posteriormente os 45 indivíduos foram utilizados. Para a realização das
106 ampliações foi utilizado o Kit *Taq* PCR Master Mix (1000 U), adicionado ao primer e DNA
107 extraído (20-55 ng de DNA). O uso desse kit para a PCR reduz erros de pipetagem, podendo
108 garantir resultados satisfatório.

109 A amplificação dos fragmentos foi realizada em dois termocicladores (O Thermo Fisher
110 Scientific Oy e o SimpliAmp Thermal Cyclerv) e as temperaturas de anelamento testadas foram
111 de 60°C á 64°C (Tabela 1) indicadas por Kay (2011). As temperaturas foram ajustadas de
112 acordo com a melhor visualização e especificidade das bandas no gel de eletroforese (Figura
113 1C e D). Para realizar as reações de PCR as seguintes condições de reação foram testadas no
114 termociclador: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 60, 62 ou
115 64°C por 1 min s, 72°C por 8 min; extensão final em 4°C por 30 min. Após a PCR, foram
116 realizadas as eletroforeses por meio do gel de agarose ultrapura a 3,0%, corados em solução de
117 Brometo etídio 0.9 pg/mL eimersos em tampão TBE 0.5X com a tensão de 80 V por cerca de 4
118 horas e posteriormente, fotodocumentados. As bandas de DNA foram analisados por
119 visualização sob luz ultravioleta, fotografadas utilizando câmera digital (Canon PC1564). As
120 fotografias foram analisadas e comparadas as banda bem delineadas/visíveis , indicando a
121 amplificação específica e a presença de alelos com pesos moleculares dentro das faixas
122 descritas nos estudos originais.

123

124 *Análise de dados*

125

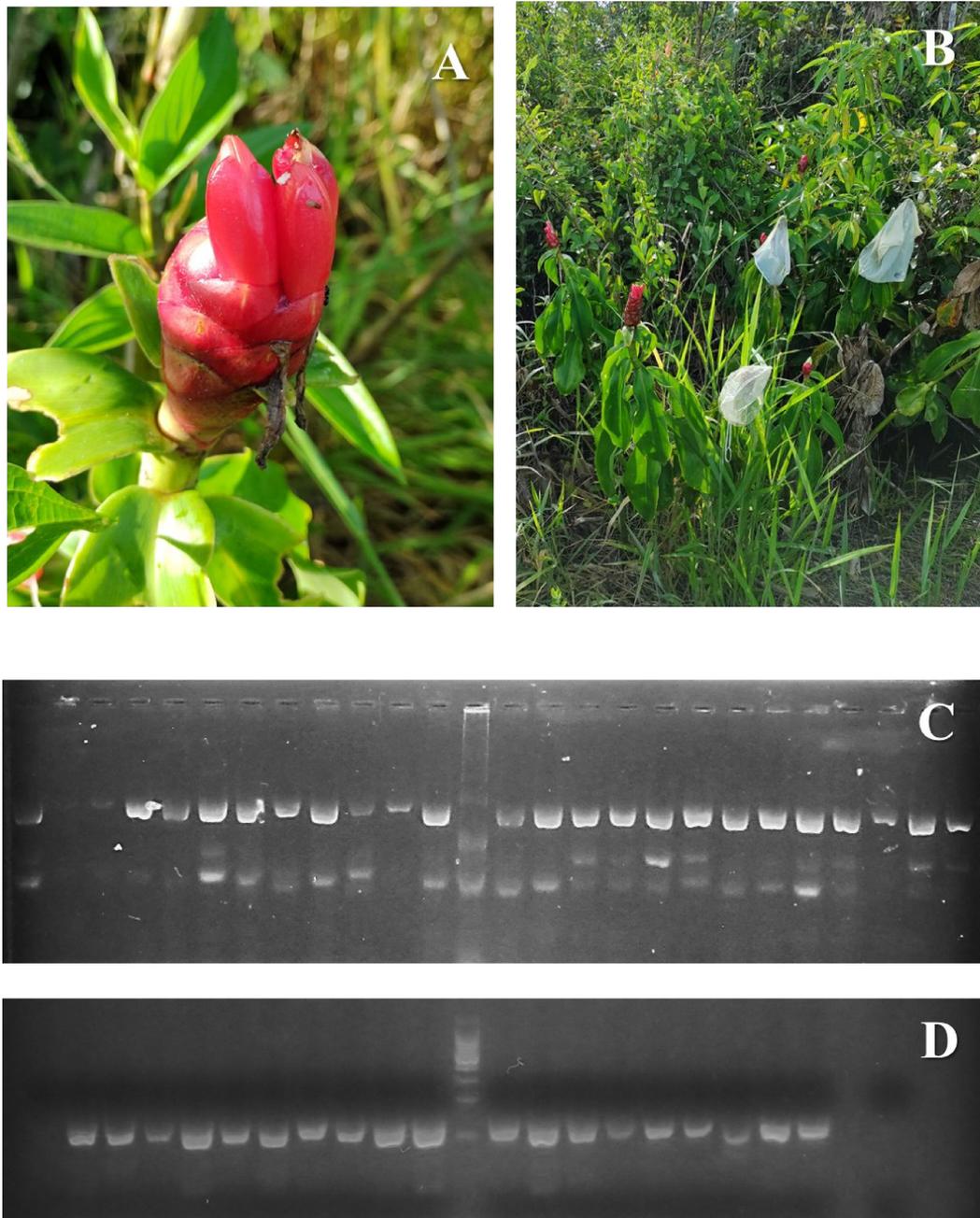
126 A fim de avaliar os dados obtidos de transferibilidade de *Costus spiralis*, as bandas
127 foram identificadas de forma visual na imagem capturada do gel de agarose, onde os critérios
128 de avaliação foram amplificação, nitidez e tamanho das bandas. Cada locus foi analisado de
129 acordo com o tamanho das bandas, descrito no artigo referencial e com auxílio do marcador
130 molecular DNA ladder 100 bp (Ludwig Biotec) que indicava o peso das bandas. Os parâmetros
131 de diversidade genética foram calculados usando GenAIEx 6.5 (Peakall e Smous 2006), que
132 forneceu a heterozigosidade média esperada (He) e heterozigosidade observada (Ho).

