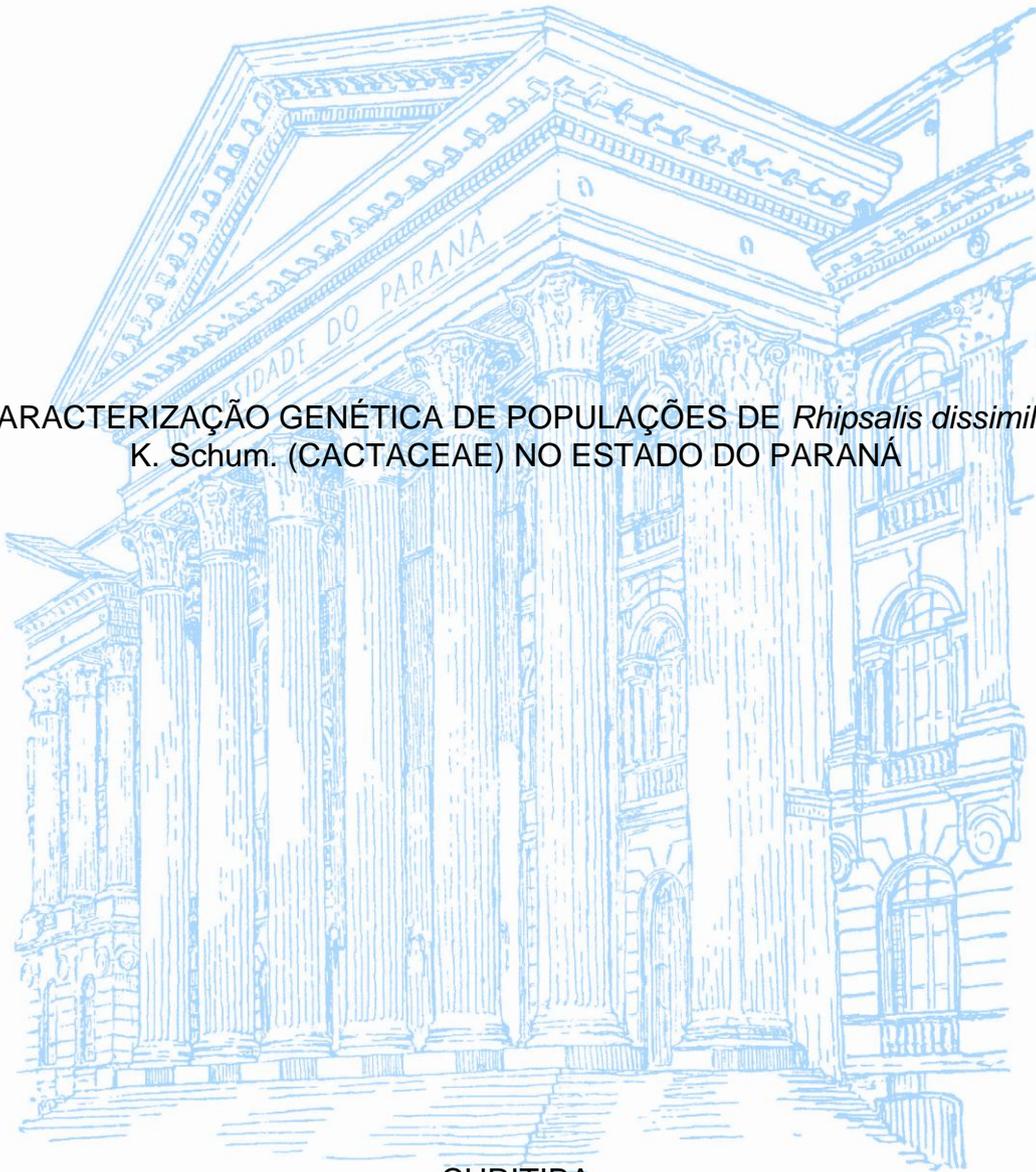


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SUELLEN DO SOCORRO GIOVANNI

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Rhipsalis dissimilis*
K. Schum. (CACTACEAE) NO ESTADO DO PARANÁ



CURITIBA

2014

SUELLEN DO SOCORRO GIOVANONI

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Rhipsalis dissimilis*
K. Schum. (CACTACEAE) NO ESTADO DO PARANÁ

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ecologia e Conservação, no Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Cunha Muschner

Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Soffiatti

CURITIBA

2014



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da dissertação de mestrado, a que se submeteu a mestranda, **Suellen do Socorro Giovanoni**, para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão da candidata.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 28 de março de 2014.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a. Dra. Valéria Cunha Muschner
Orientadora e Presidente

Prof.^a. Dra. Aline Pedroso Lorenz Lemke
Membro

Prof. Dr. Marcio Roberto Pie
Membro

Visto:

Prof.^a. Dra. Maria Regina Torres Boeger
Coordenadora do PPG-ECO

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Valéria Cunha Muschner, pela confiança, amizade e os ensinamentos sobre Ecologia Molecular!

À minha co-orientadora, Patricia Soffiatti, pelo carinho e oportunidade de estudar os cactos desde a graduação!

À dedicação dos professores do PPGECO, da secretária Valéria Romeiro e da coordenadora Maria Regina Torres Boeger.

Ao pessoal do Parque Estadual de Vila Velha, Parque Estadual do Guartelá, Reserva Ecológica Vale do Corisco e Recanto Ecológico da Dora pela prestatividade durante as coletas.

Aos colegas do laboratório de Filogenia e Genética da Conservação de Plantas!

Ao professor Walter Boeger pelas considerações no trabalho e uso do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva.

Aos amigos que ajudaram nas coletas: Carolina Scherer, Charles Sezyshta, Estevan Guilherme, Giselle Bonetti, Henrique Molina, Luciane Hulyk e Patricia Luz.

À Carolina Scherer e Jaqueline dos Santos por toda a amizade e apoio, principalmente nos momentos mais difíceis!

A todos os amigos que contribuíram para os momentos alegres durante o Mestrado!

À minha família, pelo grande apoio e compreensão.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Que a sorte me livre do mercado
e que me deixe
continuar fazendo (sem o saber)
fora de esquema
meu esquema
meu poema
inesperado

e que eu possa
cada vez mais desaprender
de pensar o pensado
e assim poder
reinventar o certo pelo errado

Ferreira Gullar

RESUMO

Populações restritas, de um modo geral, possuem menor variabilidade genética do que populações de ampla distribuição. Essa perda da diversidade genética reduz a habilidade da população em adaptar-se frente às mudanças ambientais, ficando mais propensa à extinção. Sendo assim, o trabalho pretendeu investigar a diversidade genética de populações rupícolas de *Rhypsalis dissimilis* K. Schum. (Cactaceae), que apresenta distribuição restrita e endêmica nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, ocorrendo em afloramentos rochosos associados a campos e formações de Mata Atlântica. Foram coletadas amostras em cinco populações no Estado do Paraná. Marcadores moleculares do tipo *Inter-Simple Sequence Repeats* (ISSR) foram utilizados nas análises, que incluíram cinco *primers* para 123 indivíduos. As populações analisadas apresentam baixa diversidade genética, apresentando valor médio de $H=0,103$ e baixa estruturação genética, com $F_{st}=0,018$; $G_{st}=0,020$. A AMOVA mostrou que a variação é maior entre (98%) do que dentro das populações (2%). Dada a baixa estruturação genética, a análise computada pelo programa Structure não foi capaz de detectar o possível número de agrupamentos populacionais. Tais resultados corroboram para assumir que as populações de *R.dissimilis* constituem-se de um único *pool* gênico com baixa diversidade genética. Os eventos de retração dos campos durante o Último Máximo Glacial (UMG) podem ter levado a um gargalo genético nas populações de *R. dissimilis*, sendo que grande parte das populações remanescentes permaneceram na região fitogeográfica dos Campos Gerais do Paraná. Com base nesses resultados, sugere-se que a forma epífita de *R. dissimilis* seja um meio de adaptação ao novo ambiente (por *ecological fitting*), que passou a ser mais úmido e quente durante o UMG. Embora as populações de *R.dissimilis* rupícolas apresentem baixa diversidade genética, elas podem apresentar fácil adaptação a novos ambientes pelo mecanismo de *ecological fitting*, o que pode ter favorecido o estabelecimento da espécie na forma epífita em meio às novas condições ambientais.

Palavras-chave: Campos Gerais do Paraná, diversidade genética, *ecological fitting*.

ABSTRACT

Overall, restricted populations have less genetic variation than populations of wide distribution. This loss of genetic diversity reduces the ability of the population to evolve in the face of environmental change, becoming more prone to extinction. Thus, the study was to investigate the genetic diversity of populations *Rhipsalis dissimilis* K. Schum. (Cactaceae), an endangered and endemic species of the Atlantic Rain Forest. Samples were collected from five populations in the State of Paraná. Molecular analyzes were by molecular markers of Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) and included five primers for 123 individuals. The populations have low genetic diversity, with a mean value of $H = 0,103$ and low genetic structure, with $F_{st} = 0,018$; $G_{st} = 0,020$. The hierarchical AMOVA is greater among populations (98%) than within populations (2%). Given the low genetic structure, the analysis by the Structure program was unable to detect the possible number of population groups. These results assume that *R.dissimilis* populations constitute a single gene pool with low genetic diversity. The events of retraction of the subtropical grasslands during the Last Glacial Maximum (LGM) may have led to a genetic bottleneck in populations of *R.dissimilis*, and most of the actual populations is remained in the phytogeographical region of Campos Gerais of Paraná. It is suggested that the epiphytic form of *R. dissimilis* is a form of adaptation to the new environment (ecological fitting), which became more humid and warm during the LGM. Although *R.dissimilis* rupicolous populations have low genetic diversity, they can present easy adaptation to new environments by ecological fitting mechanism, which may have favored the establishment of epiphytic species form through the new environmental conditions.

