

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JAQUELINE DOS SANTOS

ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Dicksonia sellowiana* Hook. (DICKSONIACEAE)
NO BRASIL: SUBSÍDIOS PARA A CONSERVAÇÃO

Curitiba
2011

JAQUELINE DOS SANTOS

ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Dicksonia sellowiana* Hook. (DICKSONIACEAE)
NO BRASIL: SUBSÍDIOS PARA A CONSERVAÇÃO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, área de concentração em Taxonomia e Diversidade, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria C. Muschner
Co-orientadores: Prof. Dr. Paulo Labiak Evangelista
Prof. Dr. Walter A. P. Boeger

Curitiba
2011



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



ESTRUTURA POPULACIONAL DE *DICKSONIA SELLOWIANA* HOOK. (DICKSONIACEAE) NO BRASIL: SUBSÍDIOS PARA A CONSERVAÇÃO

por

JAQUELINE DOS SANTOS

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão formada pelos Professores

Prof^a. Dr^a. Valéria Cunha Muschner - (UFPR) - PRESIDENTE

Prof. Dr. Jéferson Nunes Fregonezi - (UFRGS)

Prof. Dr. José Francisco de Oliveira Neto – (FAFIPAR)

Curitiba, 15 de abril de 2011.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, por todo apoio, carinho e confiança, pela presença em toda minha vida e, principalmente, pela presença nos momentos de cansaço extremo, obrigada por nunca terem me deixado desistir.

Agradeço aos meus orientadores, por todo conhecimento compartilhado, pela paciência e perseverança ao longo destes dois anos de trabalho. Em especial, a Prof^a Dr^a. Valéria Cunha Muschner que, além de orientadora, se tornou uma grande amiga. Agradeço do fundo do meu coração, pela paciência; pelo otimismo, que me fez continuar quando eu mais quis desistir; pelos momentos de descontração; pelos puxões de orelha; pelo ombro amigo, quando os problemas pessoais se tornavam insustentáveis. Enfim, obrigada por ser minha orientadora-amiga/amiga-orientadora? Amo você!

Aos meus amigos, Ana Caroline Giordani e Jean Alves, que estiveram presentes nos momentos mais alegres e mais difíceis, que nunca me disseram “não” quando liguei rindo ou chorando. Obrigada por comemorarem comigo cada resultado conquistado e por aguentarem meus choros. Amo vocês!

Aos meus amigos (Dadi, Vanda, Paulo, Cris [Paty e Gui], Vania, Cati [Jé e Camile], Kelly), que não participaram da minha vida acadêmica, mas que nunca se esqueceram de mim, e tornaram vários fins de semana mais felizes, renovando minhas forças para encarar os problemas que vinham com o mestrado. Vocês foram essenciais. Amo vocês!

A toda equipe do MBM, pelo conhecimento compartilhado, pelas coletas e, pelos momentos divertidos no herbário. Agradeço também, a Dieter, Leonardo, Paulo, Jovani, Júlia e Mayara, que coletaram “xaxins” para mim em suas saídas a campo. Obrigada também, Luciana Patella, Raquel Patella, Carina Firkowski e Elaine Lopes, pelo apoio em laboratório. Vocês foram essenciais para o sucesso deste trabalho!

Aos meus orientadores Prof^a Dr^a Valéria C. Muschner e Prof. Dr. Walter Boeger, à Prof^a Dr^a. Patrícia Soffiatti e ao REUNI pelo apoio financeiro e, aos professores e colegas do curso de Pós Graduação em Botânica da UFPR, pela companhia e conhecimento compartilhado ao longo destes dois anos de trabalho.

RESUMO

Dicksonia sellowiana é uma pteridófito característica de Floresta Ombrófila Mista, ameaçada de extinção devido à exploração excessiva pela indústria extrativa e artesanal. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: determinar se há estruturação populacional de *D. sellowiana* Hook. no Brasil; avaliar o impacto de fragmentações para a manutenção da variabilidade genética das populações estudadas; e gerar subsídios para conservação da espécie. Análises moleculares foram baseadas em marcadores ISSR e sequenciamento dos espaçadores intergênicos plastidiais *trnL-trnF* e *atpB-rbcL*. Para os marcadores ISSR foram analisados cinco *primers* para 150 indivíduos. A abordagem a partir de estatística F mostra que as maiores porcentagens de bandas polimórficas e as maiores diversidades gênicas se encontram nas populações do sudeste e de SC; H_s (0,066), H_o (0,072) e G_{st} (0,09) indicam baixa variabilidade entre as populações; AMOVA indica ausência de estruturação populacional ($F_{st}=0,11 / P<0,0001$), com maior variação dentro das populações (88,6%) do que entre (11,4%). A abordagem Bayesiana indica ausência de estruturação ($\Theta^B=0,08$); o programa Structure não detectou a separação de indivíduos de acordo com a amostragem geográfica ($K=4$). As sequências de vinte indivíduos do ES e do RS para os espaçadores intergênicos plastidiais apresentaram nenhuma a baixíssima variabilidade. O padrão genético observado provavelmente se estabeleceu em função de possíveis eventos de expansão, regressão e fragmentação sobre resquícios de FOM no Cenozóico e, pela influência do sistema reprodutivo e da fragmentação de habitat da espécie. As populações podem ser consideradas capazes de se adaptar as variações ambientais, merecendo esforços para a conservação da espécie.

Palavras chave: Estruturação genética, Variabilidade genética, Marcadores ISSR, Xaxim.

ABSTRACT

Dicksonia sellowiana is a typical fern of Araucaria Forest, exposed to extinction due to excessive exploration by extractivism and craftwork industry. Therefore, it has these objectives: determine if there is population structure of *D. sellowiana* in Brazil; evaluate the fragmentations' impact on genetic variability maintenance of studied populations; and generate subsidies for species' conservation. Molecular analyses were based in ISSR markers and sequence of plastids *trnL-trnF* and *atpB-rbcL* intergenic spacers. For ISSR markers were analyzed five primers for 150 individuals. The *F*-statistics approach shows that Southeast and SC populations have the highest polymorphic bands percentages and the highest gene diversities ; H_s (0,066), H_o (0,075) e G_{st} (0,09) indicate low variability between the populations; AMOVA indicated no population structure ($F_{st}=0,11$ / $P<0,0001$), with higher variation within populations (88,6%) than between them (11,4%). Furthermore, the Bayesian approach indicated no genetic structure ($\Theta^B=0,08$); the structure software didn't detect the individuals division according to the geographical sampling ($K=4$). The sequences of twenty individuals of ES and RS were sequenced for plastids intergenic spacers showing none to very low variability. The genetic pattern observed probably was established based in possible events of expansion, regression and fragmentation over remnants of FOM in the Cenozoic, and by mating system e habitat fragmentation influence. The populations can be consider able to adapt to the environmental changes, deserving efforts for the species conservation

Key words: Genetic structure, Genetic variability, ISSR markers, Xaxim.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica de 2005-2008... 11
- FIGURA 2 – Mapa do Brasil com a localização das populações amostradas de *D. sellowiana*. RS = Rio Grande do Sul; SC = Santa Catarina; PR = Paraná; SP = São Paulo; RJ = Rio de Janeiro; ES = Espírito Santo; MG = Minas Gerais. 18
- FIGURA 3 – Eletroforese em gel de agarose 2% de indivíduos das populações do Rio de Janeiro (A) e de São Paulo (B) amplificados com o *primer* ISSR7. M = marcador de peso molecular (100 pb)..... 26
- FIGURA 4 – Dendograma construído, por UPGMA, a partir das distâncias genéticas de Nei (1972). 27
- FIGURA 5 - Análise das populações, computada pelo Structure, com $K=4$. Os grupos geográficos estão representados no eixo das abscissas; os grupos (K) estimados pelo programa correspondem às cores no gráfico [grupo 1: vermelho, grupo 2: verde, grupo 3: azul, grupo 4: amarelo]; nas ordenadas pode-se observar a proporção de indivíduos das populações geográficas dentro de cada valor de K 29
- FIGURA 6 (Cont.) - Distribuição de diferenças pareadas (observada X esperada) das sete populações amostradas de *D. sellowiana*. O eixo das abscissas corresponde às diferenças pareadas e o eixo das ordenadas à frequência haplotípica. (A) Santa Catarina; (B) Paraná; (C) Rio Grande do Sul; (D) Rio de Janeiro; (E) São Paulo; (F) Minas Gerais; (G) Espírito Santo..... 31
- FIGURA 7 - Mapa apresentando área de ocorrência natural de FOM (A); Mapa apresentando área de ocorrência atual de FOM (B)..... 39
- FIGURA 8 – Corredores de Biodiversidade Central da Mata Atlântica e Serra do Mar. 40
- FIGURA 9 (Cont.) – Fotos das áreas de coleta das populações de *D. sellowiana*. (A) Santa Catarina; (B) Paraná; (C) Rio Grande do Sul; (D) Rio de Janeiro; (E) São Paulo; (F) Minas Gerais; (G) Espírito Santo. 44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Localização, coordenadas geográficas, altitude e número de indivíduos amostrados das populações de <i>D. sellowiana</i> estudadas.	19
TABELA 2 – Concentração dos reagentes utilizados nas reações de PCR e temperatura de anelamento para cada primer.....	20
TABELA 3 – Concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR e temperatura de anelamento para cada região.....	21
TABELA 4 – Número de indivíduos analisados, número e porcentagem de bandas polimórficas encontradas para cada população, para todos os <i>primers</i> , de <i>D. sellowiana</i>	27
TABELA 5 – Número de alelos observados (<i>A</i>) (media ± desvio padrão), número efetivo de alelos (<i>A_e</i>) (media ± desvio padrão) e valores de diversidade gênica de Nei (<i>h</i>) (media ± desvio padrão), encontrados nas populações de <i>D. sellowiana</i> amostradas.	27
TABELA 6 – AMOVA para todas as populações de <i>D. sellowiana</i> amostradas, para todos os cinco <i>primers</i> analisados ($P < 0,0001$).	28
TABELA 7 – Distância geográfica (km) entre pares de população de <i>D. sellowiana</i>	28
TABELA 8 – Distância genética entre pares de população de <i>D. sellowiana</i>	28
TABELA 9 – Resultados obtidos pelo programa Structure mostrando a proporção (<i>qi</i>) de indivíduos de cada população predefinida, em cada um dos $K=4$ grupos.	29
TABELA 10 - Teste de neutralidade de Tajima (D^*) e valor de significância (<i>P</i>) para todas as populações de <i>D. sellowiana</i> amostradas.	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 <i>Dicksonia sellowiana</i> Hook.	10
1.2 GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO.....	13
2 MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1 ANÁLISES MOLECULARES	18
2.1.1 Material Vegetal	18
2.1.2 Extração do DNA	19
2.1.3 PCR-ISSR.....	20
2.1.4 Sequenciamento	21
2.2 ANÁLISE DE DADOS.....	22
2.2.1 Marcadores ISSR.....	22
2.2.2 Sequenciamento	24
3 RESULTADOS.....	25
3.1 MARCADORES ISSR.....	25
3.1.1 Diversidade Genética	25
3.1.2 Estruturação Genética	27
3.1.3 Testes de Expansão Populacional Recente	30
3.2 SEQUENCIAMENTO.....	31
3.2.1 Diversidade Genética	31
4 DISCUSSÃO.....	33
4.1 EXPANSÃO DA FLORESTA OMBRÓFILA MISTA.....	33
4.2 SISTEMA REPRODUTIVO.....	35
4.3 FRAGMENTAÇÃO DE HABITAT	37
4.4 CONSERVAÇÃO.....	44
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

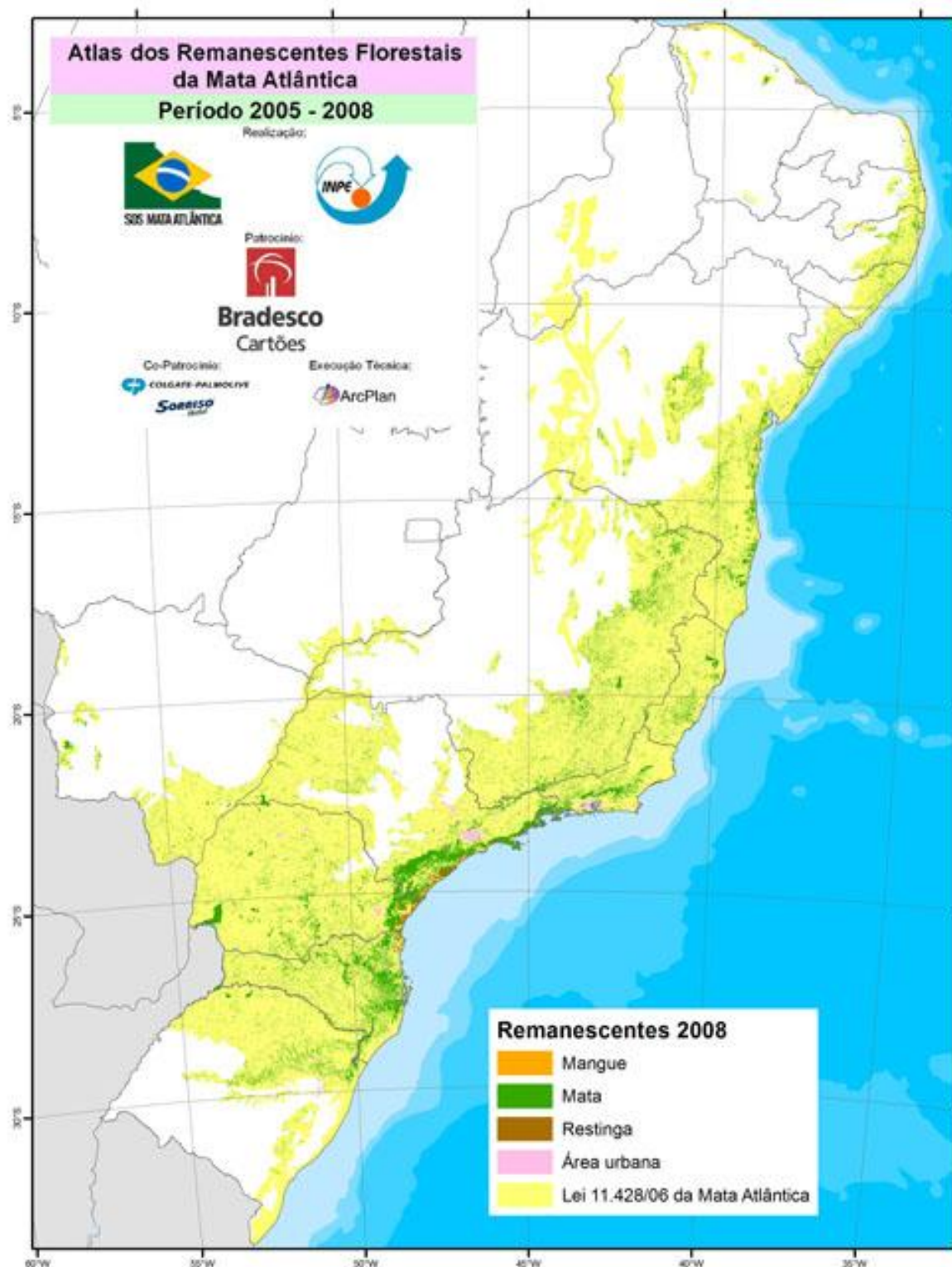
1.1 *Dicksonia sellowiana* Hook.