133 Os 45 indivíduos da população estudada foram divididos em 4 subpopulações (área A,
134 B, C e D do mapa), que foram anteriormente descritas em um estudo que realizou cruzamentos
135 com diferentes distâncias entre o doador e o receptor de pólen. Essas subpopulações são
136 agrupamentos espalhados ao longo da vereda, onde os indivíduos agrupados nas subpopulações
137 foram utilizados para realizar uma análise de Amova que estima a porcentagem de variância
138 molecular entre e dentro das subpopulações e ainda um teste de Mantel que foi utilizado para
139 testar o isolamento por distância entre essas áreas. (Kay 2011).
140



141 **Figura 4:** Área da vereda presente no Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU), áreas
142 de coleta de material biológico para extração de DNA . Imagem retirada do google earth e
143 editada manualmente.

144
145
146



147

148 **Figura 5:** A e B mostram detalhes da espécie de planta *Costus spiralis*. A: Inflorescência com
 149 duas flores abertas. B: Indivíduo de *C. spiralis* na vereda da reserva do Clube Caça e Pesca
 150 Itororó. As imagens C e D mostram o resultado da amplificação do primer D9. C: Teste de
 151 amplificação a 60° C com excesso de bandas inespecíficas. D: Teste de amplificação a 60,5° C
 152 com apenas as bandas específicas definidas a partir do tamanho descrito por Kay (2011).

153

154 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

155

156 Oito dos primers (loci) microsatélites dos quinze testados (53.33%) foram transferidos
157 com sucesso para *C. spiralis* produzindo bandas com qualidade suficiente para identificar de
158 maneira reproduzível os alelos em cada loci nos organismos analisados Apenas um dos primers
159 foi monomórfico para a população estudada e os outros sete foram polimórficos, portanto a
160 porcentagem de loci polimórficos da população foi de 87,5%.