Keywords: Campos Gerais of Paraná, genetic diversity, ecological fitting.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - MAPA DO PARANÁ COM A LOCALIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES AMOSTRADAS DE *RHIPSALIS DISSIMILIS*..... 19
- FIGURA 2 - *RHIPSALIS DISSIMILIS*. A. INDIVÍDUO COM FRUTOS MADUROS. B. CAULE COM FLORES. C. INDIVÍDUOS INDICADOS POR CÍRCULO TRACEJADO. D. AFLORAMENTO ROCHOSO COM OCORRÊNCIA DA ESPÉCIE..... 20
- FIGURA 3 – PERFIL DE UM GEL DE ISSR UTILIZANDO O MARCADOR [(CTC)₄RC] EM 19 AMOSTRAS DE DIFERENTES POPULAÇÕES DE *RHIPSALIS DISSIMILIS*; À ESQUERDA, PADRÃO DE PESO MOLECULAR DE 100PB (M)..... 24
- FIGURA 4 – DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA (DISTÂNCIAS GENÉTICAS DE NEI (1972)) OBTIDO PARA AS POPULAÇÕES DE *RHIPSALIS DISSIMILIS* PELO CRITÉRIO DE AGRUPAMENTO UPGMA. 26
- FIGURA 5 - VALORES DE ΔK SEGUNDO EVANNO *ET AL.* 2005, COM MAIOR VALOR PARA K=5.....30
- FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA ANÁLISE COMPUTADA PELO STRUCTURE COM K=5. OS GRUPOS GEOGRÁFICOS ESTÃO REPRESENTADOS NO EIXO DAS ABCISSAS; OS GRUPOS K ESTIMADOS ESTÃO REPRESENTADOS POR CORES DIFERENTES. NO EIXO DAS ORDENADAS PODE-SE OBSERVAR A PROPORÇÃO DE INDIVÍDUOS DAS POPULAÇÕES GEOGRÁFICAS DENTRO DE CADA VALOR DE K. 28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DADOS DAS LOCALIDADES DE COLETA DE <i>RHIPSALIS DISSIMILIS</i>	19
TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES E TEMPERATURA DE ANELAMENTO DA PCR DE ACORDO COM O <i>PRIMER</i> UTILIZADO.....	21
TABELA 3 - PORCENTAGEM DE BANDAS POLIMÓRFICAS POR <i>PRIMER</i> UTILIZADO.....	25
TABELA 4 – NÚMERO EFETIVO DE ALELOS (NE) (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO), VALORES DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE NEI (H) (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO), ÍNDICE DE SHANNON (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO) E PORCENTAGEM DE BANDAS POLIMÓRFICAS (PBP) APRESENTADO NAS POPULAÇÕES DE <i>RHIPSALIS DISSIMILIS</i> PARA (N) INDIVÍDUOS.....	25
TABELA 5 - MATRIZ DE DISTÂNCIA GEOGRÁFICA (EM KILÔMETROS) ENTRE AS POPULAÇÕES DE <i>RHIPSALIS DISSIMILIS</i>	26
TABELA 6 - MATRIZ DE DISTÂNCIA GENÉTICA DE NEI (1978) ENTRE AS POPULAÇÕES DE <i>RHIPSALIS DISSIMILIS</i>	27
TABELA 7 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) PARA AS POPULAÇÕES DE <i>RHIPSALIS DISSIMILIS</i>	27
TABELA 8 - PROPORÇÃO DE INDIVÍDUOS (QI) PARA OS CINCO GRUPOS DEFINIDOS PELO PROGRAMA STRUCTURE PARA AS POPULAÇÕES DE <i>RHIPSALIS DISSIMILIS</i>	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 COLETA E ÁREA DE AMOSTRAGEM.....	18
2.2 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO PELA PCR.....	21
2.3 ANÁLISE DOS DADOS.....	22
3 RESULTADOS.....	24
4 DISCUSSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	42

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos da Biologia da Conservação é a manutenção da diversidade genética através da preservação de populações visando a sua adaptação frente às mudanças ambientais (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Em geral, populações pequenas passam por endogamia acelerada e têm menor variabilidade genética do que grandes populações, ficando, portanto, mais propensa à extinção (FALK; HOLSINGER, 1991). A perda da diversidade genética populacional leva à redução do valor adaptativo e perda da habilidade de adaptação frente às mudanças ambientais (REED; FRANKHAM, 2003).

A variabilidade e estruturação genética das populações resultam da ação combinada da mutação, migração, seleção e deriva, as quais operam juntamente com os fatores ecológicos da espécie (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Espécies que, atualmente, constituem populações pequenas podem ter tido ampla distribuição no passado (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Essas populações, devido a eventos estocásticos, reduziram o tamanho populacional e ficaram mais suscetíveis à perda de diversidade genética, principalmente por deriva (FALK; HOLSINGER, 1991). Dentre os fatores ecológicos, a reprodução apresenta grande possibilidade de influenciar na estruturação das populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Uma grande proporção das angiospermas reproduz-se de forma sexuada e assexuada (VALLEJO-MARÍN, DORKEN; BARRET, 2010). Populações de espécies que se reproduzem sexuadamente, onde o fluxo via pólen é promovido, por exemplo, via insetos territorialistas, tendem a ter estruturação populacional, pois o fluxo gênico será promovido em maior parte dentro de cada população, resultando em subdivisão populacional (LOVELESS; HAMRICK, 1984). A reprodução assexuada, apesar de levar a homogeneização dos genótipos, pode levar a subdivisão populacional, pois muitos indivíduos de uma mesma população são provenientes de um mesmo genótipo (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Embora as populações pequenas estejam mais suscetíveis às mudanças ambientais, os mecanismos envolvidos no *ecological fitting* podem reverter essa situação. O *ecological fitting* é um processo no qual o organismo tem a habilidade de colonizar novos ambientes e formar novas interações, devido a um conjunto de propriedades intrínsecas de que o indivíduo dispõe no momento (AGOSTA; KLEMENS, 2008). Essas propriedades são resultantes da conservação filogenética, plasticidade fenotípica e da evolução de caracteres relacionados que atuam formando um *fitness* potencial para a espécie ocupar novos ambientes (AGOSTA; KLEMENS, 2008). Em contato com um novo ambiente, o organismo passará a utilizar algumas dessas propriedades adquiridas (formando o *fitness* realizado) e acaba por se estabelecer no novo local. O estabelecimento do organismo em um novo local promove interações novas com outros organismos e outras forças evolutivas passam a atuar sobre ele (AGOSTA; KLEMENS, 2008). O *ecological fitting* combina o potencial intrínseco do organismo em ocupar um novo ambiente com as novas oportunidades de interações presentes nesse novo ambiente (AGOSTA; KLEMENS, 2008).

A família Cactaceae, com cerca de 1438 espécies, (HUNT; TAYLOR; CHARLES, 2006) é a segunda maior família de plantas superiores exclusivas do continente americano, perdendo apenas para Bromeliaceae (TAYLOR; ZAPPI, 2004). A família é subdividida em quatro subfamílias (ANDERSON, 2001), onde Cactoideae destaca-se como a maior, em número de espécies, e mais diversificada, estando subdividida em nove tribos (TAYLOR; ZAPPI, 2004). Destas, Cereeae e Rhipsalideae são as mais representativas no Brasil (TAYLOR; ZAPPI, 2004).

A tribo Rhipsalideae possui centro de diversidade na Floresta Atlântica onde as espécies ocorrem desde o litoral até cerca de 2000 metros (m) de altitude e muitas são endêmicas, sendo a maioria de hábito epífita (TAYLOR, 1997). Membros dessa tribo apresentam caules pouco suculentos, geralmente pendentes, com raízes adventícias e aréolas geralmente sem espinhos (CALVENTE, 2010). A classificação mais recente da tribo reconhece quatro gêneros – *Rhipsalis*, *Hatiora*, *Lepismium* e *Schlumbergera* – sendo *Rhipsalis* o maior deles em número de espécies (CALVENTE, 2012).

Rhipsalis é subdividido em 33 espécies e três subgêneros (CALVENTE, 2012). As espécies de *Rhipsalis* são em sua maioria constituídas por plantas epífitas, algumas rupícolas ou terrestres, com caules cilíndricos, aplanados ou angulados e flores, em geral, pequenas (CALVENTE, 2012). Cerca de 80% das espécies do gênero são endêmicas ao Brasil (CALVENTE, 2010). A destruição das formações florestais vem acarretando a perda de muitas espécies deste grupo, onde várias delas encontram-se na “Lista Vermelha” da *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (OLDFIELD, 1997), como vulneráveis ou mesmo, extintas (CALVENTE, 2010). Aliado ao impacto causado pela perda de habitats e coleta indiscriminada das espécies para o comércio, a vulnerabilidade de *Rhipsalis* e dos demais gêneros de Cactaceae inclui principalmente o longo ciclo de vida das espécies e as baixas taxas de crescimento e recrutamento das populações (ANDERSON, 2001; VALVERDE *et al.* 2004; ESPARZA-OLGUIN; VALVERDE; MADUJANO, 2005).

A maioria dos estudos em genética de populações de Cactaceae envolvem as formas colunares da subfamília Cactoideae (FIGUEIREDO *et al.* 2010). No geral, as formas colunares, inclusive as espécies de distribuição restrita, apresentam altos índices de variabilidade genética em nível de espécie e populações (FIGUEIREDO *et al.* 2010). Um trabalho envolvendo espécies de cactos colunares de distribuição restrita do Sul e Sudeste do Brasil verificou alta variabilidade genética por meio de alozimas em *Praecereus euchlorus*, *Facheiroa squamosa*, *Pilosocereus vilaboensis*, *P. aureispinus* e *P. machrisii* (MORAES *et al.* 2005). Os autores explicam a alta variabilidade genética devido a uma possível conexão entre as populações que passaram por retração durante o Quaternário, o que acabou por amenizar os efeitos da deriva genética (MORAES *et al.* 2005). Em Cactaceae, a baixa variabilidade genética foi encontrada por meio de alozimas para os cactos de forma globosa e de distribuição restrita, *Discocactus* (MACHADO, 2004) e *Melocactus* (NASSAR; HAMRICK; FLEMING 2001; LAMBERT; BORBA; MACHADO, 2006; LAMBERT *et al.* 2006), que geralmente ocorrem em populações pequenas e endêmicas. Ausência de variabilidade genética foi verificada em populações de *Consolea corallicola* por ISSR (CARIAGA *et al.* 2005) e *Haageocereus tenuis*, por marcadores microssatélites (ARAKARI *et al.* 2013). Segundo os autores, a

baixa variabilidade genética encontrada nesses estudos pode estar associada a possíveis eventos de gargalos genéticos.

Rhipsalis dissimilis K. Schum. é conhecida pelas formas epífita e rupícola (TAYLOR, 1997). A forma epífita possui registro de ocorrência para os Estados de São Paulo (uma localidade), Paraná (quatro localidades) e Santa Catarina (uma localidade) (ANEXOS 1, 2 e 3). A forma rupícola conta com o maior número de registros, sendo que no Estado do Paraná a espécie é documentada para seis cidades, São Paulo com três ocorrências e Santa Catarina com duas ocorrências (ANEXOS 1, 2 e 3). Há inclusive registros de *R. dissimilis* de 1915 para os Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, mas sem informação sobre a forma (ANEXO 1). A forma rupícola é a mais recorrente e possui como características morfológicas caule de até 70 centímetros (cm) de altura, flores hermafroditas de cor amarelo-alvo e frutos de cor rósea à vinácea (SOLLER, 2012). *Rhipsalis dissimilis* é a única espécie rupícola do gênero no Estado do Paraná (SOLLER, 2012) e está ameaçada de extinção segundo a *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* ocupando uma área menor do que 500 km² (IUCN, 2014).