Dicksonia sellowiana pertence à família Dicksoniaceae, a qual se caracteriza por apresentar hábito arbóreo, terrestre, ocorrendo preferencialmente em áreas de matas úmidas de altitudes moderadas a elevadas. As principais características desta família são: indumento abundante na parte superior dos caules, constituído por tricomas simples, longos e macios; soros arredondados e marginais; indúcio bivalvar, com uma porção extrorsa e semi-orbicular formada pela base do segmento, e uma porção introrsa constituída pelo indúcio propriamente dito; esporângios sésseis ou com um pedicelo curto, e um ânulo oblíquo não interrompido pelo pedicelo (FERNANDES, 2000). A família Dicksoniaceae (incluindo-se aqui Lophosoriaceae, uma família com um único gênero e uma única espécie – *Lophosoria quadripinnata* – que, segundo Korall *et al.* [2006], forma um grupo monofilético com Dicksoniaceae) é composta por três gêneros (*Calochlaena*, *Dicksonia* e *Lophosoria*) e 30 espécies (SMITH *et al.*, 2006). No Brasil são encontradas apenas duas espécies: *Lophosoria quadripinnata* (J.F. Gmel.) C. Chr. e *Dicksonia sellowiana* Hook.

Dicksonia sellowiana é uma espécie amplamente distribuída, ocorrendo no Sul do México, América Central, Andes da Venezuela à Bolívia, e também nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, Paraguai e Uruguai. No Brasil, esta espécie cresce em altitudes que variam de 60 metros, como registrado para o Estado do Rio Grande do Sul, a até 2.200 m na Serra do Itatiaia, no Rio de Janeiro (FERNANDES, 2000).

Sua área de ocorrência no Brasil pertence ao bioma Mata Atlântica, uma das mais importantes áreas de floresta tropical do planeta, considerada um dos *hotspots* mundiais de diversidade (MYERS *et al.*, 2000; MITTERMEIER *et al.*, 2005; FRANKE *et al.*, 2005; MURRAY-SMITH *et al.*, 2009). Este bioma teve suas áreas originais de distribuição severamente reduzidas, o que acelerou o processo de extinção de várias espécies a ele associadas (FIGURA 1) (MORELLATO e HADDAD, 2000; FRANKE *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2009). Em sua concepção mais ampla, a Floresta Atlântica engloba algumas subformações florestais e ecossistemas associados, quais sejam: Floresta Ombrófila Densa (FOD), Floresta Ombrófila Mista (FOM),

Floresta Ombrófila Aberta (FOA), Floresta Estacional Semidecidual (FES) e encraves florestais interioranos no Nordeste (FRANKE *et al.*, 2005).



FONTE: SOS Mata Atlântica (2011)

FIGURA 1 – Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica de 2005-2008.

Ao longo da costa brasileira a Floresta Atlântica está geralmente associada às cadeias de montanhas da Serra do Mar, constituindo uma estreita faixa de floresta tropical úmida, decorrendo da umidade originada no oceano e que é retida por esta cadeia de montanhas. A partir do Paraná, no entanto, este bioma adentra ao interior do estado, influenciado pelas temperaturas mais baixas e também pela maior umidade, advinda das correntes frias e úmidas que vem do sul. Estas formações mais interioranas incluem as Florestas Estacionais Semidecíduais (FES) e a Floresta Ombrófila Mista (FOM) (FRANKE *et al.*, 2005), esta última intrinsecamente relacionada à distribuição de *Dicksonia sellowiana* (FERNANDES, 2000).

Sabe-se que a distribuição geográfica de diversos grupos de plantas é fortemente influenciada pelas variações climáticas decorrentes das variações latitudinais e altitudinais. Isto se reflete nas diferentes feições vegetacionais observadas ao longo da Floresta Atlântica. De um modo geral, a diversidade de muitas famílias botânicas tende a diminuir em direção às maiores latitudes, apresentando seus limites extremos de distribuição pouco abaixo da linha dos trópicos. Alternativamente, algumas espécies podem ocorrer ao longo de um amplo gradiente latitudinal, porém ocupando diferentes estratos altitudinais ao longo deste gradiente (TRYON, 1972, 1986; LIEBERMAN e ELDREDGE, 1996).

A FOM ocorre principalmente nos planaltos da região sul, mas pode ser também encontrada nos maciços descontínuos de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo (RIZZINI, 1979; VELOSO e GOES FILHO, 1982). Nestas porções, no entanto, ocorre apenas nas maiores altitudes, em decorrência da conjunção de fatores climáticos entre baixas latitudes e altas altitudes, favoráveis ao estabelecimento das espécies características desta formação (p.ex. *D. sellowiana* e *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze). Em outras palavras, as condições ideais para a ocorrência destas espécies são observadas, nas menores latitudes, nas regiões montanhosas de maior altitude (PUCHALSKI *et al.*, 2006).

Dicksonia sellowiana é um elemento característico da FOM, sendo mais abundante em áreas com alta densidade de *A. angustifolia*. Estudos apontam uma frequência de aproximadamente 85% de *D. sellowiana* em FOM (SENNÁ, 1996). No entanto, em áreas de simpatria de FOM Alto-Montana, Mata Nebular e FES, com a FOM, a espécie também pode ser encontrada. Desta forma, as temperaturas baixas nos planaltos interiores favorecem a formação de FOM, e pode-se observar a

mesma composição florística a partir 1.600 m de altitude, como por exemplo, em áreas da Serra da Mantiqueira, onde também há uma evidente predominância de *A. angustifolia*. (FRANKE *et al.*, 2005).

Dicksonia sellowiana ocorre preferencialmente no interior sombrio e úmido das matas, onde pode atingir 2 m de altura. Quando é encontrada em locais abertos e ensolarados, na borda de matas ou em FOD Alto-Montana, apresenta um menor porte (FERNANDES, 2000).

Pelo fato desta espécie produzir um denso manto de raízes sobre seu caule, o que favorece seu porte arbóreo (MORAN, 2004), ela foi constantemente explorada no passado, tanto de forma artesanal quanto industrial, para compor os vasos de xaxim e os substratos utilizados no cultivo de plantas ornamentais. O Brasil era o maior exportador de *D. sellowiana* dentre os países que exploravam este recurso natural (WCMC - *World Conservation Monitoring Centre*, 1995) e, por este motivo, a espécie figura desde 1992 na lista oficial de plantas ameaçadas de extinção no Brasil, além de constar do apêndice II da CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) (CITES, 2009).

Embora a distribuição geográfica de *D. sellowiana* seja ampla no território nacional, a sua utilização econômica, além de implicar na problemática de preservação da mesma, envolve também a descaracterização da formação vegetacional onde desempenha um importante papel fisionômico e florístico, como por exemplo, diminuição da disponibilidade de microhabitats para várias espécies epifíticas (SCHMITT *et al.*, 2005; FRAGA, 2008). Isso torna evidente que medidas de proteção, de utilização econômica e sustentável da espécie são necessárias, garantindo a preservação da mesma e dos ecossistemas associados.

1.2 GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO

A fragmentação de habitats interfere diretamente na variabilidade genética e estrutura de uma população. A alteração de tamanho, forma e arranjo espacial das populações ocasiona um aumento das taxas de extinção e modifica o padrão de dispersão dos indivíduos entre as populações locais (GIBBS, 2001). A redução da heterozigosidade, ocasionada por endocruzamento elevado, fluxo gênico interpopulacional reduzido e aumento da probabilidade de extinção de uma

metapopulação, afeta a viabilidade da população, diminuindo as chances de uma futura adaptação evolutiva (FRANKHAM *et al.*, 2008). No caso das plantas, existem vários fatores intrínsecos a estes organismos e que aumentam ainda mais os efeitos genéticos da fragmentação de habitat, dentre eles: hábito séssil, diferenças interespecíficas na longevidade, tempo de geração e abundância na pré-fragmentação, variedade de sistemas reprodutivos, fluxo gênico por pólen e semente (YOUNG *et al.*, 1996). Estas características interferem diretamente no fluxo gênico entre as populações de fragmentos diferentes, podendo prejudicar, dessa maneira, a manutenção da diversidade genética das mesmas.

Para traçar estratégias de manejo genético de uma população ameaçada, é necessário entender os mecanismos que determinam as mudanças evolutivas. Essas mudanças são baseadas nas alterações da composição genética da população e influenciadas por quatro principais fatores: mutação, fluxo gênico, seleção e deriva. A mutação é a principal fonte da diversidade genética, porém sua atuação pode ser considerada incipiente, pois ocorre a taxas muito baixas. O fluxo gênico pode restaurar mais rapidamente a diversidade genética, pois a seleção natural atua sobre a mesma, aumentando, conseqüentemente, as chances de mudanças adaptativas (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Informações sobre a diversidade genética de uma espécie podem ser obtidas através de microssatélites ou SSRs (*simple sequence repeats*) que são sequências curtas com 10 a 20 pares de base (pb). Estas unidades mostram organização em *tandem* que representam *loci* hipervariáveis (expressados como variantes diferentes dentro de populações e entre espécies diferentes), onde as variações surgem devido a diferenças no número de unidades repetidas, formando um arranjo de repetições. Essas regiões são caracterizadas por repetições de um, dois ou três nucleotídeos (p.ex. AA..., ou AG..., CGA..., que têm quatro a dez unidades repetidas em *tandem*). A técnica de ISSR (*inter-simple sequence repeats*) permite a detecção dessas SSRs derivadas de polimorfismos diretamente do genoma sem a necessidade de isolar e caracterizar estas sequências (ROUX *et al.* 2007).

Os marcadores ISSR são gerados a partir de uma reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com um único *primer* que pode ter motivos repetidos di ou tri-nucleotídeos com uma sequência ancoradora de um a três nucleotídeos (GUPTA *et al.* 1994; ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994). A incorporação destas sequências

ancoraduras elimina artefatos de *strand-slippage* (deslizamento das fitas). Estas sequências ancoraduras são geralmente aleatórias e devem incluir bases nucleotídicas redundantes (p.ex. R [pirimidinas], Y [purinas]). As regiões amplificadas representam a sequência nucleotídica entre dois sítios SSR orientados em direções opostas. A premissa é que as regiões SSR estão dispersas no genoma (CONDIT e HUBBELL, 1991) e que as chances de amplificar entre duas regiões adjacentes dentro dos limites da processividade da *Taq* DNA polimerase são suficientemente maiores que o grande número de bandas polimórficas que serão geradas (WOLFE *et al.*, 1998).

A herança dos marcadores ISSR é mendeliana simples (dominante ou codominante) (GUPTA *et al.*, 1994; WOLFE *et al.*, 1998). Eles são interpretados como marcadores dominantes, similar a RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), codificados por presença ou ausência de bandas. Embora bastante criticados por causa da impossibilidade de distinção entre indivíduos homocigotos e heterocigotos, os ISSR são bastante utilizados em análises de variabilidade e estrutura de populações (DONG *et al.* 2008), pois são altamente variáveis e suficientemente precisos para determinar e detectar polimorfismos individuais, tanto em níveis interespecíficos quanto em níveis intraespecíficos (REDDY *et al.*, 2002).

Trabalhos como os de Luque *et al.* (2009), M'Rabet *et al.* (2009) e González e Wink (2010), em que os organismos em estudo foram animais, e trabalhos com plantas como os de Camacho e Liston (2001), Deshpande *et al.* (2001), Barth *et al.* (2002), King *et al.* (2002), Meloni *et al.* (2006), com marcadores ISSR, tiveram como principal objetivo estabelecer a estrutura genética das populações, correlacionando-a a dados de diversidade, eventos demográficos e processos evolutivos, sempre considerando a história de vida e as características ecológicas como de suma importância. No estudo de González e Wink (2010), foi observado que, em populações da ave *Aphrastura spinicauda*, a partir de análise Bayesiana, os agrupamentos observados correspondiam a unidades historicamente independentes e linhagens evolutivas diferentes, permitindo que os autores apontassem áreas prioritárias para a conservação.

Além disso, as relações geográfico-climáticas, aliadas à genética e à biologia da espécie têm sido cada vez mais utilizadas para explicar a estrutura das populações, contribuindo para o entendimento de como as espécies evoluem e

divergem (BICKFORD *et al.*, 2007; ROUX *et al.*, 2007; ARSHAD *et al.*, 2008; JULIO *et al.*, 2008; GUICKING *et al.*, 2009; GONZÁLEZ e WINK, 2010).