161 A heterozigosidade observada (H_o) média nesta população de *C. spiralis* foi de 0.185 e a
162 heterozigosidade esperada (H_e) média foi de 0.395. A maior heterozigosidade observada e
163 esperada encontrada foram nos primers/loci ctri4A11 e chex12B9 (0.444 e 0.500
164 respectivamente; Tabela 1) e as menores foram nos primers/loci ctri13A12 e ctri3B1 (0.000 e
165 0.314 respectivamente; Tabela 1). Em *Costus scaber* e *Costus pulverulentus*, espécies também
166 polinizadas por beija-flores e que apresentam fortes semelhanças ecológicas com *C. spiralis*
167 (Kay e Schemske 2003). A heterozigosidade esperada e observada também foi similar usando
168 os mesmos marcadores, mas para *C. scaber* 14 loci foram utilizados e para *C. pulverulentus* 12
169 loci foram utilizados dos quinze loci construídos originalmente para estas espécies. Isso pode
170 explicar a maior variação na encontrada nessas espécies (*Costus scaber* $H_o = 0.05$ no locus
171 nctet3E6, nctri1C9 e cdi10E12 a 0.75 no locus ncdi8A10, $H_e = 0.05$ nctet3E6, nctri1C9 e
172 cdi10E12 a 0.85 ncdi8A10; *Costus pulverulentus* $H_o = 0.05$ no locus ctet5C2 a 1.00 no locus
173 ncdi8A10, $H_e = 0.05$ no locus ctet5C2 a 0.89 no locus ncdi8A10) (Kay et al. 2011).

174 Kay et al. (2011), utilizando os mesmos marcadores, encontraram a maior
175 heterozigosidade observada e esperada quando analisaram o locus ncdi8A10 (*Costus scaber* H_o
176 $= 0.75$, $H_e = 0.85$; *Costus pulverulentus* $H_o = 1.00$, $H_e = 0.89$). Até o momento não obtivemos
177 sucesso na transferibilidade deste locus para *Costus spiralis*, mas pretende-se testar outras
178 temperaturas e alterações no ciclo de amplificação que possam viabilizar a amplificação desta
179 região, já que é altamente polimórfica para as espécies de *Costus*. Na verdade os primers
180 testados amplificaram em alguma das temperaturas testadas, mas como alguns não
181 apresentaram especificidade na amplificação das bandas de interesse eles não foram
182 considerados como efetivamente transferidos e não foram utilizados para a população de *C.*
183 *spiralis*. Mas é possível que, como no caso do primer ncdi8A10, ajustes mais finos da
184 temperatura possam melhorar a amplificação das bandas específicas e eles podem ainda vir a
185 ser usados para análises populacionais de *Costus spiralis*.

186

187 **Tabela 5:** Loci testados, temperaturas utilizadas e o tamanho de bandas. TeA = Temperatura
 188 de anelamento; TaB = Tamanho de banda; Trans = Transferibilidade.

Primer	TeA testada	TeA recomendada	TaB	Transferibilidade	Ho	He
nctri170/ K217202	60, 60.5, 62, 63°C	63 °C	237/249	x	0,122	0,442
ctet53/ JK216440	60, 60.5, 62, 63°C	63°C	172/184	x	0,294	0,472
nctri113/ JK216242	60, 60.5, 62, 63°C	-	135/138	-	-	-
ncdi8A10/ JK216680	60, 60.5, 62, 63°C	-	180/210	-	-	-
ctri4A11/ JK216382	60, 60.5, 62, 63°C	63°C	230/233	x	0,444	0,498
ctri13A12/ JK217056	60, 60.5, 62°C	60,5°C	253/274	x	0,000	0,493
ctri3B1/ JK216305	60, 60.5, 62°C	60,5°C	246/255	x	0,098	0,314
ctri2D9/ JK216253	60, 60.5, 62°C	60,5°C	152/170	x	0,268	0,442
chex12B9/ JK216985	60, 60.5, 62°C	60,5°C	189/207	x	0,257	0,500
ctet5C2/ JK216473	60, 60.5, 62, 63, 63.5°C	-	256/259	-	-	-
nctri1C9/ JK216161	60, 60.5, 62, 63, 63.5°C	-	151/154	-	-	-
cdi4G6/ JK216441	60, 60.5, 62, 63, 63.5°C	-	233/243	-	-	-
nctet3E6/ JK216336	60, 60.5, 62, 63, 63.5°C	-	144/148	-	-	-
ctri3D11/ JK216330	60, 60.5, 62, 63, 63.5°C	-	270/276	-	0,000	0,000
cdi10E12/ JK216871	60, 60.5, 62, 63, 63.5°C	-	156/168	-	-	-

189

190

191 Com base nos sete primers efetivamente transferíveis e polimórficos, foi possível
 192 comparar a diversidade genética entre as subpopulações e indivíduos na área de vereda
 193 estudada. Quando os 45 indivíduos de *C. spiralis* foram separados em quatro subpopulações

194 (Figura 13) a análise da percentagem de variância molecular (AMOVA) mostrou que a maior
 195 variação encontrada está dentro das subpopulações (93%, Tabela 2), enquanto que a variação
 196 entre as subpopulações foi muito menor (7%). Estas subpopulações estão localizadas a distância
 197 máxima de 2000 metros, o que pode explicar a semelhança entre elas. O teste de Mantel,
 198 realizado não mostrou correlação significativa entre a distância espacial e a distância genética
 199 ($r = 0,015$, $P = 0,290$), indicando que não há diferenciação ou isolamento por distância entre
 200 estas subpopulações.