A área de ocorrência da forma rupícola de *R. dissimilis* no Paraná envolve a região fitogeográfica dos Campos Gerais, situado na borda do Segundo Planalto Paranaense (MAACK, 2002). Os Campos Gerais formam um mosaico natural constituído por estepes gramíneo-lenhosas (VELOSO; RANGEL FILHO; LIMA 1991) associadas a capões de Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Aluvial e Savana (MELO; MORO; GUIMARÃES, 2007). Os afloramentos rochosos abrigam a maioria das espécies endêmicas da região, como o cacto *Parodia ottonis* var. *vilavelhensis* (Lehmann) N.P. Taylor (MELO; MORO; GUIMARÃES, 2007). Nessa subunidade fitogeográfica a vegetação se desenvolve em áreas planas e em meio às cavidades das rochas, às vezes sobre uma fina camada de solo (MELO, MORO; GUIMARÃES, 2007). Até o momento, não consta na literatura estudos sobre a biologia reprodutiva e de polinização de espécies de *Rhipsalis*. As flores de *Rhipsalis dissimilis* são pequenas e alvas, provavelmente polinizadas por insetos (CALVENTE *et.al.* 2011). Em Cactaceae, a propagação vegetativa é comum (ANDERSON, 2001) e a proximidade entre os indivíduos de *R. dissimilis*

pode ser um indicativo da ocorrência desse mecanismo de reprodução. Os frutos de *Rhipsalis dissimilis* apresentam coloração avermelhada e polpa succulenta, com possibilidade de dispersão por aves, conforme observado em outras espécies do gênero (GUARALDO *et al.* 2013).

Dentre os mecanismos que promovem o *ecological fitting*, a plasticidade fenotípica e a conservação filogenética são relatados para *R. dissimilis* (CALVENTE *et al.* 2011; GIOVANONI, 2012). Na reconstrução da filogenia para o gênero *Rhipsalis*, verificou-se que o epifitismo é uma característica ancestral, seguido de múltiplas transições independentes para o hábito rupícola (CALVENTE *et al.* 2011). A espécie *R. dissimilis* apresenta como condição ancestral o hábito epífita (CALVENTE *et al.* 2011), o que sugere que este hábito seja uma conservação filogenética da espécie. Em estudo sobre a plasticidade fenotípica da forma rupícola de *R. dissimilis*, todas as características morfológicas e anatômicas analisadas foram estatisticamente diferentes entre as populações do Parque Estadual de Vila Velha (PR) e Parque Estadual do Guartelá (PR) (GIOVANONI, 2012). Associam-se estas diferenças às condições climáticas distintas de cada localidade, sendo que na região do Parque Estadual do Guartelá, há uma maior insolação com temperaturas médias nos meses mais quentes superiores à da região do Parque Estadual de Vila Velha. Isso implica em uma plasticidade fenotípica para a espécie, onde a população do P.E. Guartelá apresenta indivíduos mais robustos, com maior acúmulo de tecidos protetores (epiderme) e armazenador de água (córtex) devido às condições climáticas da localidade (GIOVANONI, 2012).

A caracterização genética de duas populações da forma rupícola de *R. dissimilis* foi investigada por Giovanoni (2012). Para o espaçador intergênico *trnH-psbA* do cpDNA (277 nucleotídeos), a autora analisou 17 amostras das populações do Parque Estadual do Guartelá (Tibagi, Paraná) e 14 amostras do Parque Estadual de Vila Velha (Ponta Grossa, Paraná). Para o espaçador intergênico *trnS-trnG* do cpDNA (609 nucleotídeos), foram analisadas três amostras das populações do Parque Estadual do Guartelá e sete amostras do Parque Estadual de Vila Velha. Embora não se tenha detectado nenhuma variação nucleotídica pelos espaçadores *trnH-psbA* e *trnS-trnG*, *R. dissimilis*

apresentou alta plasticidade fenotípica (GIOVANONI, 2012). Dentre as características morfológicas e anatômicas analisadas no trabalho, todas foram estatisticamente diferentes entre as duas populações e podem ser atribuídas à alta plasticidade fenotípica da espécie (GIOVANONI, 2012). Em estudo envolvendo duas espécies de cactos, *Lophocereus*, *L. gatesii* e *L. schottii* foram utilizados três espaçadores intergênicos de cloroplasto (*trnL-trnF*, *trnC-trnD* e *trnS-trnM*) e não foi encontrada variabilidade nucleotídica nos 1960 pares de bases sequenciados (HARTMANN; NASON; BHATTACHARYA, 2002). Isso pode ser devido à origem relativamente recente dos cactos colunares na América do Norte e/ou resultado de gargalos genéticos em períodos de expansão e retração populacional (HARTMANN; NASON; BHATTACHARYA, 2002). Nesse estudo, os autores sugerem que táxons de recente diversificação possuem baixos níveis de variação nessas regiões do DNA (HARTMANN; NASON; BHATTACHARYA, 2002).

Níveis baixos de diversidade genética por meio de sequências de DNA também foram verificados em espécies de *Opuntia* do arquipélago de Galápagos (HELSEN *et al.* 2009b). De 2202 pares de base (pb) analisados, 38 sítios foram variáveis em *Opuntia*, sendo que o espaçador intergênico de cloroplasto *trnT-trnL* revelou seis sítios variáveis em 567 pb, os espaçadores internos transcritos do DNA nuclear ribossomal (ITS) apresentaram 18 sítios variáveis em 631 pb e o gene nuclear *PhyC* apresentou 14 sítios variáveis em 1004 pb sequenciados (HELSEN *et al.* 2009b). Em estudo envolvendo as cactáceas hemi-epífitas *Hylocereus ocamponis*, *H. purpusii*, *H. undatus*, *Selenicereus grandiflorus* e *S. testudo*, foram utilizados como marcadores os espaçadores intergênicos *trnH-psbA*, *trnL-F*, *matK* e *rbcL* (AGUILAR *et al.* 2013). Como resultado, os autores encontraram pouca variabilidade nucleotídica, sendo que em *trnH-psbA* foram analisados 397 sítios e somente 13 foram variáveis e um foi informativo para os dois gêneros (AGUILAR *et al.* 2013). Para *trnL-trnF* foram analisados 998 sítios, sendo que 59 foram variáveis e somente 13 informativos para os gêneros estudados (AGUILAR *et al.* 2013). No gene cloroplasmático *matK*, onde se analisou 794 sítios, apenas quatro foram variáveis para as espécies de *Selenicereus* e nenhum foi informativo em *Hylocereus* (AGUILAR *et al.* 2013). Esses estudos indicam uma

limitação no uso de sequências de cloroplasto para analisar a diversidade intraespecífica em Cactaceae pois, para outros grupos de plantas, esses marcadores têm mostrado suficiente variação (HARTMANN; NASON; BHATTACHARYA, 2002).

A técnica de *Inter-Simple Sequence Repeat* (ISSR) envolve a amplificação de segmentos de DNA, os quais estão presentes entre duas repetições idênticas de regiões microssatélites de direções opostas (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002). A técnica utiliza como *primers* as regiões microssatélites distribuídas ao longo do genoma, formadas por repetições de dois a cinco nucleotídeos em tandem (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002). As regiões geralmente estão ancoradas às extremidades 5' e 3' e possuem de uma a quatro bases degeneradas na sequência flanqueadora (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). Os marcadores ISSR são dominantes, seguem a herança Mendeliana e possuem grande polimorfismo e reprodutibilidade (GUPTA *et al.* 1994; REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002). Para o marcador ISSR, a diversidade genética ou heterozigosidade esperada são as frequências dos alelos dominantes e dos alelos nulos (visualmente ausentes) (WALLACE, 2003). Em geral, a técnica resulta em um maior número de loci polimórficos se comparado às técnicas de alozimas e RAPD, muito utilizadas em Cactaceae (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002, CARIAGA *et al.* 2005, FIGUEIREDO *et al.* 2010). O marcador começou a ser utilizados no ano de 1994 e desde então é utilizado com sucesso em estudos de sistemática, diversidade genética intra e interpopulacional e investigação de espécies híbridas (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002).

Dada a importância em se investigar a diversidade genética de populações pequenas, visando a sua conservação, este estudo pretendeu investigar a genética populacional de uma espécie ameaçada, *Rhipsalis dissimilis* forma rupícola, por meio dos marcadores ISSR, com o objetivo de conduzir a uma maior compreensão sobre os fatores que podem ter atuado nos Campos Gerais do Paraná e levado à baixa variabilidade genética e tamanho populacional reduzido dessa espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA E ÁREA DE AMOSTRAGEM

As amostras de *Rhipsalis dissimilis* da forma rupícola (FIGURAS 2A, 2B e 2C) foram coletadas em cinco localidades, distribuídas em três cidades do Estado do Paraná na região dos Campos Gerais (Autorização do Instituto Ambiental do Paraná número 208.11) (FIGURA 1; TABELA 1). Cada localidade foi considerada uma população. A população coletada no Parque Estadual de Vila Velha (VV) e na propriedade particular Cachoeira da Mariquinha (CM) localizam-se no município de Ponta Grossa, enquanto que a população do Parque Estadual do Guartelá (GT) e a da propriedade particular Recanto Ecológico da Dora (RD) encontram-se no município de Tibagi. A população mais distante (em km) é a da Reserva Particular de Patrimônio Natural Vale do Corisco (VC), no município de Sengés. Nos Campos Gerais há a ocorrência do clima do tipo Cfa (clima temperado úmido com verão quente) e Cfb (clima temperado úmido com verão temperado) (MELO; MORO; GUIMARÃES, 2007). Em Ponta Grossa, segundo a classificação de Köppen, o clima é do tipo Cfb ou seja, não ocorre estação seca definida e a temperatura média no mês mais quente é inferior a 22°C e no mês mais frio é inferior a 18°C (INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ, 2004). As geadas são severas e mais frequentes em relação ao clima Cfa (INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ, 2004). Em Tibagi e Sengés segundo a classificação de Köppen é do tipo Cfa, ou seja, mesotérmico, sem estação seca, com verões quentes e com média do mês mais quente superior a 22 °C, sendo as geadas frequentes e recebe influência indireta do clima Cfb (INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ, 2004).

Foram coletadas amostras do caule e considerou-se como um indivíduo o conjunto de ramos (FIGURA 2D). Foi feita uma busca por novos registros de populações de *R. dissimilis* nas localidades Salto Santa Rosa, em Tibagi (24°33'44"S; 50°31',63" W) e na propriedade particular Fazenda das Almas, em Piraí do Sul (24° 32' 23" S, 49° 55' 40" W), mas não foi encontrado nenhum indivíduo nos afloramentos rochosos.