A Biogeografia é uma disciplina que une estudos geográfico-climáticos, principalmente paleontológicos, com a biologia das espécies. Por definição, é o estudo da distribuição dos seres vivos no tempo e no espaço, se subdividindo em três campos: biogeografia histórica, ecológica e da conservação. A primeira estuda a distribuição passada da espécie, incluindo a história evolutiva da mesma, análise de padrões climáticos e alterações geológicas do passado, a partir de fósseis. Já o segundo ramo da biogeografia está ligado aos fatores atuais responsáveis pela distribuição da espécie. E, por último, a biogeografia da conservação, que contempla a proteção e/ou a restauração da natureza com base nos estudos biogeográficos históricos e ecológicos (BARRY COX MA e MOORE, 2006).

Alguns estudos na América do Sul (p.ex. ROUX *et al.*, 2007; JULIO *et al.*, 2008; GICKING *et al.*, 2009; GONZÁLEZ e WINK, 2010), a partir de dados de ISSR e/ou DNA plastidial e mitocondrial, analisaram a estruturação genético-populacional de espécies para explicar as suas distribuições geográficas, fundamentando seus resultados na Biogeografia. Estes estudos evidenciam que o principal fator que influenciou a distribuição atual das florestas foram os períodos glaciais recentes, através dos refúgios do Pleistoceno, seguidos por diferentes padrões de dispersão, de acordo com as mudanças climáticas e a capacidade adaptativa das espécies (GONZÁLEZ e WINK, 2010).

Assim, conhecer a diversidade genética da população, a biologia da espécie, os fatores abióticos (p.ex. variáveis bioclimáticas e geográficas) que a circundam, juntamente com os eventos geológicos e climáticos, permitem uma melhor contextualização das condições de sobrevivência de uma espécie ameaçada, em um presente em constante mudança, nos permitindo a implementação de programas de conservação que tenham por objetivo melhorar as chances de adaptação da espécie às mudanças evolutivas (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Em conjunto, todos os fatos citados acima, mostram como é possível a implementação de medidas para a conservação, não só das espécies, mas também do ambiente que estas ocupam. Frente a esses fatos, os objetivos desse trabalho foram:

a) Determinar se há estruturação populacional de *Dicksonia sellowiana* Hook. ao

longo de sua distribuição no Brasil: Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul;

- b) Avaliar o impacto de fragmentações para a manutenção da variabilidade genética nas populações estudadas;
- c) Gerar subsídios para conservação da espécie.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANÁLISES MOLECULARES

2.1.1 Material Vegetal

Foram coletadas folhas de 150 indivíduos de *D. sellowiana*, em sete populações distribuídas ao longo da distribuição da espécie no Brasil (FIGURA 2 e TABELA 1). As populações foram georreferenciadas e os materiais testemunho depositados no Herbário UPCB do Departamento de Botânica da UFPR.

Foram amostrados de 17 a 24 indivíduos de cada população e os locais de coleta foram detalhadamente caracterizados, discriminando-se que áreas representavam florestas contínuas, fragmentadas, isoladas, em distúrbio, ou em regeneração. Aliadas aos dados históricos do local, estas informações servirão para a avaliação do efeito da conservação/degradação do ambiente na diversidade genética das populações.



FIGURA 2 – Mapa do Brasil com a localização das populações amostradas de *D. sellowiana*. RS = Rio Grande do Sul; SC = Santa Catarina; PR = Paraná; SP = São Paulo; RJ = Rio de Janeiro; ES = Espírito Santo; MG = Minas Gerais.

TABELA 1 - Localização, coordenadas geográficas, altitude e número de indivíduos amostrados das populações de *D. sellowiana* estudadas.

Localização	Coordenadas geográficas	Altitude (m)	Nº de indivíduos amostrados
Vargem Bonita/SC (Fazenda Campina da Alegria - propriedade privada)	S26°53'36" W51°46'57"	1098	22
Cantagalo/PR	S25°22'28" W52°7'35"	836	24
São Francisco de Paula/RS (Próximo a Floresta Nacional de São Francisco de Paula)	S29°40'28" W50°47'35"	24	23
Teresópolis/RJ (Parque Nacional da Serra dos Órgãos)	S22°22'00" W42°45'00"	1543	23
São José do Barreiro/SP (Parque Nacional da Serra da Bocaina)	S22°42'11" W44°38'29"	1450	21
Alto Caparaó/MG (Parque Nacional do Caparaó)	S20°24'25" W41°50'27"	1791	20
Distrito de Pedra Menina/ES (Município de Dolores do Rio Preto - Parque Nacional do Caparaó)	S20°30'00" W41°48'24"	1454	17

2.1.2 Extração do DNA

Depois de desidratadas em sílica gel, as folhas coletadas foram pulverizadas com nitrogênio líquido em almofariz e o DNA extraído pela técnica de Roy *et al.* (1992), com algumas modificações. Cerca de 20 mg de material pulverizado foi transferido para um tubo de microcentrífuga, onde foram adicionados cerca de 600 µl de tampão de extração [CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; β-mercaptoetanol 0,2% (v/v), PVP-40 2%], 60 µl de β-mercaptoetanol e 6 µl de Proteinase K (10 mg/ml). Os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C por 30 min, sendo adicionado posteriormente o mesmo volume de fenol e clorofórmio (1:1; v/v). O tubo foi centrifugado a 10.000 rotações por minuto por 15 min à temperatura ambiente e o sobrenadante transferido para um tubo novo, sendo adicionados 1 volume de isopropanol e 1/10 do volume de acetato de sódio. Após 24

horas em freezer (-18°C), o tubo foi centrifugado por 20 min a 10.000 rpm e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado com 200 µl de etanol 70%, seco a temperatura ambiente por 20 min e eluído em 200 µl de água ultra-pura estéril e 2 µl de RNase (10 mg/ml).

O DNA foi avaliado e quantificado através de *fluorospectrometer* (NanoDrop 3300).

2.1.3 PCR-ISSR

Foram testados 19 *primers* (WOLFE *et al.*, 1998), dos quais cinco apresentaram boa reprodutibilidade e foram utilizados para as análises. As concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR (volume final de 25 µl) encontram-se discriminadas na Tabela 2. As reações foram realizadas em termociclador seguindo as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 1 min e 30 s, seguido de 30 ciclos com temperaturas de anelamento que variaram de 42°C a 56,3°C por 45 s, extensão a 72°C por 1 min e 30 s e a extensão final a 72°C por 10 min.

TABELA 2 – Concentração dos reagentes utilizados nas reações de PCR e temperatura de anelamento para cada primer.

Primer/ Reagente	Primer (pmoles/ µl)	Taq Polimerase (U)	dNTP (mM)	MgCl ₂ (mM)	BSA (µg/ml)	DNA (ng)	Temp.de anelamento (°C)
ISSR4 [(GT) ₇ YG]	1,2	1	0,25	2	-	35	52,8
ISSR7 [(CAC) ₄ RC]	0,5	1	0,25	1	25	35	56,3
ISSR10 [(GA) ₇ YC]	1,2	1	0,25	1	-	20	49,5
ISSR13 [(GA) ₈ YT]	0,6	1	0,25	2	25	10	52,8
ISSR20 [(CT) ₈ T]	0,5	1	0,25	2	-	57	52,8

Os produtos da PCR foram verificados através de eletroforese em gel de agarose 2%, a 80 Volts, por cerca de 4 h, corado com brometo de etídeo e visualizados e fotografados em transiluminador de luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos obtidos (em pares de base) foi comparado com um marcador de peso molecular de 100 pb. Os fragmentos de ISSR amplificados, com a mesma mobilidade de acordo com o peso molecular, foram codificados para presença (1) ou ausência (0) de bandas homólogas.

2.1.4 Sequenciamento

As sequências dos espaçadores intergênicos *trnL-trnF* e *atpB-rbcL* do DNA do cloroplasto, foram analisadas em 20 indivíduos de *D. sellowiana*, dez para cada Estado da Federação Brasileira que correspondem aos limites Norte e Sul da distribuição geográfica da espécie: ES e RS.

As concentrações de reagentes, utilizados nas reações de PCR (volume final de 25 μ l), encontram-se discriminadas na Tabela 3. As amplificações foram realizadas em termociclador seguindo as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguido de 30 ciclos com temperatura de anelamento a 50°C (*atpB-rbcL*) e 54°C (*trnL-trnF*) por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e 20 s, com extensão final a 72°C por 10 min. Os *primers* utilizados para a amplificação dos espaçadores *trnL-trnF* e *atpB-rbcL* foram aqueles descritos por Taberlet *et al.* (1991) e Chiang *et al.* (1998), respectivamente.

TABELA 3 – Concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR e temperatura de anelamento para cada região.

Região/ Reagente	Primer (pmoles/ μ l)	<i>Taq</i> Polimerase (U)	dNTP (mM)	MgCl ₂ (mM)	BSA (μ g/ml)	DNA (ng)	Temp.de anelamento (°C)
<i>trnL-trnF</i>	0,2	1	0,2	1	25	50	54
<i>atpB-rbcL</i>	0,5	1	0,2	2	-	50	50

Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. O DNA amplificado foi purificado segundo o protocolo de Dunn e Blattner (1986), com pequenas modificações.

O sequenciamento do DNA foi realizado em sequenciador automático *ABI 3130 – Genetic Analyzer*, seguindo os protocolos que acompanham o equipamento, com marcação terminal fluorescente. As condições da reação de sequenciamento para um volume final de 10 μ l continham 0,5 μ l de BygDye, 0,16 pmoles de cada *primer*, tampão 0,25X, 20 - 30 ng de DNA. As reações foram realizadas em termociclador seguindo as seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 1

min, seguido de 35 ciclos com temperatura de anelamento de 50°C por 5 s, extensão a 60°C por 4 min.

2.2 ANÁLISE DE DADOS

2.2.1 Marcadores ISSR

Os géis de agarose foram analisados com o auxílio do programa *Gel-Pro Analyzer* 4.0.1, em duas análises independentes para certificação de que não houve subjetividade no processo. Para avaliar a diversidade genética dentro e entre as populações de *D. sellowiana*, utilizou-se o programa POPGEN 1.31 (YEH *et al.*, 1999). Os cálculos utilizados para esta avaliação foram: número médio de alelos por loco (A), número efetivo médio de alelos por loco (A_e), número de bandas polimórficas, porcentagem de bandas polimórficas, heterozigosidade esperada (H_s) e observada (H_o) e o Índice de Diversidade Gênica de Nei (h) (LEWONTIN, 1972).

Para avaliar a estruturação e a diferenciação genética entre as populações de *D. sellowiana*, ao longo de sua distribuição, duas abordagens foram realizadas: tradicional (AMOVA – Análise Molecular da Variância) e Bayesiana.

As abordagens tradicionais utilizadas para estimar a estrutura de populações envolvem o uso da estatística F (i.e. F_{IT} , F_{IS} , F_{ST}), que foi desenvolvida originalmente por Wright (1943, 1951) é baseada em correlações entre unidades gaméticas em diferentes níveis hierárquicos, população total e subdivisão da população. Nei (1973, 1977) expandiu o uso da estatística F de Wright de um único *locus* e dois sistemas alélicos, redefinindo-as como funções de diversidade gênica particionada e calculando níveis de endocruzamento (F_{IS} e F_{ST}) e diferenciação genética (G_{ST}), a partir de medidas de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_s e H_T). O coeficiente de diferenciação gênica (G_{ST}) é um equivalente multilocus e multialélico da estatística F de Wright (LEVSEN *et al.*, 2008). A estrutura genética das populações, a partir dessa abordagem, foi testada por AMOVA, no programa Arlequin 3.5.1.2 (EXCOFFIER e LICHIER, 2010).

Embora a abordagem tradicional seja amplamente utilizada com dados codominantes, a aplicação metodológica para a estimativa de frequências alélicas em dados dominantes é bastante problemática (LEVSEN *et al.*, 2008). A abordagem Bayesiana, ostensivamente, tem complementado as análises para dados dominantes (HOLSINGER *et al.*, 2002; LEVSEN *et al.*, 2008). Holsinger *et al.* (2002),

desenvolveram um método baseado em modelos Bayesianos hierárquicos que estima diretamente um F_{ST} análogo (Θ^B), tanto a partir de dados dominantes, quanto de dados codominantes, incorporando o efeito incerto da endogamia (F_{IS}) nesta estimativa. Esses autores demonstraram que as estimativas de F_{ST} e frequências alélicas sem um coeficiente de endocruzamento (como requerido por outras metodologias) são confiáveis a partir da abordagem desenvolvida por eles. Além de estimar a frequência alélica média para calcular as heterozigosidades esperadas para uma população panmítica, o método também produz uma estimativa de G_{ST} de Nei (G_{ST}^B). Sob essa abordagem, Θ^B , corresponde a um modelo de efeito aleatório de amostragem populacional, que produz estimativas de todas as populações potencialmente amostradas e, presumivelmente, reduz o erro amostral (HOLSINGER, 1999).

Essa abordagem está incorporada ao programa Hickory versão 1.1 (HOLSINGER e LEWIS, 2003). O índice de diferenciação genética (Θ^B) foi estimado 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.

O programa Structure versão 2.3 (PRITCHARD *et al.*, 2000 e FALUSH *et al.* 2007), que também incorpora uma abordagem Bayesiana, foi utilizado para inferir o número potencial de populações K (desconhecido) e designar cada indivíduo, com uma probabilidade (q_i), para uma população (*cluster*), ou mais de uma, caso os seus genótipos indiquem que essas são misturadas (*admixed*). A estrutura populacional é detectada sob equilíbrios de Hardy-Weinberg e de ligação, que podem ter resultado de mistura recente, migração e/ou hibridização. Foram realizadas três corridas independentes para os diferentes valores de K (de 1 a 8) usando modelos *admixture* e frequências alélicas correlacionadas. Para cada valor de K , utilizou-se um *burn-in* de 100.000 seguido por 1.000.000 de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) repetições depois do *burn-in*. O valor mais provável de K foi determinado a partir da mudança na probabilidade *log* dos dados entre os valores de K correspondentes (ΔK), como proposto por Evanno *et al.* (2005).