201 Estudos sobre a variância molecular de espécies autocompatíveis utilizando os mesmos
 202 marcadores microssatélites (Nybom 2004), apresentam índices diferenciação de (42%) entre
 203 populações menores do que o encontrado para *C. spiralis*. Vários traços da história de vida das
 204 plantas influenciam a diversidade genética e a diferenciação entre as suas populações como o
 205 sistema reprodutivo, a forma de vida, a amplitude geográfica e a dispersão das sementes
 206 (Nybom 2004). A heterozigosidade esperada e observada média descrita para espécies
 207 autocompatíveis utilizando os mesmos marcadores moleculares ($H_e = 0.41$ e $H_o = 0.05$,
 208 respectivamente; Nybom 2004) é similar a encontrada para *C. spiralis* ($H_e = 0.395$; $H_o =$
 209 0.185).

210

211 **Tabela 6:** Análise de variância molecular (AMOVA) nas 4 subpopulações de *C. spiralis*
 212 localizadas na área de vereda pertencente à Reserva Particular do Clube de Caça e Pesca Itororó
 213 de Uberlândia (CCPIU).

Variância Molecular	df	SS	MS	Est. Var.	%
Interpopulacional	3	37,369	12,456	0,505	7%
Intrapopulacional	41	289,208	7,054	7,054	93%
Total	44	326,578		7,559	100%

214

215 Para efeito de comparação, *Miconia albicans*, espécie de planta do Cerrado e que se
 216 encontra na área da borda da mesma vereda aqui estudada, apresenta heterozigosidade esperada
 217 média de 0.168 (estimado utilizando marcadores ISSR, Dias et al. 2018), inferior ao descrito
 218 para *C. spiralis*. Mas além da diferença no tipo de primer utilizado (que talvez subestime a
 219 heterozigosidade), esta espécie é apomítica obrigatória (não produz pólen viável) e a
 220 heterozigosidade é provavelmente resultado de recombinações durante a meiose (Dias et al.
 221 2021). Para *Tibouchina hatschbachii*, outra espécie estudada com marcadores codominantes
 222 similares, a média encontrada foi de 0,492 (estimado utilizando marcadores SSR). Esta é uma
 223 espécie autógama que disponibiliza somente pólen para seus vetores de polinização (Maia et al.

224 2017), porém é uma espécie que apresenta uma distribuição agregada de forma semelhante a *C.*
225 *spiralis*. Este tipo de distribuição agregada pode reduzir a heterozigosidade local (Gtzendanner
226 e Soltis, 2000).

227 O estudo mais aprofundado, utilizando marcadores microssatélites que garanta a
228 reprodutibilidade e que seja capaz de analisar alelos co-dominantes, é necessário para
229 compreensão da interação entre os processos ecológicos e genéticos. A transferibilidade de loci
230 microssatélites pode ser cada vez mais utilizada para proporcionar estudos como estes, com
231 menor custo e que permitem uma avaliação, mesmo que preliminar, da variabilidade genética
232 de populações nativas de Cerrado. Estudos como realizados para *C. spiralis* podem ser
233 utilizados como modelos para avaliação de um maior número de populações e análise mais
234 acurada da estrutura genética de plantas do Cerrado.