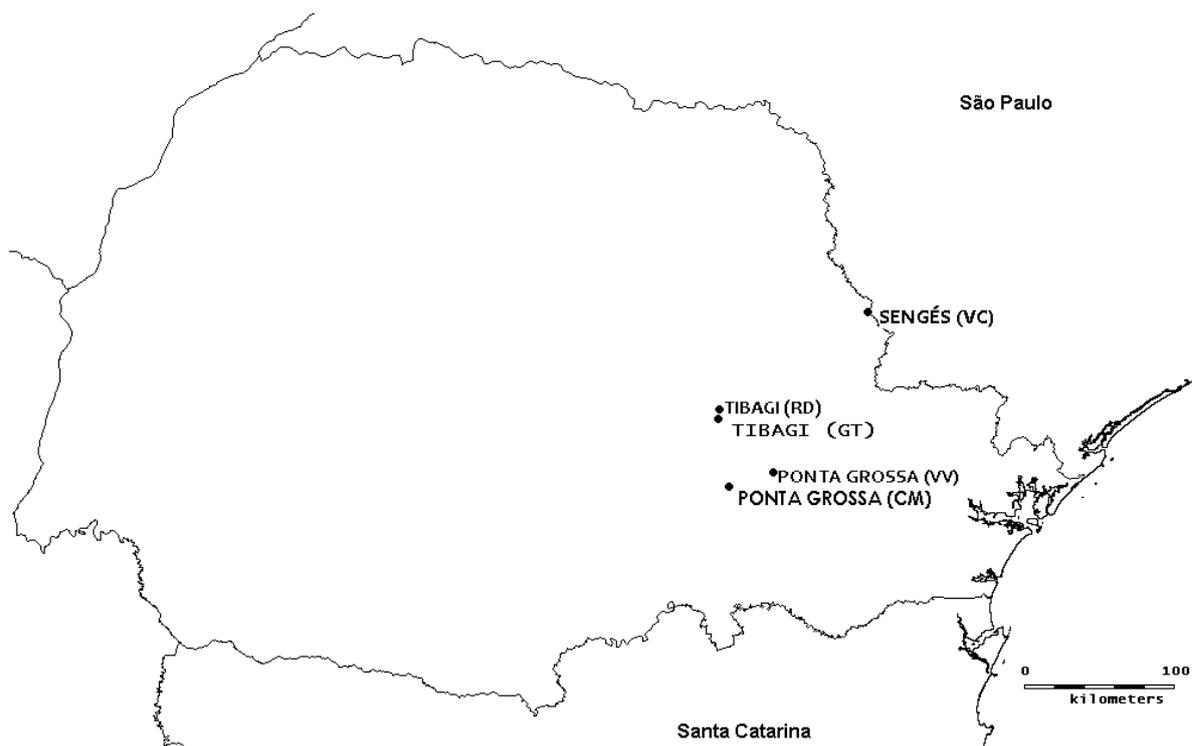


FIGURA 1 - MAPA DO PARANÁ COM A LOCALIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES AMOSTRADAS DE *RHIPSALIS DISSIMILIS*.

TABELA 1 - DADOS DAS LOCALIDADES DE COLETA DE *RHIPSALIS DISSIMILIS*.

CÓDIGO	LOCALIDADE	MUNICÍPIO	COORDENADAS	ALTITUDE (m)
VV	Parque Estadual de Vila Velha	Ponta Grossa	25 17' 38" S 50 12' 50" W	917
CM	Propriedade particular Cachoeira da Mariquinha	Ponta Grossa	25 12' 11" S 49 56' 39" W	940
GT	Parque Estadual do Guartelá	Tibagi	24 48' 54" S 50 16' 10" W	830
RD	Propriedade particular Recanto Ecológico da Dora	Tibagi	24 42' 19" S 50 19' 05" W	800
VC	Reserva Particular de Patrimonio Natural Vale do Corisco	Sengés	24 12' 26" S 49 21' 22" W	888

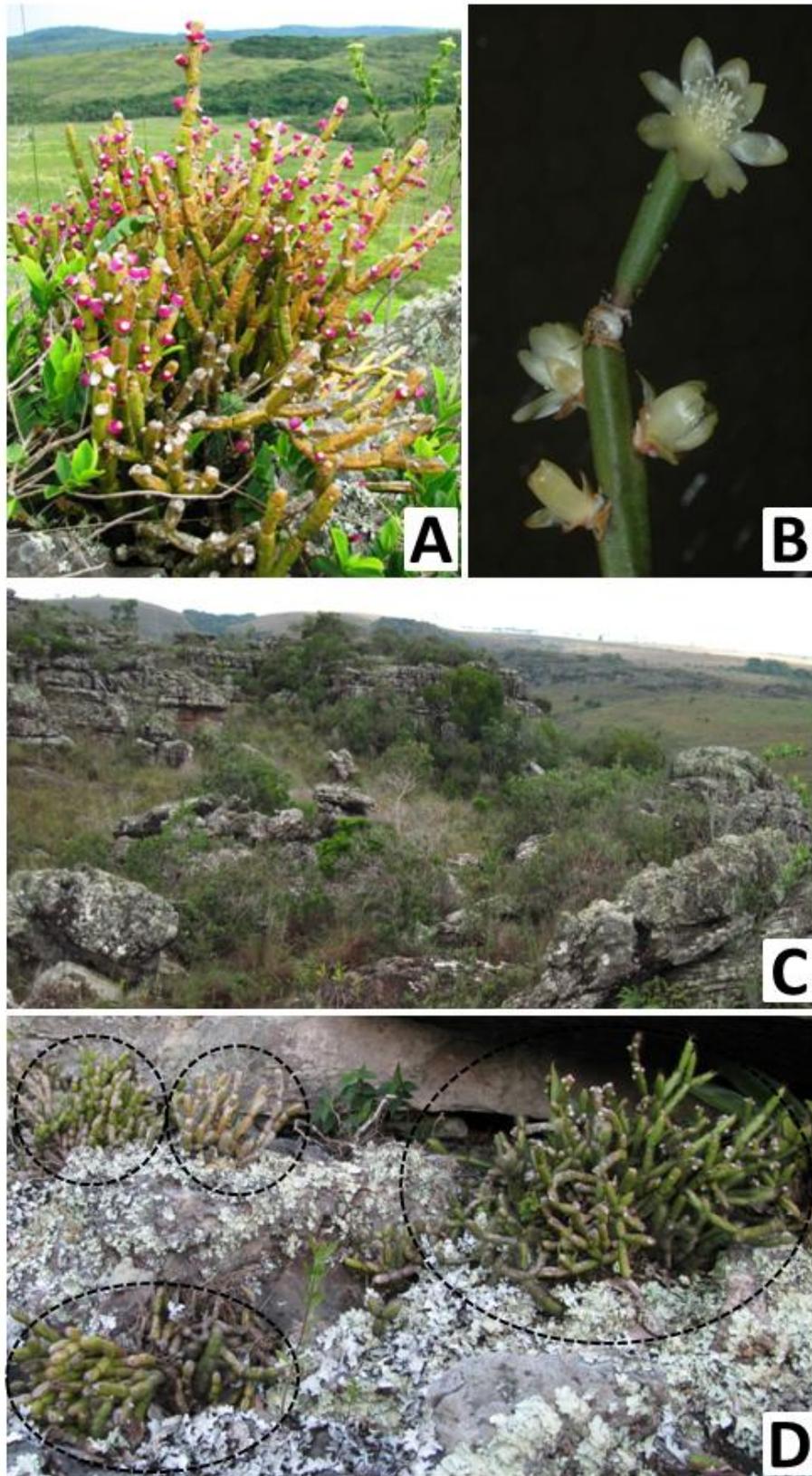


FIGURA 2 - *RHIPSALIS DISSIMILIS*. A. INDIVÍDUO COM FRUTOS MADUROS. B. CAULE COM FLORES. C. INDIVÍDUOS INDICADOS POR CÍRCULO TRACEJADO. D. AFLORAMENTO ROCHOSO COM OCORRÊNCIA DA ESPÉCIE. FONTE: IMAGENS A, C e D: A AUTORA. IMAGEM B: RENATO GOLDENBERG.

2.2 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO PELA PCR

As amostras do caule de cada indivíduo foram seccionadas por meio de lâmina descartável de aço. Para remover mucilagem e fibras das amostras, foram selecionados os cortes com epiderme e parênquima clorofiliano. As secções foram desidratadas em sílica gel e maceradas em nitrogênio líquido. A extração do DNA foi realizada por meio do kit Biopur (Biometrix) de acordo com as instruções do fabricante e por meio do protocolo CTAB modificado (DOYLE; DOYLE, 1987). O DNA foi quantificado por meio de espectrofotômetro GeneQuant Pro. Para as amostras extraídas pelo método CTAB realizou-se a purificação do extrato por polietilenoglicol 20% para remoção dos compostos secundários.

Foram testados nove *primers*, sendo que cinco amplificaram satisfatoriamente pela *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Para cada *primer* foi estabelecida uma concentração diferente de reagentes, com volume final de 25 microlitros (μ l) (TABELA 2). As reações foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient Eppendorf) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto (min) e 30 segundos (s), seguido de 40 ciclos com temperatura de anelamento que variaram entre 42,2°C e 45,1°C de acordo com o *primer* (TABELA 2) por 45 s, extensão a 72°C por 1 min e 30 s e extensão final a 72°C por 10 min.

TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES E TEMPERATURA DE ANELAMENTO DA PCR DE ACORDO COM O *PRIMER* UTILIZADO.

<i>PRIMER</i> (SEQUÊNCIA)	<i>PRIMER</i> (μ M)	dNTP (mM)	MgCl ₂ (mM)	TAQ POLIMERASE (U)	BSA (mg/mL)	DNA (ng)	ANELAMENTO (°C)
[(GT) ₇ YG]	1,2	0,25	2	1	0,01	35	42,2
[(GA) ₇ YC]	1,2	0,25	2	2	0,01	35	42,2
(CTC) ₄ RC	1,2	0,4	3	1,5	0,01	30	45,1
[(GA) ₈ YT]	0,6	0,25	2	1	0,01	35	42,2
[(AC) ₇ RG]	1,2	0,25	2	1	-	36	42,2

A eletroforese foi conduzida em gel de agarose 2% a 80 Volts por quatro horas com marcador de peso molecular de 100 pb. As amostras foram dispostas em posições aleatórias, formando géis com amostras de diversos indivíduos, de diferentes populações.

Ao final, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo por 30 min e fotografado em transiluminador de luz ultravioleta (UVP MultiDoc-It).

2.3 ANÁLISE DOS DADOS

Os indivíduos que amplificaram para apenas um *primer* foram excluídos das análises, totalizando 123 indivíduos. O peso molecular dos fragmentos de ISSR amplificados foi determinado com o auxílio do programa GelAnalyzer 2010a (LAZAR, 2010). Os fragmentos de baixa resolução foram excluídos e os demais foram codificados para presença (1) ou ausência (0) de bandas homólogas.

A estimativa dos parâmetros de diversidade genética – número efetivo de alelos (N_e), diversidade genética de Nei (H), índice de Shanon (I) e porcentagem de bandas polimórficas (PBP) - foram analisados por meio do programa POPGENE 1.31 (YEH, YANG; BOYLE, 1999). Com base nos valores das distâncias genéticas de Nei (D) (1978), foi elaborado um dendrograma por UPGMA através do programa POPGENE 1.31 (YEH, YANG; BOYLE, 1999). Para testar a correlação entre as distâncias genéticas de Nei (D) e geográficas, utilizou-se o teste de Mantel (1967) implementado no programa Arlequin 3.0 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005), com 10.000 permutações em três corridas independentes, pelo método de distâncias pareadas (WEIR; COCKERHAM, 1984).