As distâncias genéticas entre as populações foram calculadas utilizando as estimativas de Nei (1972) no programa POPGEN. Para testar a correlação entre as

distâncias genéticas e geográficas que separam as populações amostradas de *D. sellowiana*, utilizou-se o teste de Mantel (1967), implementado no programa Arlequin, com 10.000 permutações, em três corridas independentes.

Para explorar a história demográfica de *D. sellowiana*, para cada população, foram analisados a distribuição de diferenças pareadas (observada e esperada) (EXCOFFIER, 2004) e o teste de neutralidade D^* de Tajima (TAJIMA, 1989), no programa Arlequin. Segundo Harpending (1994), a sequência das distribuições de diferenças pareadas em uma população que sofreu um *bottleneck* deve ter uma distribuição unimodal.

2.2.2 Sequenciamento

As sequências obtidas para os espaçadores intergênicos do DNA do cloroplasto (*trnL-trnF* e *atpB-rbcL*) foram alinhadas no programa BioEdit 7.0.9 (HALL, 1999) e corrigidas manualmente quando necessário. Os sítios variáveis e a diversidade nucleotídica foram analisados no programa MEGA 4.0 – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (KUMAR *et al.*, 2008).

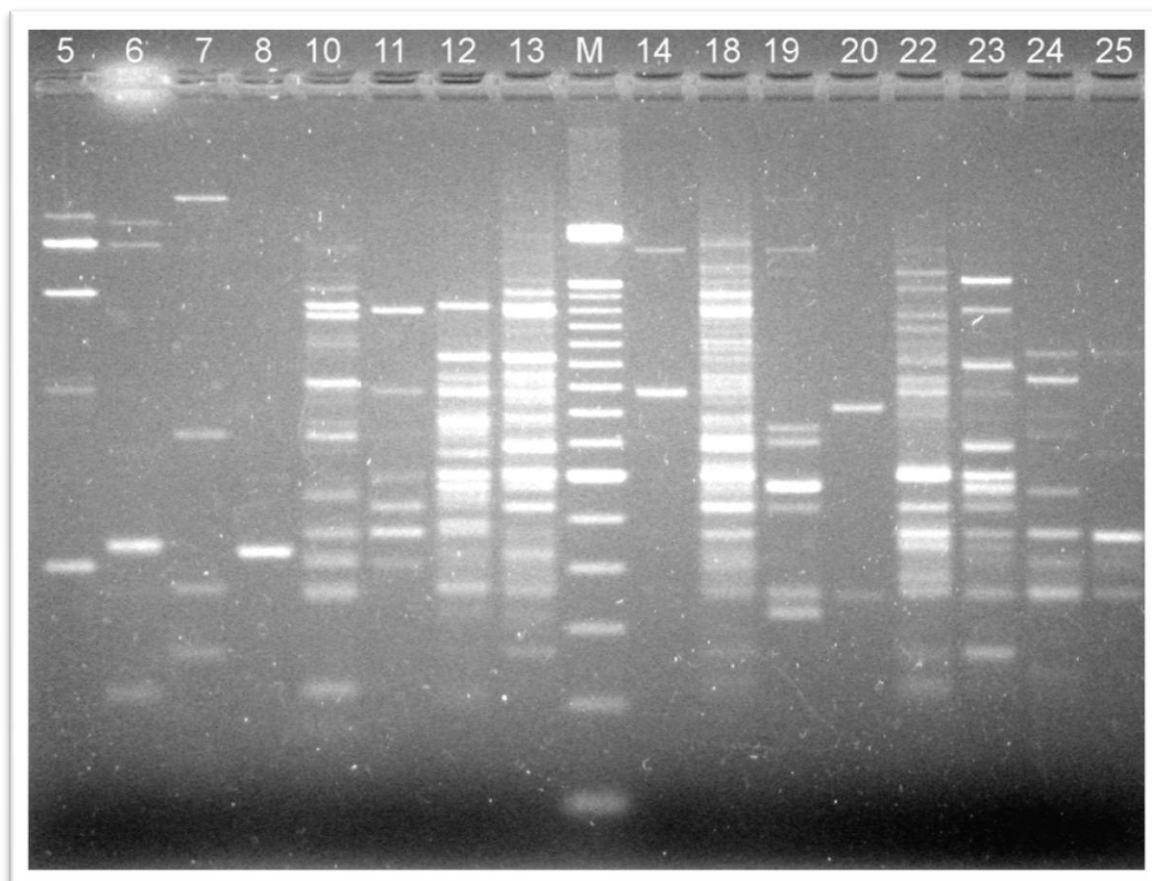
3 RESULTADOS

3.1 MARCADORES ISSR

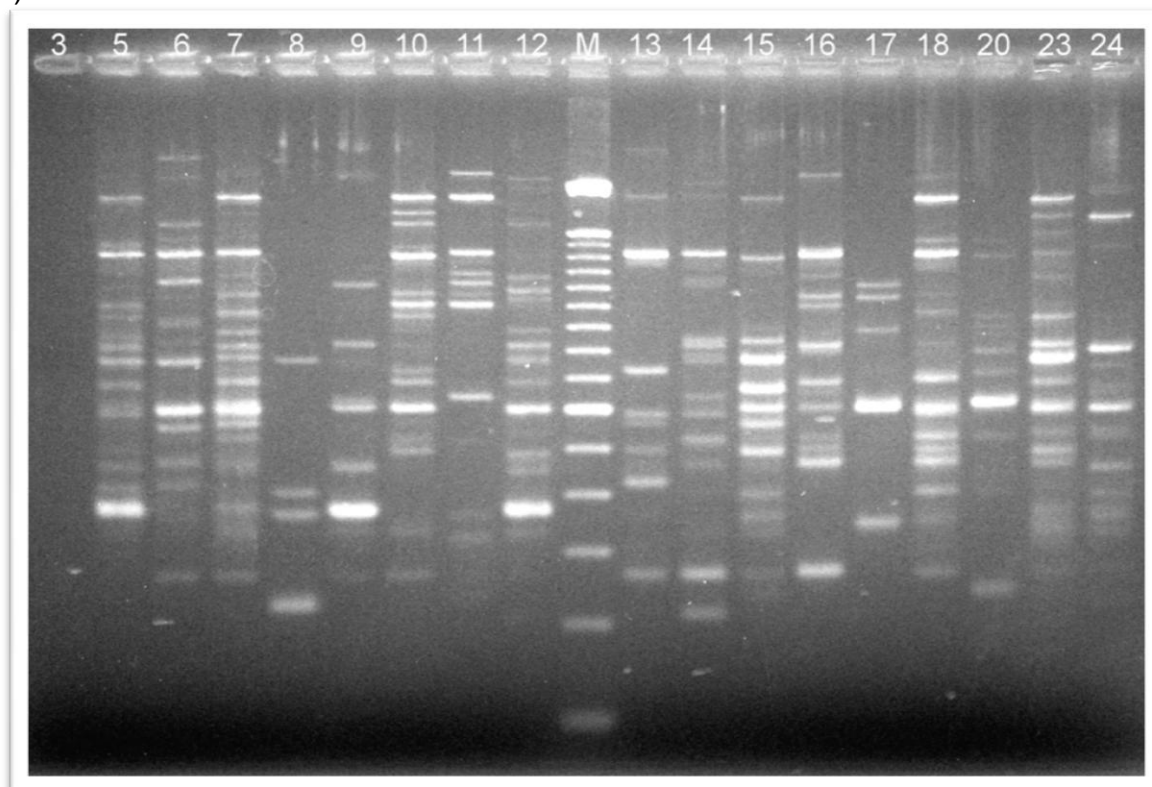
3.1.1 Diversidade Genética

Foram analisados seis *primers* ISSR para 150 indivíduos de *D. sellowiana*, os quais geraram 516 *loci* polimórficos, porém os indivíduos da população de São Paulo não amplificaram somente para o *primer* ISSR11. As análises geradas nesse trabalho incluíram somente os cinco *primers* que amplificaram para todas as populações amostradas. No entanto, a maioria das análises também foi realizada utilizando-se os seis *primers* que, com exceção da análise de agrupamento por UPGMA, mostraram-se congruentes com os resultados obtidos a partir dos cinco *primers*. Acredita-se que a diferença encontrada ocorra em função da ausência de dados da população de SP para o *primer* ISSR11.

Os cinco *primers* ISSR analisados para os 150 indivíduos distribuídos nas sete populações de *D. sellowiana* (FIGURA 2 e TABELA 1) apresentaram padrão de amplificação altamente reproduzível, como pode ser observado nas imagens dos géis, apresentados na Figura 3. Estes *primers* geraram 438 *loci* polimórficos, com uma porcentagem de bandas polimórficas variando de 35,8% (RS) a 52,2% (ES) (TABELA 4). O número de alelos (A) variou entre 1,36 (RS) e 1,52 (ES) (TABELA 5). Os valores de Diversidade Gênica de Nei (h) estão reproduzidos na Tabela 5. Embora estes valores de diversidade sejam muito próximos entre as diferentes populações, as populações do PR e RS exibem valores menores de h (0,05). O dendograma das distâncias genéticas de Nei (FIGURA 4) indica uma maior proximidade das populações de SC+ES e MG+RJ. Os valores de heterozigosidade observada ($H_o = 0,072 \pm 0,004$) e esperada ($H_s = 0,066 \pm 0,003$) são próximos, e o baixo valor de G_{st} (0,095), indicam baixa variabilidade entre as populações, o que corrobora o resultado de AMOVA (seção 3.1.2).



(A)



(B)

FIGURA 3 – Eletroforese em gel de agarose 2% de indivíduos das populações do Rio de Janeiro (A) e de São Paulo (B) amplificados com o *primer* ISSR7. M = marcador de peso molecular (100 pb).

TABELA 4 – Número de indivíduos analisados, número e porcentagem de bandas polimórficas encontradas para cada população, para todos os *primers*, de *D. sellowiana*.

	SC	PR	RS	RJ	SP	MG	ES
Nº de indivíduos analisados	22	24	23	23	21	20	17
Nº de bandas polimórficas	173	172	157	226	199	197	229
% de bandas polimórficas	39,50%	39,27%	35,84%	51,60%	45,43%	44,98%	52,28%

Fonte: O Autor (2011)

TABELA 5 – Número de alelos observados (*A*) (média ± desvio padrão), número efetivo de alelos (*A_e*) (média ± desvio padrão) e valores de diversidade gênica de Nei (*h*) (média ± desvio padrão), encontrados nas populações de *D. sellowiana* amostradas.

	SC	PR	RS	RJ	SP	MG	ES
<i>A</i>	1,39 ± 0,49	1,39 ± 0,48	1,36 ± 0,48	1,52 ± 0,50	1,45 ± 0,50	1,45 ± 0,50	1,52 ± 0,50
<i>A_e</i>	1,10 ± 0,17	1,07 ± 0,15	1,08 ± 0,17	1,09 ± 0,12	1,08 ± 0,14	1,08 ± 0,15	1,10 ± 0,14
<i>h</i>	0,07 ± 0,11	0,05 ± 0,09	0,05 ± 0,10	0,07 ± 0,09	0,06 ± 0,09	0,06 ± 0,10	0,08 ± 0,10

Fonte: O Autor (2011)

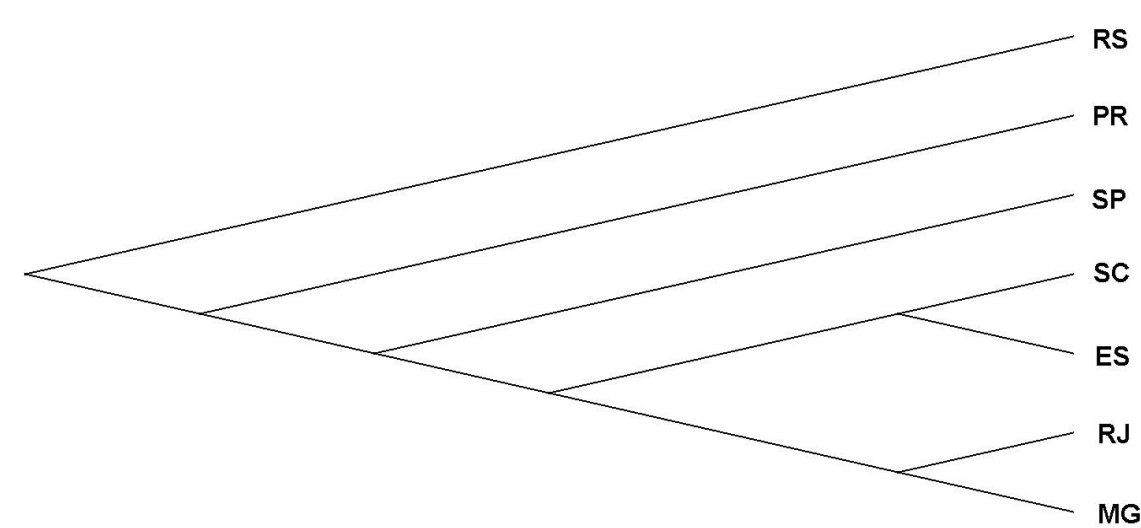


FIGURA 4 – Dendrograma construído, por UPGMA, a partir das distâncias genéticas de Nei (1972).

3.1.2 Estruturação Genética

A AMOVA indica que as populações não são geneticamente estruturadas ($P < 0,0001$). A diferenciação genética é maior entre indivíduos da mesma população (88,60%) do que entre as populações (11,40%) (TABELA 6), com um índice de estruturação genética (F_{st}) igual a 0,11402.

O teste de Mantel não revelou correlação entre as distâncias geográficas (TABELA 7) e genéticas (TABELA 8) ($r = 0,19$, $P = 0,14$), considerando todas as populações.

TABELA 6 – AMOVA para todas as populações de *D. sellowiana* amostradas, para todos os cinco primers analisados ($P < 0,0001$).