235

236

237 REFERÊNCIAS

238 Araújo, F. P. D., & Oliveira, P. E. (2007). Biologia floral de *Costus spiralis* (Jacq.)
239 Roscoe (Costaceae) e mecanismos para evitar a autopolinização. *Brazilian Journal of*
240 *Botany*, 30, 61-70. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042007000100007>

241 Collevatti, R. G., Estolano, R., Garcia, S. F., & Hay, J. D. (2010). Short-distance pollen
242 dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated neotropical tree. *Tree Genetics &*
243 *Genomes*, 6(4), 555-564. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0271-4>

244 Crutsinger, G. M., Collins, M. D., Fordyce, J. A., Gompert, Z., Nice, C. C., & Sanders,
245 N. J. (2006). Plant genotypic diversity predicts community structure and governs an ecosystem
246 process. *science*, 313(5789), 966-968. <https://doi.org/10.1126/science.1128326>

247 Dias, A. C. C., Serra, A. C., Sampaio, D. S., Borba, E. L., Bonetti, A. M., & Oliveira,
248 P. E. (2018). Unexpectedly high genetic diversity and divergence among populations of the
249 apomictic Neotropical tree *Miconia albicans*. *Plant Biology*, 20(2), 244-
250 251. <https://doi.org/10.1111/plb.12654>

251 Dias, A. C. C., Marinho, R. C., Sampaio, D. S., Bonetti, A. M., & Oliveira, P. E. (2021).
252 Clone worth? Genetic diversity in obligate apomictic *Miconia albicans*
253 (Melastomataceae). *Plant Biology*, 23(5), 743-748. <https://doi.org/10.1111/plb.13273>

254 Diniz-Filho, J. A. F., Soares, T. N., Lima, J. S., Dobrovolski, R., Landeiro, V. L., Telles,
255 M. P. D. C., ... & Bini, L. M. (2013). Mantel test in population genetics. *Genetics and molecular*
256 *biology*, 36, 475-485. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013000400002>

257 Eisen, J. A., & Hanawalt, P. C. (1999). A phylogenomic study of DNA repair genes,
258 proteins, and processes. *Mutation Research/DNA Repair*, 435(3), 171-213.
259 [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(99\)00050-6](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(99)00050-6)

260 Ellis, J. R., & Burke, J. M. (2007). EST-SSRs as a resource for population genetic
261 analyses. *Heredity*, 99(2), 125-132. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6801001>

262 Gitzendanner, M. A., & Soltis, P. S. (2000). Patterns of genetic variation in rare and
263 widespread plant congeners. *American journal of botany*, 87(6), 783-
264 792. <https://doi.org/10.2307/2656886>

265 Hamrick, J. L., & Schnabel, A. (1985). Understanding the genetic structure of plant
266 populations: some old problems and a new approach. In *Population genetics in forestry* (pp.
267 50-70). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-48125-3_4

268 Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T., Underwood, N., & Vellend, M. (2008).
269 Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology letters*, 11(6), 609-
270 623. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>

271 Johnson, M. T., Lajeunesse, M. J., & Agrawal, A. A. (2006). Additive and interactive
272 effects of plant genotypic diversity on arthropod communities and plant fitness. *Ecology*
273 *letters*, 9(1), 24-34.

274 Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., & Dhawan, A. K. (2011). Microsatellite
275 markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309-
276 334. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>

277 Kay M K, , Apkenas V E, Yost J M (2011). Development and characterization of a tag
278 library of expressed sequences of polymorphic microsatellite markers for the neotropical spiral
279 gingers, *Costus* (Costaceae).

280 Kay, K. M., & Schemske, D. W. (2003). Pollinator assemblages and visitation rates for
281 11 species of Neotropical *Costus* (Costaceae). *Biotropica*, 35(2), 198-
282 207. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2003.tb00279.x>

283 Koeppen, W. (1948). *Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra* (No.
284 QC861 K6).

285 Maia, F. R., Sujii, P. S., Goldenberg, R., Pereira, V. S., & Zucchi, M. I. (2016).
286 Development and characterization of microsatellite markers for *Tibouchina hatschbachii*
287 (Melastomataceae), an endemic and habitat-restricted shrub from Brazil. *Acta Scientiarum.*
288 *Biological Sciences*, 38(3), 327-332. <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v38i3.31496>

289 Maruyama, P. K., Borges, M. R., Silva, P. A., Burns, K. C., & Melo, C. (2013). Avian
290 frugivory in *Miconia* (Melastomataceae): contrasting fruiting times promote habitat
291 complementarity between savanna and palm swamp. *Journal of Tropical Ecology*, 29(2), 99-
292 109. <https://doi.org/10.1017/S0266467413000138>

293 Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating
294 intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular ecology*, 13(5), 1143-
295 1155. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x>

296 Paglia, G., & Morgante, M. (1998). PCR-based multiplex DNA fingerprinting
297 techniques for the analysis of conifer genomes. *Molecular breeding*, 4(2), 173-177.
298 <https://doi.org/10.1023/A:1009637608702>