A distribuição da variação genética entre e dentro das populações foi quantificada por meio da Análise de Variância Molecular (AMOVA) no programa Arlequin 3.0 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005). A significância da variação de cada componente foi testada com 10.000 permutações. Para marcadores dominantes, a diferenciação genética entre populações geralmente é estimada pelo G_{st} (NEI, 1973). Quando há dois alelos em um *locus*, como ocorre nos marcadores dominantes, o valor de G_{st} é

idêntico ao de F_{st} de Wright (NEI, 1973). O G_{st} foi estimado pelo software Hickory versão 1.1 (HOLSINGER; LEWIS, 2003) a partir dos seguintes parâmetros: burn-in=100.000; número de replicações =1.000.000; thinning =50, para o modelo f-free [modelo sugerido pelos autores, pois este seleciona valores de coeficiente de endogamia aleatoriamente considerando a sua distribuição prévia, já que o coeficiente de endogamia para dados de marcadores dominantes não é confiável], em três corridas independentes.

Adicionalmente, para a detecção do número de populações prováveis (K), foi conduzida uma análise Bayesiana por meio do programa STRUCTURE 2.3.4 (FALUSH; STEPHENS; PRITCHARD, 2007). Assumiu-se o modelo admixture, conforme recomendado por Falush; Stephens e Pritchard (2007) para marcadores dominantes. O modelo admixture é o mais provável de ocorrer na natureza, pois considera que o genótipo de um indivíduo provém de uma ou mais populações (FALUSH; STEPHENS; PRITCHARD, 2007). Para a análise, considerou-se que o número de K poderia variar entre 1 a 6. Um total de cinco corridas para cada valor de K foi feito com 1.000.000 iterações e burn-in de 100.000 iterações. O valor mais provável de K foi determinado a partir da mudança na probabilidade dos dados entre os valores de K correspondentes (ΔK), como proposto por Evanno, Regnaut e Godet (2005). Os valores de ΔK foram estimados pelo website Structure Harvester v0.6.93 (EARL *et al.* 2012).

3 RESULTADOS

Para os 123 indivíduos de *Rhipsalis dissimilis* analisados, foram obtidos 397 *loci* polimórficos a partir de cinco *primers*. Os marcadores ISSR apresentaram elevada porcentagem de bandas polimórficas, com valores entre 97 e 100% (TABELA 3). O padrão de amplificação para um dos marcadores pode ser observado no gel da figura 3.

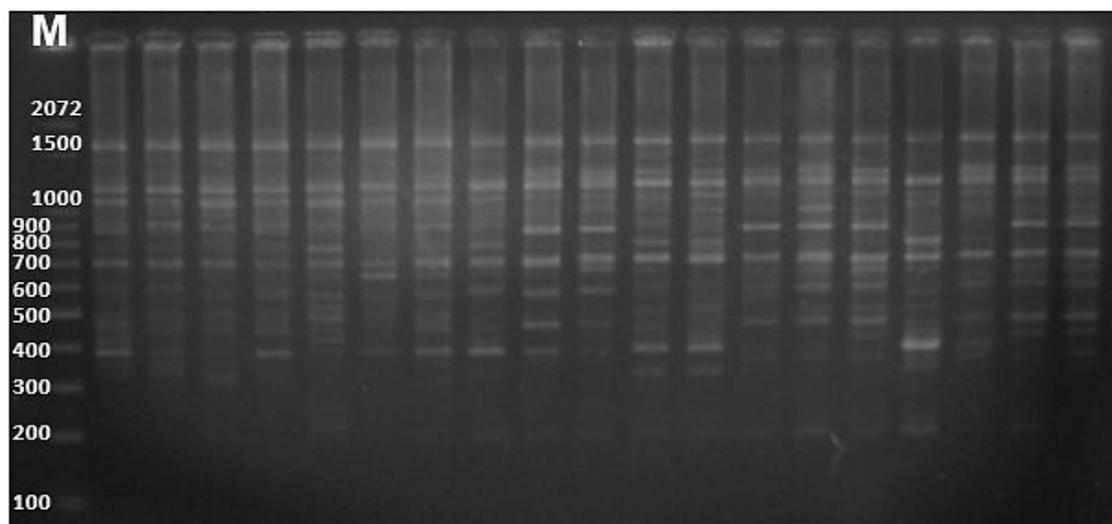


FIGURA 3 – PERFIL DE UM GEL DE AGAROSE DO MARCADOR ISSR [(CTC)₄RC] EM 19 AMOSTRAS DE DIFERENTES POPULAÇÕES DE *RHIPSALIS DISSIMILIS*; À ESQUERDA, PADRÃO DE PESO MOLECULAR DE 100PB (M).

Os valores correspondentes ao número efetivo de alelos (N_e), diversidade genética de Nei (H) e Índice de Shannon (I) foram baixos em nível de espécie e populações (TABELA 4). O valor médio da porcentagem de bandas polimórficas nas populações foi 53,55%. Em nível de espécie, a média da porcentagem de bandas polimórficas apresentou o elevado valor de 99% (TABELA 4). As populações de *R. dissimilis* apresentaram o valor médio da diversidade genética correspondente a 0,103 (TABELA 4). A população VV apresentou os maiores valores de N_e , H , I e PBP (TABELA 4).

TABELA 3 - PORCENTAGEM DE BANDAS POLIMÓRFICAS POR *PRIMER* UTILIZADO.

<i>PRIMER</i> (SEQUÊNCIA)	BANDAS POLIMÓRFICAS
[(GT)7YG]	100%
[(GA)7YC]	97,26%
(CTC)4RC	99,02%
[(GA)8YT]	100%
[(AC)7RG]	98,82%

TABELA 4 – NÚMERO EFETIVO DE ALELOS (NE) (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO), VALORES DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE NEI (H) (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO), ÍNDICE DE SHANNON (I) (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO) E PORCENTAGEM DE BANDAS POLIMÓRFICAS (PBP) APRESENTADO NAS POPULAÇÕES DE *RHIPSALIS DISSIMILIS* PARA (N) INDIVÍDUOS.

POPULAÇÃO	Ne	H	I	PBP (%)	N
CM	1,145 (0,211)	0,104 (0,129)	0,176 (0,200)	51,120	24
GT	1,131 (0,194)	0,096 (0,121)	0,166 (0,189)	52,120	25
RD	1,142 (0,209)	0,102 (0,125)	0,176 (0,194)	54,110	26
VC	1,148 (0,229)	0,102 (0,137)	0,171 (0,208)	50,370	27
VV	1,158 (0,218)	0,112 (0,130)	0,192 (0,199)	57,610	21
Em nível populacional	1,145 (0,212)	0,103 (0,128)	0,176 (0,198)	53,550	
Em nível de espécie	1,143 (0,147)	0,113 (0,095)	0,212 (0,141)	99,000	

O número médio efetivo de alelos variou de 1,131 (GT) a 1,158 (VV). O menor valor de Diversidade Genética de Nei (H) foi de 0,096 para a população GT e o maior foi de 0,112 para a população VV. O menor valor de Índice de Shannon (I) encontrado foi de 0,116 para a população GT e o maior foi 0,192 para a população VV (TABELA 4).

O dendrograma por UPGMA (FIGURA 4) das distâncias genéticas mostrou que as populações de Ponta Grossa (VV e CM) e Tibagi (GT e RD), são mais próximas entre elas do que com a população da RPPN Vale do Corisco (VC), que é a mais distante (FIGURA 4).

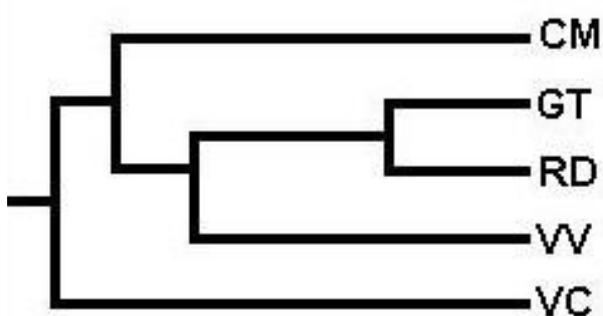


FIGURA 4 – DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA (DISTÂNCIAS GENÉTICAS DE NEI (1972)) OBTIDO PARA AS POPULAÇÕES DE *RHIPSALIS DISSIMILIS* PELO CRITÉRIO DE AGRUPAMENTO UPGMA.

A distância geográfica (TABELA 5) é maior entre as populações VV e VC (120 km) e a maior distância genética (TABELA 6) é entre as populações VC e CM (0,0149). Segundo o teste de Mantel, há correlação entre as distâncias genéticas e geográficas ($r=0,7$ e $p=0,03$) para as populações de *R. dissimilis*.

TABELA 5 - MATRIZ DE DISTÂNCIA GEOGRÁFICA (EM KILÔMETROS) ENTRE AS POPULAÇÕES DE *RHIPSALIS DISSIMILIS*.

POPULAÇÃO	CM	GT	RD	VC
CM	0			
GT	76,66	0		
RD	74,10	3,04	0	
VC	115,71	90,28	90,13	0
VV	7,04	80,37	76,73	120,86

TABELA 6 - MATRIZ DE DISTÂNCIA GENÉTICA DE NEI (1978) ENTRE AS POPULAÇÕES DE *RHIPSALIS DISSIMILIS*.

POPULAÇÃO	CM	GT	RD	VC
CM	0			
GT	0,0112	0		
RD	0,0118	0,0040	0	
VC	0,0149	0,0141	0,0106	0
VV	0,0126	0,0102	0,0090	0,0116

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) mostrou que as populações têm baixa estruturação genética, apresentando $F_{st} = 0,01872$ ($p=0,003$) (TABELA 7). A diferenciação genética se mostrou maior dentro das populações (98,13%) do que entre as populações (1,87%) (TABELA 7).

TABELA 7 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) PARA AS POPULAÇÕES DE *RHIPSALIS DISSIMILIS*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DOS QUADRADOS	VARIÂNCIA DOS COMPONENTES	PORCENTAGEM TOTAL DE VARIAÇÃO (%)
ENTRE POPULAÇÕES	4	24,472	0,079	1,87
DENTRO DAS POPULAÇÕES	118	491,625	4,166	98,13
TOTAL	122	516,098	4,246	

A baixa estruturação populacional também foi demonstrada pelo valor de G_{st} estimado pelo programa Hickory ($G_{st}=0,020$) com intervalo de confiabilidade mínimo de 2,5% e máximo de 97,5% (0,0237; 0,0366).

Através da análise Bayesiana inferiu-se o valor mais provável de grupos populacionais como sendo $K=5$ (FIGURA 5). A proporção de indivíduos

(Qi) nos grupos determinados pelo Structure mostrou-se heterogênea (FIGURA 6) indicando uma ausência de estruturação genética.