Fonte da Variação	d.f.*	Soma dos quadrados	Variância dos componentes	% de variação	F_{st}
Entre populações	6	294,60	1,68	11,40	0,11
Entre indivíduos da mesma população	143	18,70,90	13,08	88,60	
Total	149	2165,50	14,77		

*d.f. = *degrees of freedom* (graus de liberdade)

Fonte: O Autor (2011)

TABELA 7 – Distância geográfica (km) entre pares de população de *D. sellowiana*.

	SC	PR	RS	RJ	SP	MG	ES
SC	0						
PR	169	0					
RS	307	486	0				
RJ	1006	985	1105	0			
SP	777	760	908	207	0		
MG	1231	1189	1357	256	461	0	
ES	1210	1168	1329	229	432	81	0

Fonte: O Autor (2011)

TABELA 8 – Distância genética entre pares de população de *D. sellowiana*.

	SC	PR	RS	RJ	SP	MG	ES
SC	***						
PR	0.0096	***					
RS	0.0109	0.0128	***				
RJ	0.0074	0.0060	0.0123	***			
SP	0.0088	0.0080	0.0106	0.0063	***		
MG	0.0079	0.0085	0.0106	0.0057	0.0079	***	
ES	0.0062	0.0075	0.0133	0.0059	0.0078	0.0067	***

Fonte: O Autor (2011)

O Θ^B estimado pelo programa Hickory também mostra ausência de estruturação genética populacional - $\Theta^B = 0,080$; intervalo de confiabilidade mínimo

de 2,5% e máximo de 97,5% (0,065; 0,098). As abordagens Bayesiana ($\Theta^B = 0,08$) e tradicional ($F_{st} = 0,11$) indicaram ausência de estruturação populacional em *D. sellowiana* no Brasil, com valores bem próximos.

O programa Structure separou os indivíduos em quatro grupos, sendo que somente os grupos 2 e 4 estão de acordo com a amostragem geográfica. Segundo a metodologia proposta por Evanno *et al.* (2005), o valor modal de distribuição do valor verdadeiro de K , identificado como um pico foi $\Delta K=4$. Todas as populações tiveram mais do que 55% dos seus indivíduos claramente identificados em cada um dos quatro grupos estimados (TABELA 9, FIGURA 5). As populações do PR e RS, que apresentam uma menor diversidade gênica, encontram-se, respectivamente, nos grupos 4 e 2 e apresentam uma maior proporção (q_i) de indivíduos em cada população predefinida (90 e 75%).

TABELA 9 – Resultados obtidos pelo programa Structure mostrando a proporção (q_i) de indivíduos de cada população predefinida, em cada um dos $K=4$ grupos.

População	Nº indivíduos	Grupo			
		1 - Vermelho	2 - Verde	3 - Azul	4 - Amarelo
SC	22	0.092	0.106	0.726	0.075
PR	24	0.023	0.024	0.051	0.903
RS	23	0.139	0.750	0.052	0.059
RJ	23	<u>0.216</u>	0.025	0.554	<u>0.205</u>
SP	21	0.620	0.074	<u>0.233</u>	0.072
MG	20	0.801	0.031	0.124	0.044
ES	17	0.097	0.033	0.804	0.065

Fonte: O Autor (2011)

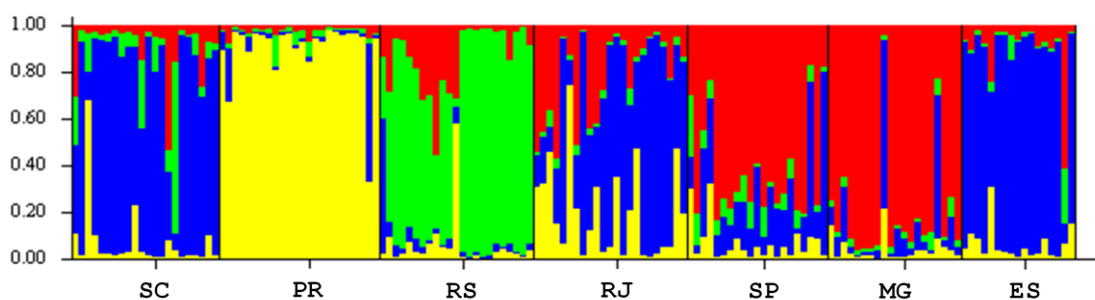


FIGURA 5 - Análise das populações, computada pelo Structure, com $K=4$. Os grupos geográficos estão representados no eixo das abscissas; os grupos (K) estimados pelo programa correspondem às cores no gráfico [grupo 1: vermelho, grupo 2: verde, grupo 3: azul, grupo 4: amarelo]; nas ordenadas pode-se observar a proporção de indivíduos das populações geográficas dentro de cada valor de K .

3.1.3 Testes de Expansão Populacional Recente

Todas as populações analisadas apresentaram indício, significativo, de expansão populacional recente, como se pode observar através das análises de distribuição de diferenças pareadas e índice de neutralidade D^* de Tajima (FIGURA 6 e TABELA 10).

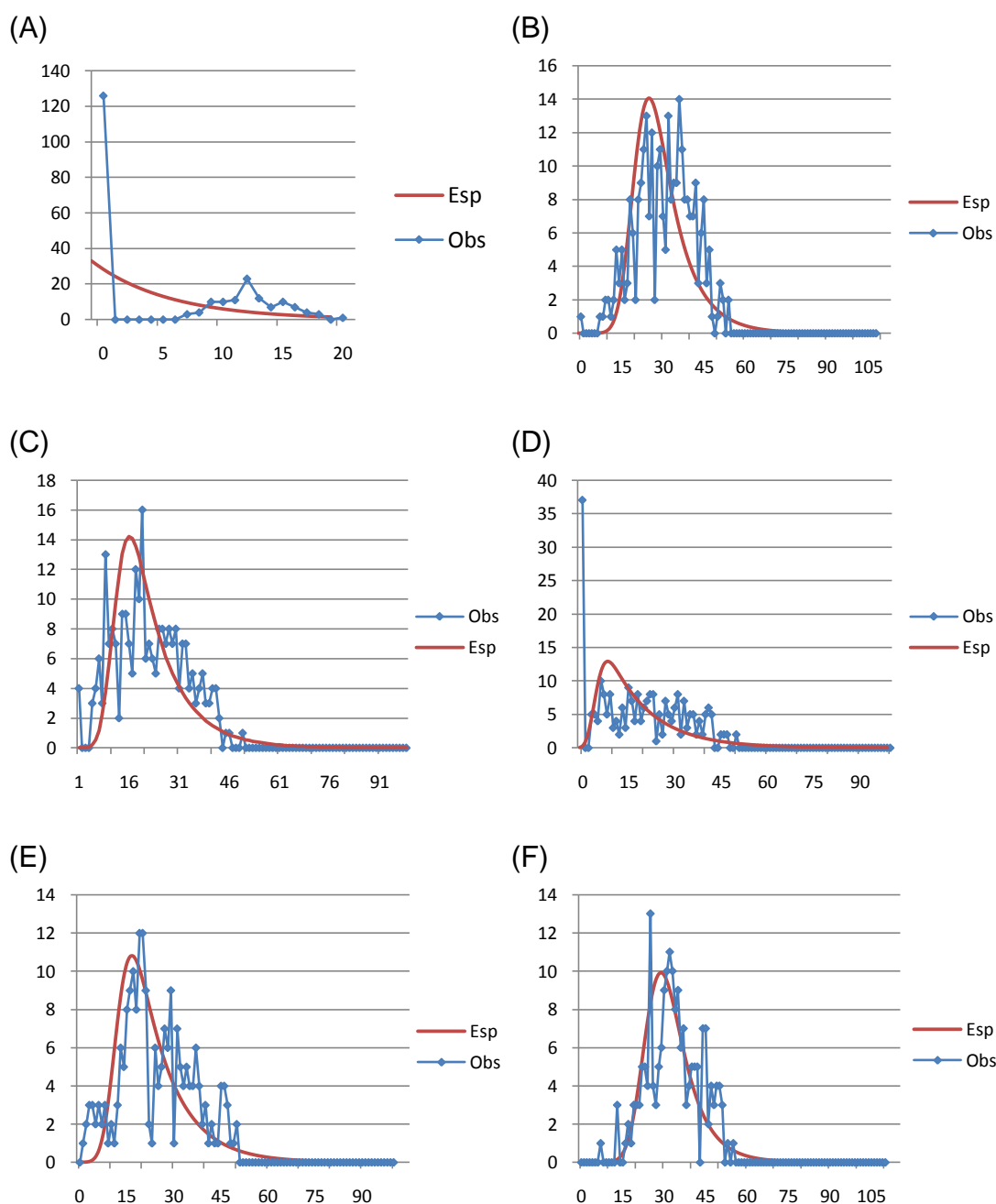


FIGURA 6 - Distribuição de diferenças pareadas (observada X esperada) das sete populações amostradas de *D. sellowiana*. O eixo das abscissas corresponde às diferenças pareadas e o eixo das ordenadas à frequência haplotípica. (A) Santa Catarina; (B) Paraná; (C) Rio Grande do Sul; (D) Rio de Janeiro; (E) São Paulo; (F) Minas Gerais; (G) Espírito Santo.

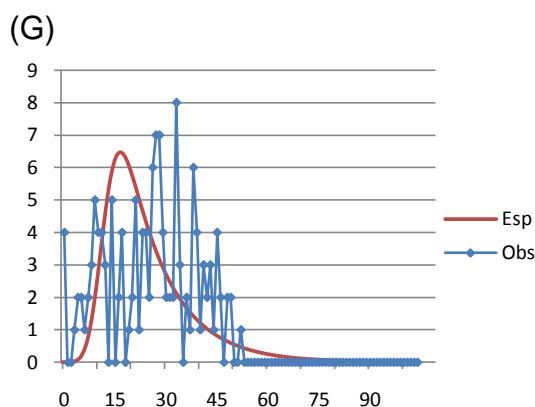


FIGURA 6 (Cont.) - Distribuição de diferenças pareadas (observada X esperada) das sete populações amostradas de *D. sellowiana*. O eixo das abscissas corresponde às diferenças pareadas e o eixo das ordenadas à frequência haplotípica. (A) Santa Catarina; (B) Paraná; (C) Rio Grande do Sul; (D) Rio de Janeiro; (E) São Paulo; (F) Minas Gerais; (G) Espírito Santo.

TABELA 10 - Teste de neutralidade de Tajima (D^*) e valor de significância (P) para todas as populações de *D. sellowiana* amostradas.

Local	D^* Tajima; P
SC	-1,95; 0,01
PR	-1,34; 0,08
RS	-2,02; 0,01
RJ	-2,47; 0,0001
SP	-1,92; 0,01
MG	-1,2; 0,10
ES	-1,92; 0,01

Fonte: O Autor (2011)

3.2 SEQUENCIAMENTO

3.2.1 Diversidade Genética

Os 20 indivíduos das populações dos estados do ES e RS (extremos da distribuição geográfica conhecida para *D. sellowiana*, no Brasil), sequenciados para o espaçador intergênico plastidial *trnL-trnF* (410 nucleotídeos), não apresentaram variabilidade nucleotídica. Os mesmos 20 indivíduos das populações dos estados do ES e RS foram sequenciados para o espaçador *atpB-rbcL* (890 nucleotídeos) e apresentaram apenas uma substituição nucleotídica e dois sítios heterozigotos (um deles repetindo-se em três indivíduos e um outro que ocorreu no mesmo sítio da substituição nucleotídica [indivíduo 13 da população do RS possui um C na posição

454, o indivíduo 16 possui Y (C ou T) enquanto que os demais indivíduos possuem T nessa posição]).

4 DISCUSSÃO

4.1 EXPANSÃO DA FLORESTA OMBRÓFILA MISTA

Os primeiros registros fósseis de Dicksoniaceae (SKOG, 2001) e Araucariaceae (SILVA *et al.*, 2009) no Hemisfério Sul datam da metade do Triássico, apresentando uma distribuição cosmopolita a partir do Jurássico (SPORNE, 1970; TRYON e TRYON, 1982; HILL, 1987; VAN KONIJNENBURG-VAN CITTERT, 2002). No Mesozóico, estas famílias habitaram regiões quentes e úmidas da *Pagea*, preferencialmente nas proximidades de pântanos, terraços fluviais e substratos de florestas (VAN KONIJNENBURG-VAN CITTERT, 2002). Este cenário permitiu que espécies das famílias Dicksoniaceae e Araucariaceae chegassem ao Cenozóico, se estabelecendo principalmente no Hemisfério Sul (HUECK, 1972; HAINES *et al.*, 1984; KERSHAW e WAGSTAFF, 2001).

Os campos dominavam a paisagem na Era Glacial (~1.8 milhões de anos a 11.000 anos atrás - Pleistoceno), período caracterizado por clima seco e frio, e também durante o quente e seco início do Holoceno. Da metade para o fim do Holoceno, o clima começou a se tornar mais úmido, com apenas três meses de seca por ano (BEHLING, 1997 e 2002). O início desse clima mais úmido marcou o início da expansão da FOM, que migrou ao longo dos rios, por resquícios de floresta, há ~3.210 anos atrás (fim do Holoceno) (BEHLING e PILLAR, 2007).

Análises polínicas e de esporos foram realizadas a partir de registros fósseis encontrados na região Sudeste e Sul do Brasil (BEHLING, 2002). A expansão de resquícios de FOM refugiados em vales úmidos sobre os campos no PR ocorreu há ~1.500 anos, enquanto que a expansão desta floresta em SC e nos estados da região sudeste ocorreu há ~1.000 anos (BEHLING, 2002), mostrando uma diferença de 500 anos entre a expansão da floresta nas duas regiões supracitadas. Já no RS, registros de presença de FOM só se tornaram frequentes há ~850 anos, com um curto período de expansão devido ao início do uso dos campos para pastagem (250-220 anos atrás), (BEHLING *et al.*, 2001).