299 Parida, S. K., Kalia, S. K., Kaul, S., Dalal, V., Hemaprabha, G., Selvi, A., ... &
300 Mohapatra, T. (2009). Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping
301 applications in sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics*, 118(2), 327-338.
302 <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0902-4>

303 Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel.
304 Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295.
305 <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>

306 Provan, J., Powell, W., & Hollingsworth, P. M. (2001). Chloroplast microsatellites: new
307 tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in ecology & evolution*, 16(3), 142-147.
308 [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)02097-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)02097-8)

309 Rosa, R. L. S. C. (1991). Abordagem preliminar das condições climáticas de Uberlândia
310 (MG). *Sociedade e natureza*, 3, 91-108. <https://doi.org/10.14393/SN-v3-1991-60693>

311 Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide
312 to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*, 9(5), 615-629.
313 <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>

314 Sharma, A., & Sharma, S. (2021). Floral morphology and reproductive biology of
315 medicinal plants: *Costus* (Costaceae). *Journal of Medicinal Plants*, 9(1), 33-36.
316 <https://doi.org/10.22271/plants.2021.v9.i1a.1246>

317 Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite
318 DNA. *Chromosoma*, 109(6), 365-371. <https://doi.org/10.1007/s004120000089>

319 Strassburg, B B N et al. (2017) Moment of truth for the Cerrado hotspot. *Nature Ecology*
320 *& Evolution* 1 (4) 1-3. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0099>

321 Schweitzer, J. A., Bailey, J. K., Hart, S. C., & Whitham, T. G. (2005). Nonadditive
322 effects of mixing cottonwood genotypes on litter decomposition and nutrient
323 dynamics. *Ecology*, 86(10), 2834-2840. <https://doi.org/10.1890/04-1955>

324

325 CONCLUSÕES GERAIS

326

327 O estudo mostrou que a distância espacial entre os indivíduos não explica as diferenças
328 de fecundidade (produção de frutos e sementes) nem de vigor resultantes do processo de
329 polinização. Cruzamentos a distâncias menores produziram maior número de frutos e
330 assementes apresentaram peso similar aquelas formadas a partir de cruzamentos a distâncias
331 maiores. Não houve evidência de que cruzamentos a maiores distâncias resultassem em
332 vantagens que ajudassem a explicar o sucesso da polinização natural por beija-flores. Na
333 verdade, os beija-flores mais comuns durante o experimento foram espécies territorialistas que
334 talvez favoreçam os cruzamentos a pequenas distâncias. Talvez a heterogeneidade polínica ou
335 as visitas repetidas propiciadas pelos beija-flores possam explicar as diferenças de fecundidade
336 e vigor observadas nas polinizações naturais nos estudos anteriores e mesmo nos nossos
337 experimentos.

338 As análises moleculares mostraram que embora a variabilidade genética encontrada para
339 *Costus spiralis* tenha sido baixa, existem diferenças entre indivíduos e heterozigotidade
340 marcada dentro das populações. Os experimentos realizados neste trabalho, baseados na
341 variação da distância espacial entre doadores e receptores de pólen e na diversidade genética
342 encontrada, sugerem que a população do estudo não é espacialmente estruturada. A análise de
343 diversidade genética sugere que há uma diversidade maior dentro dos grupos do que entre eles.
344 O que sugere que as polinizações realizadas pelo beija flor dentro do mesmo agrupamento,
345 como por exemplo, as distâncias de 10 e 60 metros (que foram realizadas dentro dos grupos),
346 podem não ser afetados pela baixa variabilidade genética ou efeito da endogamia como sugerido
347 por outros estudos. É possível pensar também que as diferenças genéticas pequenas entre as
348 subpopulações possam ser resultado de um fluxo gênico suficientemente amplo pelos beija-
349 flores, o que impediria diferenciação ou isolamento das subpopulações, pelo menos na escala
350 de distâncias estudada.

351 Os padrões observados podem estar associados a manutenção da espécie na vereda,
352 porém será necessário o desenvolvimento de outros trabalhos que investiguem outros fatores
353 que podem estar associados a estruturação desta espécie na veredas Além disso, é necessário
354 monitorar e avaliar os componentes posteriores da aptidão, pois efeito da distância pode ser
355 expresso em outras do ciclo de vida nesta espécie.

356