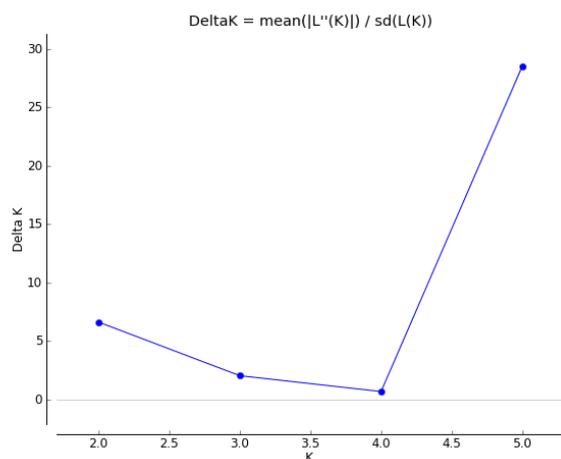


FIGURA 5 - VALORES DE ΔK SEGUNDO EVANNO *ET AL.* 2005, COM MAIOR VALOR PARA K=5.

A maior proporção de indivíduos (Qi) da população CM encontra-se no grupo 4; de GT, RD e VV no grupo 1 e da população VC no grupo 5 (TABELA 8). Tais resultados vão de encontro ao observado pelo dendrograma de similaridade por UPGMA (FIGURA 4).

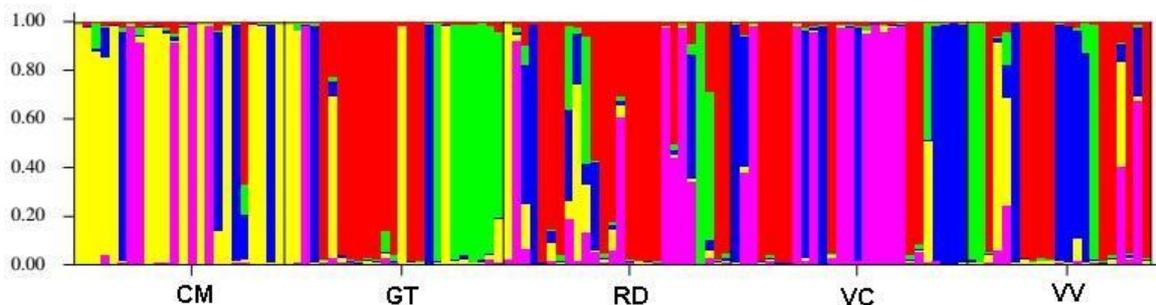


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA ANÁLISE COMPUTADA PELO STRUCTURE COM K=5. OS GRUPOS GEOGRÁFICOS ESTÃO REPRESENTADOS NO EIXO DAS ABCISSAS; OS GRUPOS K ESTIMADOS ESTÃO REPRESENTADOS POR CORES DIFERENTES. NO EIXO DAS ORDENADAS PODE-SE OBSERVAR A PROPORÇÃO DE INDIVÍDUOS DAS POPULAÇÕES GEOGRÁFICAS DENTRO DE CADA VALOR DE K.

TABELA 8 - PROPORÇÃO DE INDIVÍDUOS (QI) PARA OS CINCO GRUPOS DEFINIDOS PELO PROGRAMA STRUCTURE PARA AS POPULAÇÕES DE *RHIPSALIS DISSIMILIS*.

POPULAÇÃO	NºINDIVÍDUOS	GRUPOS				
		1 (VERMELHO)	2 (VERDE)	3 (AZUL)	4 (AMARELO)	5 (ROSA)
CM	24	0,040	0,016	0,172	0,566	0,205
GT	25	0,400	0,271	0,086	0,196	0,048
RD	26	0,479	0,107	0,127	0,096	0,190
VC	27	0,259	0,024	0,311	0,024	0,382
VV	21	0,427	0,157	0,248	0,096	0,072

4 DISCUSSÃO

As populações de *R. dissimilis* apresentam baixa variabilidade para marcadores ISSR, assim como em outros cactos de distribuição restrita (LAMBERT; BORBA; MACHADO, 2006; LAMBERT *et al.* 2006; HELSEN, 2009a). O valor de diversidade genética encontrado para as populações de *R. dissimilis* ($H=0,103$) é menor do que o valor médio ($H=0,22$) encontrado por meio de ISSR por Nybom (2004) para diversos grupos.

Em estudo envolvendo espécies de *Discocactus* ameaçadas da Bahia, Machado (2004) verificou valores baixos a intermediários de diversidade de alozimas para *D. bahiensis* ($H_e=0,287$), *D. catingicola* ($H_e=0,191$) e *D. zehntneri* ($H_e=0,191$) (MACHADO, 2004). As espécies ameaçadas de *Melocactus* apresentaram baixa diversidade genética de alozimas nas populações de *M. glaucescens* ($H_e =0,063$), *M. paucispinus* ($H_e=0,031$) e *M. concinnus* ($H_e=0,066$) (LAMBERT; BORBA; MACHADO, 2006; LAMBERT *et al.* 2006). Por outro lado, espécies de *Opuntia* endêmicas do arquipélago de Galápagos apresentaram diversidade genética média de 0,146 quando investigadas através de marcadores microssatélite (SSR) (HELSEN *et al.* 2009a).

As populações de *R. dissimilis* apresentam baixa estruturação genética. Os valores apresentados pelo programa Structure, embora sugiram cinco populações, mostram uma heterogeneidade nos indivíduos que é incongruente para o agrupamento de populações proposto. Segundo Latch *et al.* (2006) a estruturação genética implementada pelo software Structure não é confiável para valores de F_{st} abaixo de 0,03. Sendo assim, considera-se que as populações de *R. dissimilis* sejam constituídas por um único pool genético de baixa diversidade.

A baixa diversidade e estruturação de *R. dissimilis* deve-se possivelmente a fatores históricos e evolutivos que atuaram nas populações. As mudanças climáticas durante o Último Máximo Glacial (UMG) influenciaram na distribuição e genética de espécies da Mata Atlântica (CARNAVAL; MORITZ, 2008). Estudos filogeográficos na Mata Atlântica sugerem mudanças na cobertura florestal das regiões Sul e Sudeste durante o UMG, com períodos

de expansão e retração das florestas úmidas (GRAZZIOTIN *et al.* 2006; CABANNE; SANTOS; MIYAKI, 2007).

Segundo dados palinológicos do UMG (ca.18000 anos atrás), o clima frio e seco favoreceu o estabelecimento dos campos subtropicais no sul do Brasil e a expansão destes para a região sudeste (BEHLING; BAUERMAN; NEVES, 2001). No início do Pleistoceno Superior as gramíneas predominavam nas regiões mais altas da região Sudeste, incluindo as localidades menos elevadas de Catas Altas (Minas Gerais, 755 m) e Botucatu (São Paulo, 770 m) e as mais elevadas de Campos do Jordão em São Paulo com 1850 m (BEHLING, 1998; 2002).

Ao final do Pleistoceno as florestas de Araucária e da Mata Atlântica provavelmente ocupavam as áreas de menor elevação (500 - 1000 m) de parte da região Sudeste, substituindo os campos da região (BEHLING, 1998). A vegetação campestre que dominava a região serrana do Sudeste atualmente ocupa as porções mais elevadas dos morros, nas altitudes superiores aos 1800 m. Atualmente, as altitudes menos elevadas (500-1000m) são ocupadas pelas florestas da Mata Atlântica (BEHLING, 1998).

Na região dos Campos Gerais, no Paraná, a vegetação campestre era predominante no Pleistoceno Superior e as florestas com Araucárias ficaram confinadas às regiões úmidas, como o cânion do Rio Iapó, em Tibagi (BEHLING, 1997). Extensas áreas de campo, associadas à baixa ocorrência de araucárias e xaxins sugerem um clima frio e seco com intensas geadas nesse período (BEHLING, 1997). No Holoceno Médio a floresta de araucária ainda era rara, mesmo com o aumento das precipitações (BEHLING, 1997). A expansão da floresta de Araucária para os planaltos iniciou-se recentemente, nos últimos 1500 anos (BEHLING, 1997). A vegetação campestre permanece dominante e xaxins continuam raros na região dos Campos Gerais (BEHLING, 1997).

Os dados palinológicos indicam que as regiões ao nível do mar até 1000 m de altitude de Santa Catarina apresentavam clima frio e seco durante o Pleistoceno Inferior (BEHLING; NEGRELLE, 2001; BEHLING 2002). A vegetação predominante era de gramíneas, com algumas espécies arbóreas

adaptadas ao frio (BEHLING; NEGRELLE, 2001; BEHLING, 2002). Desde o Holoceno Médio, uma densa Floresta Atlântica se distribui na faixa de altitude do nível do mar até 1000m do Estado de Santa Catarina. Nessa região, as vegetações campestres ficaram confinadas às regiões com altitude superiores aos 1000 m, formando os campos de altitude (BEHLING; NEGRELLE, 2001; BEHLING, 2002). Atualmente, as vegetações campestres remanescentes do Quaternário localizam-se acima dos 1600 m no Sul e acima dos 1800 m no Sudeste do Brasil (BEHLING, 1998). Mais especificamente, os campos de altitude situam-se na faixa de 500 a 1500m nas latitudes entre 16° S e 24° S (Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e de 400 a 1000m nas latitudes acima de 24° S (região Sudeste) (BRASIL, 2008).

Os registros atuais da forma rupícola de *R. dissimilis* correspondem a regiões que possivelmente foram ocupadas por gramíneas no período glacial (BEHLING, 1998; 2002). *R. dissimilis* ocorre em áreas com altitude de até 1000 m, as quais foram ocupadas por florestas durante o UMG nos Estados de SP, PR e SC (ANEXOS 2 e 3). Em SC, os campos que dominavam as terras baixas, foram substituídos pela Floresta Ombrófila, e atualmente encontram-se nas altitudes mais elevadas do Estado (BEHLING, 2002; VIBRANS *et al.* 2013). A ocorrência de *R. dissimilis* (forma rupícola e epífita) no Estado de SC localiza-se em regiões ocupadas atualmente por Floresta Ombrófila Densa (FOD) (VIBRANS *et al.* 2013). A FOD de SC apresenta condições diferentes das regiões tropicais, com luminosidade incidindo de forma inclinada e massas de ar polar ocasionando geadas (VIBRANS *et al.* 2013). Os registros da forma rupícola podem ser remanescentes de vegetações campestres que permaneceram em meio a áreas florestais durante as mudanças climáticas do UMG. Os afloramentos rochosos ocorrem em porções mais altas dos municípios da Bacia do Itajaí e há poucos estudos sobre a vegetação dessas áreas (*com.pess.* Mestre em Botânica Anderson dos Santos Mello). Os registros de *R. dissimilis* para o Estado de SC são recentes (2009, 2010) e são oriundos do amplo esforço amostral realizado para o Inventariamento Florístico Florestal do Estado (VIBRANS *et al.* 2013; ANEXO 1). Em SP, no final do Pleistoceno, as gramíneas já haviam sido substituídas por florestas nas altitudes de 500 a 1000 m (BEHLING, 1998). Os registros da forma rupícola de

R. dissimilis para o Estado de SP são prováveis remanescentes da vegetação campestre que atualmente são ocupadas em grande parte pela Floresta Atlântica (BEHLING, 1998).