Os valores estimados de F_{st} (0,11) e Θ^B (0,08) indicam que as populações de *D. sellowiana* não estão geneticamente estruturadas. Além disso, o número de populações estimado pelo programa Structure é quatro (número amostrado de populações é igual a sete). Destes, somente dois grupos, PR e RS, correspondem à

amostragem geográfica, pois apresentam a maior proporção de indivíduos destas populações (90 e 75%). Os indivíduos dos estados de SC e ES encontram-se em um dos grupos, com uma proporção de 73 e 80%, respectivamente. No último grupo encontram-se, em maior proporção (62 e 80%), os indivíduos das populações de SP e MG. Os indivíduos da população do RJ encontram-se distribuídos em proporções intermediárias.

Considerando a Floresta Atlântica, Simpson (1979) e Haffer (1969) propõem dois diferentes cenários com base em eventos geológicos para explicar a biodiversidade deste bioma. De acordo com Simpson (1979), a diversificação de espécies foi originada por mudanças geográficas e climáticas no Terciário. Entretanto, Haffer (1969) sugere que eventos de regressão, fragmentação e expansão da floresta e as mudanças do nível do mar ao longo dos ciclos glaciais do Pleistoceno (início Quaternário) causaram um efeito vicariante nas populações, gerando uma rica biodiversidade.

Presas *et al.* (2011), de acordo com os cenários criados por Simpson (1979) e Haffer (1969), afirmam que diferenças no padrão genético das populações podem ser ocasionadas pelo lento processo de transformação em associação com eventos geológicos, o que possibilita a existência de populações estáveis com alta variabilidade genética e consequente capacidade de adaptação a novas condições ambientais. Os modelos paleoclimáticos que prevêm a estabilidade de áreas da Floresta Atlântica explicam a alta variabilidade genética para algumas espécies que se encontram na região central da Floresta Atlântica e o sinal de expansão populacional na região sul da Floresta (PELLEGRINO *et al.*, 2005; GRAZZIOTIN *et al.*, 2006; CABANNE *et al.*, 2008; CARNAVAL *et al.*, 2009; FITZPATRICK *et al.* 2009).

Desta forma, o padrão genético observado para as populações de *D. sellowiana* e o sinal de expansão populacional recente detectado pelas análises de distribuição de diferenças pareadas, provavelmente se estabeleceram em função de possíveis eventos de expansão, regressão e fragmentação sobre resquícios de FOM ao longo do Terciário e do Quaternário. É possível também que o avanço e recuo do gelo no fim do Pleistoceno tenham gerado efeitos como *bottleneck* ou fundador sobre populações de espécies características de Floresta Atlântica, gerando baixa variabilidade genética dentro das populações (PRESAS *et al.*, 2011). Este pode ter sido o caso das populações de *D. sellowiana* do PR e RS, que possuem uma

diferenciação acentuada em relação as demais, sugerindo que elas tenham sido afetadas por estes eventos supracitados, permitindo o isolamento genético destas populações.

Contudo, os eventos citados, desde pelo menos ~65 milhões de anos atrás (início Cenozóico), provavelmente não foram suficientes para fixar alterações no genoma plastidial da espécie, uma vez que as sequências dos espaçadores intergênicos do DNA plastidial *trnL-trnF* e *atpB-rbcL*, já utilizados em análises populacionais em outras pteridófitas (HENNEQUIN *et al.*, 2003; VAN de HEEDE *et al.*, 2003; SU *et al.*, 2004; SHEPHERD *et al.*, 2007; WANG e GUAN, 2011), apresentaram nenhuma a baixíssima variabilidade, respectivamente.

Wang e Guan (2011), no estudo sobre estruturação genética e filogeografia de *Sphaeropteris brunoniana* (Hook.) R. M. Tryon (Cyatheaceae), pteridófito pertencente à mesma ordem de *D. sellowiana* - Cyatheales (KORALL *et al.*, 2006. e SMITH *et al.*, 2006); também observaram baixa variabilidade nucleotídica a partir do sequenciamento dos espaçadores intergênicos plastidiais *trnL-trnF* e *atpB-rbcL*.

4.2 SISTEMA REPRODUTIVO

O sistema reprodutivo (se reprodução cruzada ou autofecundação) tem influência direta na distribuição da variabilidade genética em plantas (KORPELAINEN *et al.*, 2005). Quando os indivíduos se reproduzem sexualmente a diversidade genética tende a ser maior dentro das populações, ao passo que a autofecundação tende a aumentar a variabilidade genética entre as populações (LOVELESS e HAMRICK, 1984; HAMRICK e GODT, 1989).

Outro fator que também desempenha um importante papel no padrão de distribuição da diversidade genética nas espécies é o nível de ploidia. Sabe-se que samambaias poliplóides são endogâmicas e, por esse motivo, apresentam uma maior variabilidade genética entre as populações; já as espécies diplóides, através do cruzamento intergametofítico, desenvolvem maiores níveis de variabilidade dentro das populações (DONG *et al.*, 2008). Embora não existam estudos que indiquem o número cromossômico de *D. sellowiana*, Smith *et al.* (2006) e Korall *et al.* (2006) afirmam que as espécies de *Dicksonia* são diplóides, possuindo $N = 65$ cromossomos.

Segundo Ranker e Geiger (2008), as samambaias apresentam três modos de reprodução sexual:

- 1) Autofecundação Intragametofítica – o anterozóide e o óvulo são do mesmo gametófito, gerando um esporófito homozigoto;
- 2) Autofecundação Intergametofítica – o anterozóide e o óvulo são de gametófitos diferentes, originados do mesmo esporófito;
- 3) Cruzamento Intergametofítico – o anterozóide e o óvulo são de gametófitos diferentes, originados de esporófitos diferentes;

Embora nada se conheça sobre o modo de reprodução em *D. sellowiana*, o padrão de variabilidade genética observado nesse estudo (maior dentro das populações) seja provavelmente produto de cruzamento intergametofítico (TABELAS 4 e 5). Koperlainen *et al.* (2005) postulam que esse tipo de sistema reprodutivo fornece a manutenção da variabilidade dentro das populações.

As samambaias, dentre elas *D. sellowiana*, têm a capacidade de formar bancos de esporos, os quais ficam em estado de dormência e germinam em tempos diferentes. Os esporos de *D. sellowiana* podem ficar por até 731 dias em estado de dormência (FILLIPPINI *et al.*, 1999), proporcionando, desta maneira, uma menor taxa de competição durante a fase inicial do desenvolvimento (SCHNELLER, 1998; FILLIPINI *et al.*, 1999; RANAL, 1999; ROOGE *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2006). Este comportamento deve ser uma estratégia adaptativa que aumenta as chances de sucesso no desenvolvimento e fixação dos gametófitos, estando correlacionada, diretamente, ao esforço para a colonização, ao sucesso reprodutivo e à manutenção dos genótipos parentais (GOMES *et al.*, 2006).

Adicionalmente, o padrão geral da variabilidade genética entre as populações de samambaias é consistente com o modo de dispersão dos esporos: vento (LANDERGOTT *et al.*, 2001). Estes esporos podem ser dispersos por longas distâncias, pois são leves e resistentes a baixas temperaturas e à luz ultravioleta (TRYON e LUGARDON 1991; GRADSTEIN e VAN ZANTEN, 2001). Essas características aumentam a probabilidade de fluxo gênico entre populações geograficamente distantes, além de proporcionarem a ocorrência de espécies amplamente distribuídas, independentemente do nível de altitude em que se encontram (HAMRICK e GODT, 1996; MORAN, 2008). Vários trabalhos (TRYON, 1970; SMITH, 1972; CARLQUIST, 1980; TRYON, 1986; MORAN, 2004; GEIGER *et*

al., 2007) citam a ocorrência de samambaias no continente e em ilhas vulcânicas de criação recente, indicando que estas espécies chegaram lá por dispersão a longas distâncias. Portanto, a inexistência de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas de *D. sellowiana*, conforme o teste de Mantel ($r = 0,19$, $P = 0,14$) e os baixos valores de variabilidade entre as populações estudadas são condizentes com a dispersão dos esporos por longas distâncias.

4.3 FRAGMENTAÇÃO DE HABITAT

A ocorrência de fluxo gênico entre populações pode ser limitado ou impedido em função da fragmentação de habitats, prejudicando, desta maneira, processos ecológicos, tal como a dispersão (ALLY e RITLAND, 2007). A modificação do padrão de dispersão dos indivíduos entre as populações altera o tamanho, a forma e o arranjo espacial das populações, aumentando a deriva genética e o endocruzamento, devido à redução do fluxo gênico interpopulacional (GIBBS, 2001; DUBREUIL *et al.*, 2010). Isso afeta, conseqüentemente, a variabilidade genética dentro dos fragmentos e a viabilidade das populações, diminuindo a probabilidade de uma futura adaptação evolutiva (FRANKHAM *et al.*, 2008; MONTOYA *et al.*, 2008).

Entretanto, Ouborg *et al.* (2006) questionam a hipótese de que a fragmentação de habitats afeta de forma negativa a manutenção da variabilidade genética em plantas. Estudos demonstram que, devido à dispersão e/ou polinização a longas distâncias, não se pode afirmar que a fragmentação acarretará na diminuição da variabilidade genética dentro das populações, pois os fragmentos podem ser, na verdade, populações contínuas (YOUNG *et al.* 1996; COLLEVATTI *et al.* 2001; LOWE *et al.* 2005; KETTLE *et al.* 2007; AGUILAR *et al.* 2008). Para avaliar os efeitos da fragmentação de habitat sobre a diversidade genética em populações de plantas, deve-se, além de conhecer os modos de polinização e/ou dispersão, também estimar, o tamanho efetivo das populações dentro dos fragmentos, o grau de isolamento e o padrão de variabilidade genética antes de ocorrer a fragmentação (NASON *et al.*, 1997; HAMRICK, 2004).

Neste trabalho, apesar da sugestão de que eventos geológicos e climáticos, ao longo do Terciário e Quaternário (Item 4.1), tenham influência sobre o padrão genético observado para as populações de *D. sellowiana* e, mesmo que, conhecida

a capacidade de dispersão a longa distância para a espécie, não é possível desconsiderar os efeitos da fragmentação de habitat sobre populações de uma espécie ameaçada de extinção, quando se tem por objetivo sua conservação. A baixa variabilidade genética em conjunto com o isolamento da população pode potencializar os efeitos da fragmentação de habitat (FRANKHAM *et al.*, 2004).

Os efeitos negativos das fragmentações (FIGURA 7) não foram detectados nas populações da região Sudeste (SP, RJ, MG e RJ) e do Estado de SC, nas quais a variabilidade genética foi maior do que nas populações do PR e RS. Os indivíduos dessas populações foram coletados em regiões bem preservadas, ao contrário das populações do PR e RS, que se encontravam em regiões bastante degradadas (FIGURA 7). Além disso, não se pode desconsiderar que, em fragmentos mais extensos e preservados, há melhores condições para o desenvolvimento dos indivíduos e para a manutenção da variabilidade genética (JUMP e PEÑUELAS, 2006; FRANKHAM *et al.*, 2008).

Em um estudo de Klauberg *et al.* (2010), sobre florística e estrutura de um fragmento de FOM no Parque Natural Municipal de Lages/SC, *D. sellowiana* foi considerada, devido a sua abundância, como destaque deste remanescente. Os autores sugerem que condições favoráveis ótimas tenham permitido o sucesso da espécie na colonização do ambiente. Medeiros *et al.* (2005) destacam outro município de SC, Ponte Serrada, como detentor de um extenso fragmento de FOM, com considerável abundância de espécies características desta formação, dentre elas *D. sellowiana*.

No sudeste, fragmentos descontínuos de FOM em simpatria com outras formações florestais características da região, ocorrem a partir do sul de SP (KLEIN, 1960; VELOSO *et al.*, 1991) até MG e ES (RUSCHI, 1950). Estes fragmentos estão em uma rede de Unidades de Conservação (UC's) que fazem parte dos Corredores de Biodiversidade da Serra do Mar e Central da Mata Atlântica (FIGURA 8). A finalidade desses corredores é melhorar as oportunidades de sobrevivência, a longo prazo, das comunidades biológicas, mantendo e restaurando a conectividade da paisagem, para que o fluxo gênico seja efetivo (FONSECA *et al.*, 2004). Dentre as UC's que fazem parte destes corredores estão os Parques Nacionais da Serra dos Órgãos (RJ), da Serra da Bocaina (RJ/SP) e do Caparaó (MG/ES) (SNUC - MMA, 2011), onde foram coletadas populações de *D. sellowiana*.

Ao contrário do resultado observado nas populações da região sudeste e de SC, a fragmentação mostra um efeito negativo na manutenção da variabilidade genética nas populações do PR e RS. Estas populações têm menores níveis de variabilidade, provavelmente relacionado à redução resultante da degradação do ambiente (FIGURA 7). No Paraná, segundo um estudo da PROBIO Araucária (FUPEF, 2001), o que restou da composição, estrutura e funcionamento da FOM original foram, no máximo, florestas em estágio avançado de sucessão, o que equivale 66.109 ha ou 0,8% do que já existiu no estado. No Rio Grande do Sul, a FOM ocorre em simpatria com os campos, no entanto, apesar de ser capaz de avançar sobre o mesmo, o uso do fogo para pastagens impede o seu avanço. O aumento das pastagens e a exploração excessiva de espécies características deste tipo florestal fizeram com que a formação praticamente desaparecesse no estado, restando apenas resquícios em áreas privadas ou em UC's (SONEGO *et al.*, 2007).

Devido à degradação de habitat, é possível que as populações do PR e RS tenham seu tamanho efetivo reduzido ao longo das gerações. A redução permite o aumento da deriva genética, redução de taxas de imigração e restrição ao fluxo gênico (FRANKHAM *et al.*, 2008; DUBREUIL *et al.*, 2010).

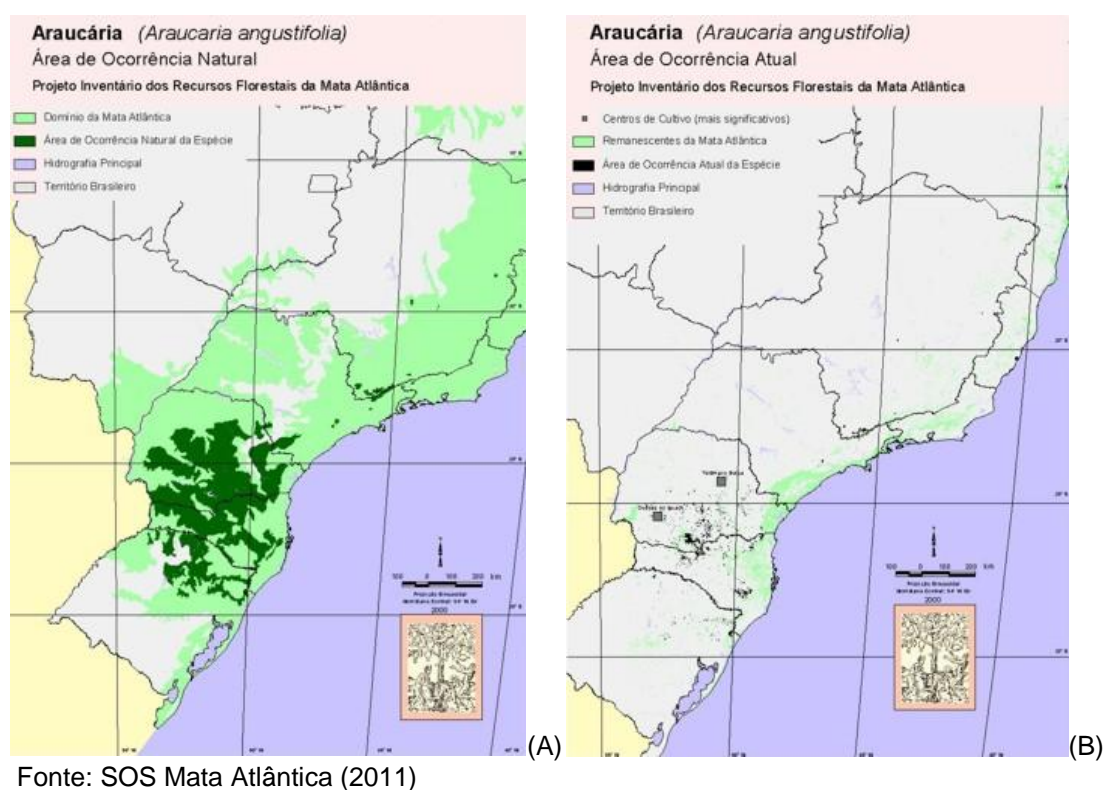
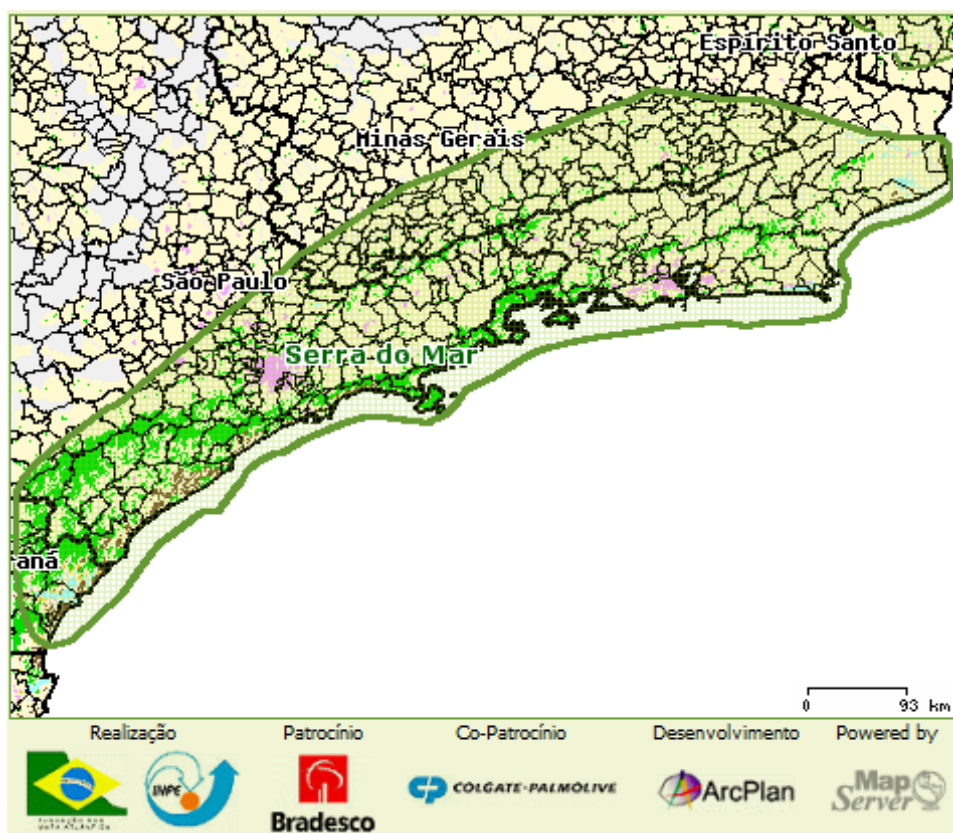
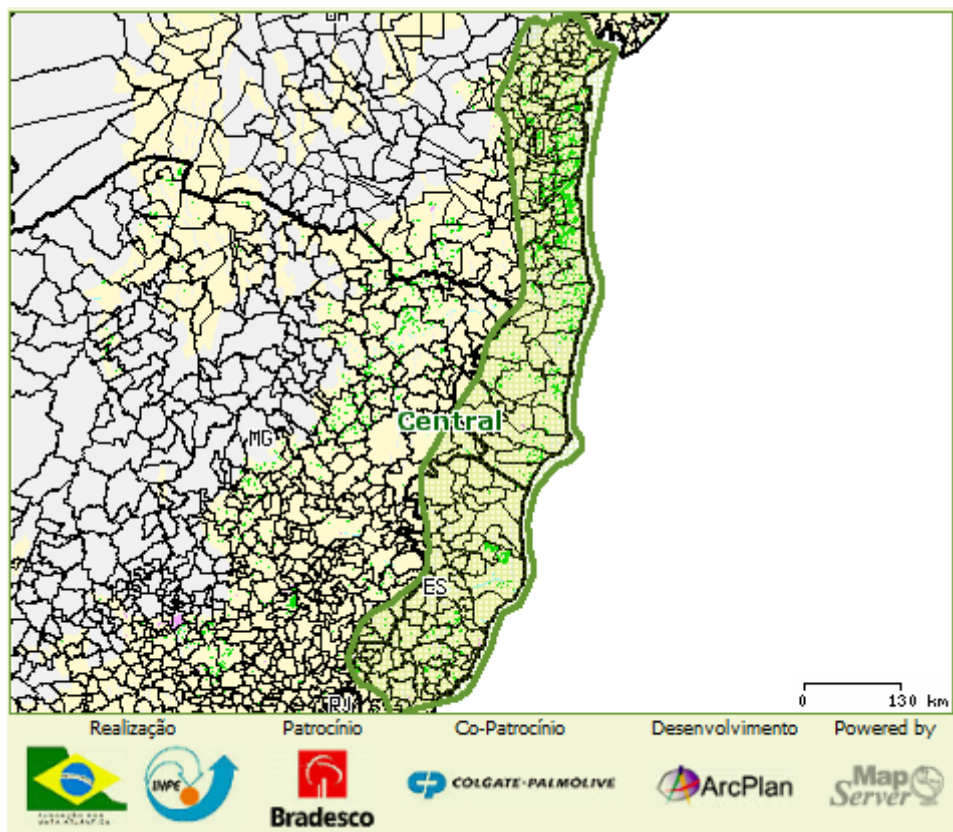


FIGURA 7 - Mapa apresentando área de ocorrência natural de FOM (A); Mapa apresentando área de ocorrência atual de FOM (B).



FONTE: SNUC – MMA (2011)

FIGURA 8 – Corredores de Biodiversidade Central da Mata Atlântica e Serra do Mar.



(A)

FONTE: O Autor (2010)



(B)

FONTE: MBM (2010)

FIGURA 9 – Fotos das áreas de coleta das populações de *D. sellowiana*. (A) Santa Catarina; (B) Paraná; (C) Rio Grande do Sul; (D) Rio de Janeiro; (E) São Paulo; (F) Minas Gerais; (G) Espírito Santo



(C)

FONTE: O Autor (2010)



(D)

FONTE: Mayara Caddah (2010)

FIGURA 9 (Cont.) – Fotos das áreas de coleta das populações de *D. sellowiana*. (A) Santa Catarina; (B) Paraná; (C) Rio Grande do Sul; (D) Rio de Janeiro; (E) São Paulo; (F) Minas Gerais; (G) Espírito Santo.



(E)

FONTE: O Autor (2010)



(F)

FONTE: O Autor (2010)

FIGURA 9 (Cont.) – Fotos das áreas de coleta das populações de *D. sellowiana*. (A) Santa Catarina; (B) Paraná; (C) Rio Grande do Sul; (D) Rio de Janeiro; (E) São Paulo; (F) Minas Gerais; (G) Espírito Santo.



FONTE: O Autor (2010)

FIGURA 9 (Cont.) – Fotos das áreas de coleta das populações de *D. sellowiana*. (A) Santa Catarina; (B) Paraná; (C) Rio Grande do Sul; (D) Rio de Janeiro; (E) São Paulo; (F) Minas Gerais; (G) Espírito Santo.

4.4 CONSERVAÇÃO

Sob o ponto de vista da Genética da Conservação, quanto maior a variabilidade genética, maiores as chances de adaptação da população às mudanças ambientais ao longo do processo evolutivo (FALK e HOLSINGER, 1991; FRANKHAM *et al.*, 2004 e 2008). Neste estudo, as populações de *D. sellowiana* coletadas nos estados da região sudeste e em SC apresentam maior variabilidade genética, sendo então considerada importante a preservação destas para a conservação da espécie.

Tanto a região sudeste como o Estado de SC, apresentam áreas de FOM com potencial para conservação. Os fragmentos de FOM no sudeste onde ocorrem as populações estudadas de *D. sellowiana* já estão protegidos por UC's (SNUC – MMA, 2011), em SC as áreas ainda precisam de proteção (MEDEIROS *et al.*, 2005; KLAUBERG *et al.*, 2010).

Entretanto, acredita-se também, que populações geneticamente diferenciadas, como as populações de *D. sellowiana* nos Estados do PR e RS, são importantes para conservação da espécie e requerem manejo genético separadamente das demais populações, sendo consideradas Unidades Evolutivamente Significantes (*Evolutinary Significant Units* – ESU's) para conservação (ALLENBORG e LUIKART, 2007; FRANKHAM *et al.*, 2008).

De qualquer forma, este estudo revela através do padrão genético observado, que as populações de *D. sellowiana* estudadas podem ser consideradas entidades dinâmicas capazes de se adaptar as variações ambientais (FRANKHAM *et al.*, 2004), merecendo assim, que esforços sejam voltados para a conservação da espécie. Adicionalmente, *D. sellowiana* é uma espécie característica de Floresta Ombrófila Mista juntamente com *Araucaria angustifolia* e outras espécies também ameaçadas de extinção, evidenciando desta forma, não só a importância da conservação da espécie em si, mas também a preservação da fitofisionomia a que ela pertence (FERNANDES, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2004 e 2005, KLAUBERG *et al.*, 2010).

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, R. *et al.* Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 5177-5188, 2008.
- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Australia: Blackwell Publishing, 2007.
- ALLY, D.; RITLAND, K. A case study: looking at the effects of fragmentation on genetic structure in different life story stages of old-growth mountain hemlock (*Tsuga mertensiana*). **Journal of Heredity**, v. 98, p. 73-78, 2007.
- ARSHAD, M. *et al.* Phylogeny and phylogeography of critically endangered *Gyps* species based on nuclear and mitochondrial markers. **J. Ornithol.**, v. 150, p. 419-430, 2008.
- BARRY COX MA, C.; MOORE, P.D. A History of Biogeography. In: _____. **Biogeography**. Austrália: Blackwell, 2006. p. 18-19.
- BARTH, S. *et al.* Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) in inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 495-505, 2002.
- BEHLING, H. Late Quaternary vegetation, climate and fire history from the *Araucaria* forest and Campos region from Serra Campo Gerais, Paraná State (South Brazil). **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 97, p. 109-121, 1997.
- BEHLING, H. South and Southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 177, p. 19-27, 2002.
- BEHLING, H. *et al.* Holocene environmental changes from the São Francisco de Paula region, Southern Brazil. **F. South Am. Earth Sci.**, v. 14, p. 631-639, 2001.
- BEHLING, H.; PILLAR, V.D. Late Quaternary vegetation, biodiversity and fire dynamics on the southern Brazilian highland and their implication for conservation and management of modern *Araucaria* Forest and grassland ecosystems. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 362, p. 243-251, 2007.
- BICKFORD, D. *et al.* Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends Ecol. Evol.**, v. 22, p. 148-155, 2007.