No período glacial, a expansão das gramíneas do sul para o sudeste do Brasil alcançou o Estado de Minas Gerais, conforme o registro para a cidade de Catas Altas (BEHLING, 1998). Os registros de 1915 para *R. dissimilis* nos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro (ANEXO 1) podem ser remanescentes dos campos subtropicais nesses Estados.

Atualmente, a região dos Campos Gerais do Paraná concentra grande parte dos campos remanescentes das altitudes menos elevadas (500–1000 m) do Quaternário (MELO; MORO; GUIMARÃES, 2007). Os Campos Gerais ocupam a porção leste do segundo Planalto Paranaense e atingem altitudes máximas de cerca de 1290 m (MELO; MORO; GUIMARÃES, 2007). Nessa região ainda é predominante a cobertura de gramíneas em função do solo pobre, raso e arenoso e ao isolamento imposto pela Escarpa Devoniana (MELO; MORO; GUIMARÃES, 2007). As formações florestais são menos desenvolvidas próximo da Escarpa Devoniana e estão restritas aos vales, encostas e matas de galerias (MELO; MORO; GUIMARÃES, 2007). O avanço das florestas das altitudes menores para as maiores nos Campos Gerais é recente (ca. 1500 anos) (BEHLING, 1997) e recebe forte impacto do desmatamento. Tais condições podem ter favorecido o estabelecimento e permanência de *R. dissimilis* nos Campos Gerais durante a última glaciação, justificando a maior ocorrência da espécie nessa região.

A expansão das florestas úmidas acarretou em mudanças na distribuição dos campos, atualmente confinados nas altitudes mais elevadas do sul e sudeste do Brasil (BEHLING, 1998). A substituição dos campos por florestas nas regiões menos elevadas do sul e sudeste do Brasil podem ter levado a retração das populações de *R. dissimilis*.

A redução da diversidade por gargalo genético não depende apenas do tamanho do gargalo, mas também da taxa de crescimento populacional (FALK; HOLSINGER, 1991). Um pequeno número de fundadores seguido de baixa taxa de crescimento populacional pode ocasionar em uma lenta recuperação

da população após o gargalo (FALK; HOSINGER, 1991). Além do mais, nas populações que permaneceram com tamanho populacional pequeno por um longo período de tempo, os efeitos da deriva genética passam a ser cumulativos e podem levar a depressão endogâmica (FALK; HOSINGER, 1991). Em Cactaceae a taxa de crescimento populacional é lenta (ANDERSON, 2001), o que pode fazer com que o gargalo genético tenha um efeito mais pronunciado (FALK; HOSINGER, 1991). A retração populacional pode ter levado a um gargalo genético seguido de deriva, que acarretou em perda de diversidade genética e fraca estruturação populacional. Em combinação, a possibilidade de reprodução assexuada por autogamia e/ou propagação vegetativa em *R. dissimilis* pode estar contribuindo para a baixa variabilidade genética das populações.

Dada a ocorrência de plasticidade fenotípica em *R. dissimilis* e do epifitismo como um caráter ancestral da espécie, sugere-se que a espécie seja um caso de *ecological fitting*. Considerando que a espécie seja um remanescente dos campos subtropicais, o aumento da umidade atmosférica durante o Holoceno e a expansão das florestas sobre os campos pode ter favorecido o hábito epífita na espécie, condição ancestral do grupo. Atualmente, as formas epífitas ocupam as áreas com ocorrência de Floresta Ombrófila Densa (SC e PR), Floresta Semidecidual (SP) e Floresta Ombrófila Mista (PR) e Floresta Estacional (PR) sendo que em Atibaia (SP) há ocorrência tanto da forma rupícola como da epífita (ANEXOS 2 e 3).

O estudo contribuiu para a localização de duas novas ocorrências da forma rupícola de *R. dissimilis* no Paraná, uma na cidade de Sengés (RPPN Vale do Corisco) e outra em Tibagi (Recanto Ecológico da Dora). Sendo assim, sugere-se a busca de novas ocorrências de *R. dissimilis*, tanto a forma rupícola como a epífita, em toda a região de abrangência da espécie.

Embora exista a possibilidade de redução das populações de *R. dissimilis* durante o UMG, a forma epífita pode ser um indicativo de adaptação da espécie frente às novas condições ambientais. Segundo West-Eberhard (2003), a origem e evolução de novidades evolutivas não estão reservadas somente às mutações. A plasticidade fenotípica permite ao organismo grande

flexibilidade na utilização de novos recursos, mesmo na ausência de mutações e de mudanças nas frequências dos genes (WEST-EBERHARD, 2003). Desse modo, mesmo apresentando baixa diversidade genética populacional, *R. dissimilis* pode apresentar características que favoreçam a permanência das populações, como a plasticidade fenotípica e possível adaptação de novos ambientes por *ecological fitting*. O *ecological fitting* pode ser um precursor de diversidade evolutiva, pois é um processo onde os organismos invadem um novo ambiente, usam novos recursos e formam novas associações com outras espécies, colocando os genótipos existentes em um novo ambiente seletivo (AGOSTA; KLEMENS, 2008). Dessa maneira, estudos envolvendo a caracterização genética da forma epífita de *R. dissimilis*, contribuirão para o melhor entendimento dos resultados aqui apresentados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, E. **The cactus family**. Timber Press, Portland, Oregon. 2001.
- AGOSTA, S. J.; KLEMENS, J. A. Ecological fitting by phenotypically flexible genotypes: implications for species associations, community assembly and evolution. **Ecology Letters**, n.11, p. 1123–1134, 2008.
- AGUILAR, M. A. G.; TERRAZAS, TERESA; SEGURA, O. ; ARIAS, S. ; VIBRANS, H.; LÓPEZ-MATA, L. Caracterización molecular de tres especies de *Hylocereus* (Cactaceae) presentes en México. **Revista Fitotecnia Mexicana**, n. 1, p. 13-22, 2013.
- ARAKARI, M.; SPERANZA, P.; PAMELA S. S.; SOLTIS, D.E. .Genetic Variability of an Unusual Apomictic Triploid Cactus *Haageocereus tenuis* Ritter from the Coast of Central Peru. **Journal of Heredity**, n.104, p. 127–133, 2013.
- BEHLING, H. Late quaternary vegetation, climate and fire history in the Araucaria forest and Campos region from Serra Campos Gerais (Paraná), S. Brazil. **Review of Palaeobotany and Palynology**, n. 97, p.109 – 121,1997.
- BEHLING, H. Late Quaternary vegetational and climatic changes in Brazil. **Review of Palaeobotany and Palynology**, n.99, p.143–156, 1998.
- BEHLING H.; NEGRELLE R. R. B. Tropical rain forest and climate dynamics of the atlantic lowland, southern Brazil, during the late Quaternary. **Quaternary Res.**, n.56, p.383-389, 2001.
- BEHLING, H., BAUERMANN, S. G.; NEVES, P. C. P. Holocene environmental changes in São Francisco de Paula region, southern Brazil. **Journal of South American Earth Sciences**, n. 14, p.631-639, 2001.
- BEHLING, H. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, n.177, p.19-27, 2002.
- BRASIL. Lei nº 11.428 de 2006 e Decreto nº 6.660, de 21 de novembro de 2008. **Dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, e dá outras providências**. Publicado no Diário Oficial da União de 24 de novembro de 2008.
- CABANNE, G. S.; SANTOS, F. R.; MIYAKI, C. Y. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, n. 91, p.73–84, 2007.

- CALVENTE, A. **Filogenia molecular, evolução e sistemática de *Rhipsalis* (Cactaceae)**. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências de São Paulo. São Paulo, 2010.
- CALVENTE, A.; ZAPPI, D. C.; FOREST, F.; LOHMANN, L. G. Molecular phylogeny, evolution, and biogeography of south american epiphytic cacti. **International Journal of Plant Sciences**, n. 172, p.902–914, 2011.
- CALVENTE, A. A New Subgeneric Classification of *Rhipsalis* (Cactoideae, Cactaceae). **Systematic Botany**, v.4, pp. 983–988, 2012.
- CARIAGA, K. A.; LEWIS, C. E.; MASCHINSKI, J. WRIGHT, S. J.; ORTEGA, J. Patterns of Genetic Diversity in the Critically Endangered Florida Key Endemic *Consolea corallicola* small (Cactaceae): Evidence from Inter Simple Sequence Repeat (ISSRs) DNA Polymorphisms. **Caribbean Journal of Science**, n.41, p. 225-233, 2005.
- CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography** , n.35, p. 1187–1201, 2008.
- DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, n.12, p. 13-15, 1987.
- EARL, D. A.; vonHOLDT, B. M. Structure harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, n.4, p. 359-361, 2012.
- ESPARZA-OLGUÍN L.; VALVERDE, T.; MANDUJANO, M.C. Comparative demographic analysis of three *Neobuxbaumia* species (Cactaceae) with differing degree of rarity. **Popul. Ecol.** n. 47, p.229–245, 2005.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, n.14, p. 2611–2620, 2005.
- EXCOFFIER, L. G.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, n. 1, p. 47-50, 2005.
- FALK, D. A.; HOLSINGER, K. E. **Genetics and Conservation of Rare Plants**. New York: Oxford University Press, 1991.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, n. 7, p. 574–578, 2007.

FIGUEIREDO, C. J.; NASSAR, J. M.; GARCÍA-RIVAS, A.E.; GONZÁLEZ-CARCACÍA, J. A. Population genetic diversity and structure of *Pilosocereus tillianus* (Cactaceae, Cereaceae), a columnar cactus endemic to the Venezuelan Andes. **Journal of Arid Environments**, n. 74, p.1392 -1398, 2010.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.

GIOVANONI, S. S. **Plasticidade fenotípica e variabilidade genética de *Rhipsalis dissimilis***. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

GRAZZIOTIN, F. G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAUY, S.; BONATO, S.L. Phylogeography of the Bothrops jararaca complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island. colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, n.15, p. 3969–3982, 2006.

GUARALDO, C. A.; BOENI, O. B.; PIZO, A.M. Specialized Seed Dispersal in Epiphytic Cacti and Convergence with Mistletoes. **Biotropica**, n.45, p. 465–473, 2013.

GUPTA, M., CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J. ; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 998-1006, 1994.

HARTMANN, S.; NASON, J.D.; BHATTACHARYA, D. Phylogenetic origins of *Lophocereus* (Cactaceae) and the senita cactus–senita moth pollination mutualism . **American Journal of Botany**, v. 89, p.1085–1092, 2002.

HELSEN, P.; VERDYCK , P.; TIE, A.; VAN DONGEN, S. Low levels of genetic differentiation between *Opuntia echios* varieties on Santa Cruz (Galapagos). **Plant Systematics and Evolution**, v. 279, p. 1-10, 2009a.

HELSEN, P.; BROWNE, R. A.; ANDERSON, D.J.; VERDYCK, P.; VAN DONGEN,S. Galápagos' *Opuntia*(prickly pear) cacti: extensive morphological diversity, low genetic variability. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 96, p. 451– 461, 2009b.

HOLSINGER, K.E.; LEWIS, P.O. **Hickory version 1.1**. Departament of ecology and evolutionary biology, University of Connecticut. Disponível em<<http://darwin.eeb.uconn.edu/hickory/hickory.html>> 2003.

HUNT, D.; TAYLOR, N. P.; CHARLES, G. **The New Cactus Lexicon. Vols. I & II: Descriptions and Illustrations of the Cactus Family**. DH Books, Milborne Port, United Kingdom2006.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ. **Plano de manejo do Parque Estadual de Vila Velha**. Curitiba, Instituto Ambiental do Paraná, 2004.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. **Red List of Threatened Species. Version 2013.2**. Disponível em <www.iucnredlist.org>. Acesso em 22 de Janeiro de 2014.

LATCH, E.K.; DHARMARAJAN, G.; GLAUBITZ, J.C.; RHODES- JUNIOR, O.E. Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. **Conservation Genetics**, v.7,p. 295-302, 2006

LAMBERT, S. M.; BORBA, E. L.; MACHADO, M.C. Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus* x *albicephalus* (*Melocactus ernestii* x *M. glaucescens*) in north-eastern Brazil. **Plant Species Biology**, n. 21,p. 93–108, 2006.

LAMBERT, S. M.; BORBA, E. L.; MACHADO, M. C.; ANDRADE, S. C. S. Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-eastern Brazil. **Annals of Botany**, v. 97,p. 389–403, 2006.

LAZAR, I. **Gel Analyzer 2010a: Freeware 1D gel electrophoresis image analysis software**. 2010. Disponível em: <http://www.gelanalyzer.com>.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. D. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v, 15, p.65-95, 1984.

MAACK, R. **Geografia Física do Paraná**. 3ªed. Curitiba, Imprensa Oficial, 2002.

MACHADO, M. C. **O gênero *Discocactus* Pfeiff. (Cactaceae) no estado da Bahia, Brasil: variabilidade morfológica, variabilidade genética, taxonomia e conservação**. Dissertação de Mestrado, UEFS, Feira de Santana, Bahia, Brasil, 2004.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Res.**, v. 27, p. 209-220, 1967.

MELO, M. S.; MORO, R. S.; GUIMARÃES, G. B. **Patrimônio Natural dos Campos Gerais do Paraná**. Ponta Grossa, Editora UEPG, 2007.

MORAES, E.M.; ABREU, A.G.; ANDRADE, S.C.S.; SENE, F.M.; SOLFERINI, V.N. Population genetic structure of two columnar cacti with a patchy distribution in eastern Brazil. **Genetica**, v. 125, p. 311–323, 2005

NASSAR, J. M.; HAMRICK, J. L.; FLEMING, T. H. Genetic variation and population structure of the mixed-mating cactus *Melocactus curvispinus* (Cactaceae). **Heredity**, v. 87, p. 69-79, 2001.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p.583-590, 1978.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, n.13, v. 1143–1155, 2004.

REDDY, P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128,p. 9-17, 2002

REED, D. H.; FRANKHAM, R. Correlation between fitness and genetic Diversity. **Conservation Biology**, v. 17, p. 230–237, 2003.

SOLLER, A. **A família Cactaceae Juss. no Estado do Paraná, Brasil.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.2012.

TAYLOR, N. P. Cactaceae. In **Cactus and Succulent Plants**. Status Survey and Conservation Action Plan. Compiled by Sara Oldfield. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 1997.

TAYLOR, N. P.; ZAPPI, D. C. **Cacti of eastern Brazil**. The Royal Botanic Garden, Kew, United Kingdom, Richmond, 2004.

VALLEJO-MARÍN, M.; DORKEN, M. E.; BARRETT, S.C.H. The ecological and evolutionary consequences of clonality for plant mating. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v.41, p.193–213, 2010.

VALVERDE, T.; QUIJAS, S.; LÓPEZ-VILLAVICENCIO, M.; CASTILLO, S. Population dynamics of *Mammillaria magnimamma* Haworth (Cactaceae) in a lava-field in central Mexico. **Plant. Ecol.**,n.170,p.167–184, 2004.

VELOSO, H. P.; RANGEL- FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. **A. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, p.123, 1991.

VIBRANS, A. C.; SEVEGNANI, L.; GASPER, A. L.; LINGNER, D. V. **Inventário Florístico florestal de Santa Catarina, volume IV**. Edifurb. Blumenau ,2013.

WALLACE, L. **Methods Available for the Analysis of Data from Dominant Molecular Markers**. Department of Biology, University of South Dakota, United States, 2003

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

WEST-EBERHARD, M.J. **Developmental Plasticity and Evolution**. Oxford University Press, New York, 2003.

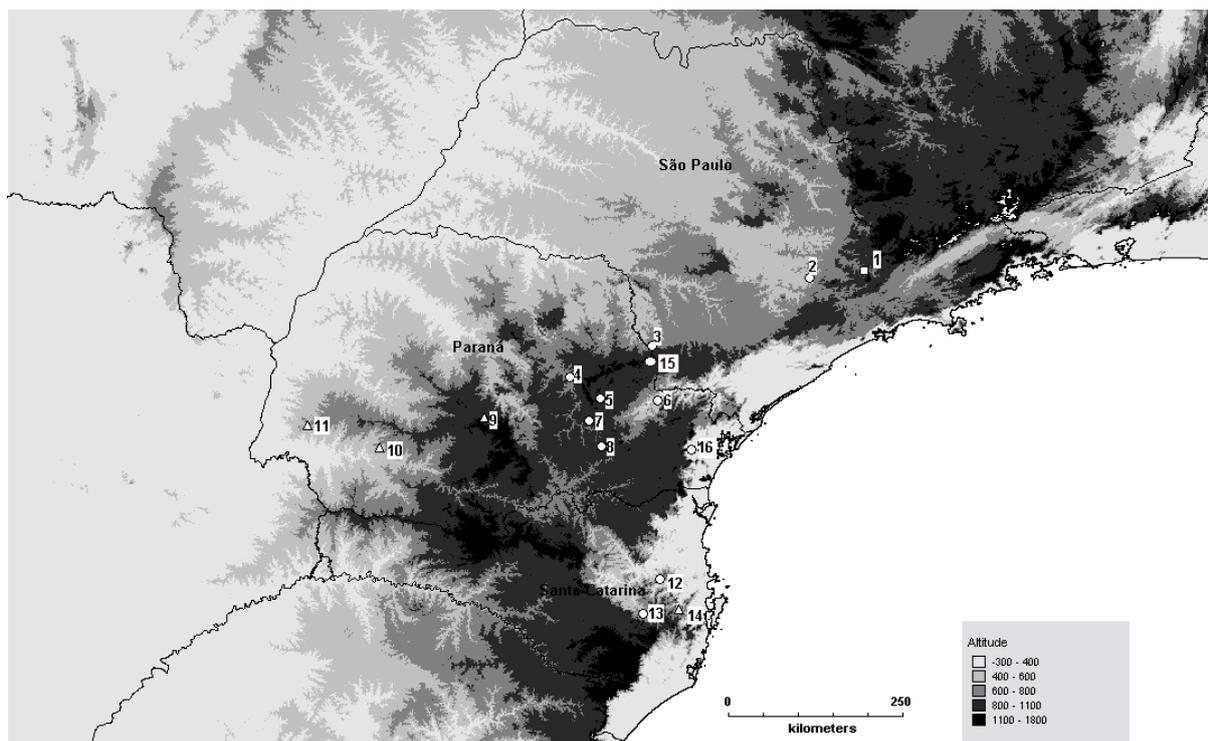
YEH, F. C.; YANG, R. ; BOYLE, T. **A Microsoft Window Based Freeware for Population Genetic Analysis**. Version 1.31, University of Alberta, Canada, 1999.

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

ANEXOS

ANEXO 1 – REGISTROS PARA *RHIPSALIS DISSIMILIS* NO BRASIL SEGUNDO A REDE SPECIES LINK.

Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB), Herbário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESA), Herbário Dr. Roberto Miguel Klein (FURB), Herbário Virtual Flora Brasiliensis (HbVirtFIBras), Herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão (HCF), Herbário Rioclarense (HRCB), Herbário do Instituto de Ciências Naturais (ICN), Herbário do Parque da Ciência Newton Freire Maia (IRAI), Herbário do Museu Botânico Municipal (MBM), Missouri Botanical Garden - Brazilian records (MOBOT_BR), Smithsonian Department of Botany - Brazilian records (NMNH-Botany_BR), The New York Botanical Garden - Brazilian records (NY), Herbário Dimitri Sucre Benjamin (RB), Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC), Herbário do Departamento de Botânica (UPCB) disponível na rede speciesLink(<http://www.splink.org.br>) em 12 de Março de 2014 às 15:14.



ANEXO 2 – MAPA ALTIMÉTRICO COM A LOCALIZAÇÃO DE *RHIPSALIS DISSIMILIS* NO BRASIL. AS LOCALIDADES COM A FORMA RUPÍCOLA ESTÃO INDICADAS POR CÍRCULO (2-8 E 12-13-15), COM FORMA EPÍFITA POR TRIÂNGULO (10-11 E 14) E COM AMBAS AS FORMAS POR QUADRADO (1). PARA O NOME DAS POPULAÇÕES CONSULTE O ANEXO 3.

ANEXO 3 - LOCALIZAÇÃO, COORDENADAS GEOGRÁFICAS E ALTITUDE DE *RHIPSALIS DISSIMILIS* FORMA EPÍFITA (EP) E RUPÍCOLA (RP). CADA LOCALIDADE ESTÁ REPRESENTADA POR UM NÚMERO (Nº) INDICADO NO MAPA DO ANEXO 2.

Nº	CIDADE	ESTADO	HÁBITO	COORDENADAS	ALTITUDE(m)
9	Turvo	PR	EP	25S 02' 34" 51W 31' 47"	850
10	Quedas do Iguaçu	PR	EP	25S 26' 58" 52W 54' 29"	600
11	Céu Azul	PR	EP	25S 08' 48" 53W 50' 55"	600
16	Morretes	PR	EP	25S 26' 49" 48W 50' 02"	400
14	Angelina	SC	EP	27S 35' 06" 48W 59' 01"	500
2	Salto	SP	RP	23S 12' 47W 16' 48"	600
1	Atibaia	SP	EP/RP	23S 06' 36" 46W 33'	800
3	Itararé	SP	RP	24S 06' 36" 49W 20' 24"	1060
15	Sengés	PR	RP	49S 27' 50" 24W 06' 47"	888
5	Castro	PR	RP	24S 47' 28" 50W 00' 40"	1000
7	Ponta Grossa	PR	RP	25S 05' 42" 50W 09' 40"	900
6	Cerro Azul	PR	RP	24S 49' 23" 49W 15' 40"	400
8	Palmeira	PR	RP	25S 25' 44" 50W 00' 22"	900
4	Tibagi	PR	RP	24S 30' 32" 50W 24' 47"	900
12	Presidente Nereu	SC	RP	27S 10' 52" 49W 13' 52"	533
13	Alfredo Wagner	SC	RP	27S 38' 35" 49W 27' 14"	600

FONTE: SPECIESLINK 2014