- CABANNE, G.S. *et al.* Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 49, p. 760–773, 2008.
- CAMACHO, F.J.; LISTON, A. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR). **American Journal of Botany**, v. 88, p. 1065-1070, 2001.
- CARLQUIST, S. **Island Biology**. New York: Columbia University Press, 1980.
- CARNAVAL, A.C. *et al.* Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, v. 323, p. 785–789, 2009.
- CHIANG, T-Y. *et al.* Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between the *atpB* and *rbcl* genes of chloroplast DNA. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 39, p. 245-250, 1998.
- CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) - Apêndices I, II and III, valid from 22 May 2009. Disponível em: <http://www.cites.org/esp/app/appendices.shtml>. Acesso em 01/9/2010.
- COLLEVATTI, R.G. *et al.* Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense* on variability on microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 349-356, 2001.
- CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, v. 34, p. 66-71, 1991.
- DESHPANDE, A.U. *et al.* Genetic diversity across natural populations of three montane plant species from the Western Ghats, India revealed by inter-simple sequence repeats. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 2397-2408, 2001.
- DONG *et al.* Genetic variation in the endangered aquatic fern *Ceratopteris thalictroides* (Parkeriaceae) in China: implications from RAPD e ISSR data. **Botanical Journal of Linnean Society**, v. 157, p. 657-671, 2008.
- DUBREUIL, M. *et al.* Genetic effects of chronic habitat fragmentation revisited: strong genetic structure in a temperate tree, *Taxus baccata* (Taxaceae), with great dispersal capability. **American Journal of Botany**, v. 97, p. 303-310, 2010.
- DUNN, I.S.; BLATTNER, F.R. Shons 36 to 40: Multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. **Nucleic Acids Research.**, v. 15, p. 2677-2698, 1986.
- EVANNO, G. *et al.* Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14: 2611-2620, 2005.

- EXCOFFIER, L. Special Issue: Analytical Methods in phylogeography and genetic structure. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 727, 2004.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567, 2010.
- FALK, D. A.; HOLSINGER, K. E. **Genetics and Conservation of Rare Plants**. New York: Oxford University Press, 1991.
- FALUSH, D. *et al.* Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, 2007.
- FERNANDES, I. Taxonomia dos representantes de Dicksoniaceae no Brasil. **Pesquisas**, v. 50, p. 5-26, 2000.
- FILIPPINI, E.C.P. *et al.* Light and storage on the germination of spores of *Dicksonia sellowiana*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, p. 21-26, 1999.
- FITZPATRICK, S.W. *et al.* Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. **Mol. Ecol.**, v. 18, p. 2877–2896, 2009.
- FONSECA, G.A.B. *et al.* p. 47-65. **Corredores de Biodiversidade: o Corredor Central da Mata Atlântica**. In: Arruda, M.B.; Sá, L.F.S.N. **Corredores Ecológicos: uma abordagem integradora de ecossistemas no Brasil**. Brasília: Ibama, 2004, p. 47-65.
- FRAGA, L.L. *et al.* Composição e distribuição vertical de pteridófitas epifíticas sobre *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae), em Floresta Ombrófila Mista no sul do Brasil. **Biota Neotrop.**, v. 8, p. 123-129, 2008.
- FRANKE, C.R. *et al.* **Mata Atlântica e Biodiversidade**. Salvador: Edufba, 2005.
- FRANKHAM, R. *et al.* **A Primer of Conservation**. New York: Cambridge University Press, 2004.
- FRANKHAM, R. *et al.* **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.

- FUPEF (Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná). **Conservação do Bioma Floresta com Araucária: relatório final**. In: Diagnóstico dos remanescentes florestais. Curitiba: PROBIO Araucária 2, p. 236, 2001.
- GEIGER, J.M.O. *et al.* Molecular biogeography and origins of the Hawaiian fern flora. *Brittonia*, v. 59, p. 142-158, 2007.
- GIBBS, J.P. Demography versus habitat fragmentation as determinants of genetic variation in wild populations. **Biological Conservation**, v. 100, p. 15-20, 2001.
- GOMES, G.S. *et al.* Variability in the germination of spores among and within natural populations of the endangered tree fern *Dicksonia sellowiana* Hook. (Xaxim). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 1-10, 2006.
- GONZÁLEZ, J.; WINK, M. Genetic differentiation of the Thorn-tailed Rayadito *Aphrastura spinicauda* (Furnariidae: Passeriformes) revealed by ISSR profiles suggests multiple palaeoreugia and high recurrent gene flow. **The International Journal of Avian Science**, v. 152, p. 761-774, 2010.
- GRADSTEIN, S.R.; VAN ZANTEN, B.O. International Botanic Congress, XVI, 2001, St. Louis, **Abstract**, number 15, 14, 13. High altitude dispersal of spores: an experimental approach.
- GRAZZIOTIN, F.G. *et al.* Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Mol. Ecol.**, v. 15, p. 3969–3982, 2006.
- GUICKING, D. *et al.* Cryptic diversity in a Eurasian water snake (*Natrix tessellata*, Serpentes: Colubridae): Evidence from mitochondrial sequence data and nuclear ISSR-PCR fingerprinting. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 9, p. 201-214, 2009.
- GUPTA, M. *et al.* 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.
- HAFFER, J. Speciation in amazonian forest birds. **Science**, v. 165, p. 131–137, 1969.
- HAINES, R.J. *et al.* Pollination in Araucaria Juss. **Australian Journal of Botany**, v. 32, p. 583–594, 1984.
- HAMRICK, J.L. Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management**, v. 197, p. 323-335, 2004.

- HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozymediversity in plants. p. 43-63. In: **Populations Genetics, Breeding and Genetic Resources**. Massachusetts: Sinauer & Associates, 1996, p.43-63.
- HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 351, p. 1291-1298, 1996.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HARPENDING, H.C. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. **Hum. Biol.**, v. 66, p. 591–600, 1994.
- HENNEQUIN, S. *et al.* Molecular systematics of the fern genus *Hymenophyllum s.l.* (Hymenophylaceae) based on chloroplastic coding and noncoding regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 27, p. 283-301, 2003.
- HILL, C.R. Jurassic *Angiopteris* (Marattiales) from North Yorkshire. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 51, p. 65-93, 1987.
- HOLSINGER, K.E. Analyses of genetic diversity in geographically structured populations: a Bayesian perspective. **Hereditas**, v. 130, p. 245-255, 1999.
- HOLSINGER, K.E. *et al.* A Bayesian method for analysis of genetic population structure with dominant marker data. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1157-1164, 2002.
- HOLSINGER, K.E.; LEWIS, P.O. Hickory version 1.1. Department of ecology and evolutionary biology, University of Connecticut. [<http://darwin.eeb.uconn.edu/hickory/hickory.html>], 2003.
- HUECK, K. **As Florestas da América do Sul**. Brasília: Universidade de Brasília, 1972.
- JULIO, N. *et al.* RAPD and ISSR markers indicate diminished gene flow due to recent fragmentation of *Polylepis australis* woodlands in central Argentina. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 329-335, 2008.
- JUMP, A.S.; PEÑUELAS, J. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a Wind-pollinated tree. **PNAS**, v. 103, p. 8096-8100, 2006.
- KERSHAW, P.; WAGSTAFF, B. The southern conifer family Araucariaceae: history, status and value for paleoenvironmental reconstruction. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 32, p. 397–414, 2001.

- KETTLE, C.J. *et al.* Identifying the early genetic consequences of habitat degradation in a highly threatened tropical conifer, *Araucaria nemorosa* Laubenfels. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 3581-3591, 2007.
- KING, R.A. *et al.* Population differentiation of *Potamogeton pectinatus* in the Baltic Sea with reference to waterfowl dispersal. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1947-1956, 2002.
- KLAUBERG, C. *et al.* Florística e estrutura de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista no Planalto Catarinense. **Biotemas**, v. 23, p. 35-47, 2010.
- KLEIN, R.M. O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Sellowia**, v. 12, p. 17-44, 1960.
- KORALL, P. *et al.* Tree ferns: monophyletic groups and their relationships as revealed by four protein-coding plastid loci. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 39, p. 830-845, 2006.
- KORPELAINEN, H. *et al.* Four tropical, closely related fern species belonging to the genus *Adiantum* L. are genetically distinct as revealed by ISSR fingerprinting. **Genetica**, v. 125, p. 283-291, 2005.
- KUMAR, S. *et al.* A Biologist centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics**, v. 9, p. 299-306, 2008.
- LANDERGOTT, U. *et al.* Historical bottlenecks decrease genetic diversity in natural populations of *Dryopteris cristata*. **Heredity**, v. 87, p. 344–355, 2001.
- LEVSEN, N.D. *et al.* Nei's to Bayes': Comparing computational methods and genetic markers to estimate patterns of genetic variation in *Tolpis* (Asteraceae). **American Journal of Botany**, v. 95, p. 1466-1474, 2008.
- LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evol. Biol.** v. 6, p. 381-398, 1972.
- LIEBERMAN, B.S.; ELDREDGE, N.. Trilobite biogeography in the middle Devonian: geological processes and analytical methods. **Paleobiology**, v. 22, p. 66-79, 1996.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v. 15, p. 65-95, 1984.
- LOWE, A.J. *et al.* Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, v. 95, p. 255-273, 2005.
- LUQUE, C. *et al.* Apparent influences of host-plant distribution on the structure and the genetic variability of local populations of the Purple Clay (*Diarsia brunnea*). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 6-15, 2009.

- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Res.**, v. 27, p. 209-220, 1967.
- MEDEIROS, J.D. **Floresta com Araucária: um símbolo da Mata Atlântica a ser salvo da extinção**. Rio do Sul: Apremavi, p. 82, 2004.
- MEDEIROS, J.D. *et al.* Seleção de áreas para criação de Unidades de Conservação na Floresta Ombrófila Mista. **Biotemas**, v. 18, p. 33-50, 2005.
- MELONI, M. *et al.* Genetic variation in five Mediterranean populations of *Juniperus phoenicea* as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Ann. Bot.**, v. 97, p. 299-304, 2006.
- MITTERMEIER, R.A., *et al.* **Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. Chicago: University of Chicago Press, 2005.
- MORAN, R. C. **A Natural History of Ferns**. Portland: Timber Press, 2004.
- MORAN, R.C. **Diversity, biogeography, and floristics**. In: Ranker, T.A. e Haufler, C.H. *Biology and evolution of ferns and lycophytes*. London: Cambridge University Press, 2008.
- MORELLATO, L.P.C.; HADDAD, C.F.B. The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 32, p. 786-792, 2000.
- M'RABET, S.M. *et al.* Between introgression events and fragmentation, islands are the last refuge for the American crocodile in Caribbean Mexico. **Mar. Biol.**, v. 156, p. 1321-1333, 2009.
- MONTOYA, D. *et al.* Animal versus wind dispersal and the robustness of tree species to deforestation. **Science**, v. 320, p. 1502-1504, 2008.
- MURRAY-SMITH, C. *et al.* Plant diversity hotspots in the Atlantic Coastal Forest of Brazil. **Conservation Biology**, v. 23, p. 151-163, 2009.
- MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.
- NASON, J.D. *et al.* **Dispersal and dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations**. In: Laurence, W.F.; Bierregaard, R.O. *Tropical Forest Remnants: Ecology, management and conservation of fragmented communities*. Chicago: University of Chicago Press, p. 304-320, 1997.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **Am. Nat.**, v. 106, p. 283-292, 1972.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the**

- National Academy of Sciences**, v. 70, p. 3321-3323, 1973.
- NEI, M. *F*-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, v. 41, p. 225-233, 1977.
- OUBORG, N.J. *et al.* The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants. **Journal of Ecology**, v. 94, p. 1233-1248, 2006.
- PELLEGRINO, K.C.M. *et al.* Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 85, p.13-26, 2005.
- PRESAS, M.A. *et al.* Land planarians (Platyhelminthes) as a model organism for fine-scale phylogeographic studies: understanding patterns of biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot, v. 24, p. 887-896, 2011.
- PRITCHARD, J.K. *et al.* Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.
- PUCHALSKI, A. *et al.* Variação em populações naturais de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze associada a condições edafo-climáticas. **Scientia Forestalis**, v. 70, p. 137-148, 2006.
- RANAL, M. Congresso Brasileiro de Botânica, 50, 1999, Blumenau. **Anais**. Ranal, M. Estado da arte e perspectivas da pteridologia no Brasil: ecologia e fisiologia.. p. 310-311.
- RANKER, T.A.; GEIGER, J.M.O. Population genetics. In:____. **Biology and evolution of ferns and lycophytes**. London: Cambridge University Press, 2008.
- REDDY, M.P. *et al.* Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17, 2002.
- RIBEIRO, M.C. *et al.* The brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.
- RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil. Aspectos ecológicos 2**. São Paulo: Hucitec / Edusp, 1979.
- ROOGE, G.D. *et al.* Cryopreservation of spores of *Dicksonia sellowiana*: endangered tree fern indigenous to South and Central America. **Cryo-Letters**, v. 21, p. 223-230, 2000.
- ROY, A. *et al.* Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. **Theor Appl Genet.**, v. 85, p. 173-180, 1992.

- ROUX, O. *et al.* ISSR-PCR: tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 43, p. 240-250, 2007.
- RUSCHI, A. Fitogeografia do Estado do Espírito Santo. Considerações gerais sobre a distribuição da flora do Estado do Espírito Santo. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**. Série Botânica 1, p. 1-353, 1950.
- SCHMITT, J.L. *et al.* Aspectos florísticos e ecológicos de pteridófitas epifíticas em cáudices de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Pteridophyta, Dicksoniaceae), São Francisco de Paula, RS, Brasil. **Pesquisas Bot.**, v. 56, p. 161-172, 2005.
- SCHNELLER, J.J. How much genetic variation in fern populations is stored in the spore banks? A study of *Anthyrium filix-femina* (L.) Roth. **Botanical Journal of Linnean Society**, v. 127, p. 195-206, 1998.
- SENNA, R.M. **Pteridófitas no interior de uma floresta com araucária: composição florística e estrutura ecológica**. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1996.
- SHEPHERD, L.D. *et al.* Fire and Ice: volcanic and glacial impacts on the phylogeography of the New Zealand forest fern *Asplenium hookerianum*. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 4536-4549, 2007.
- SILVA, L.C.R. *et al.* Past century changes in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze water use efficiency and growth in forest and grassland ecosystems of southern Brazil: implications for forest expansion. **Global change Biology**, v. 15, p. 2387-2396, 2009.
- SIMPSON, B. **Quaternary biogeography of the high montane regions of South America**. Duellman WE, Lawrence, Kansas: University of Kansas, 1979
- SKOG, J.E. Biogeography of Mesozoic leptosporiangiate ferns related to extant ferns. **Brittonia**, v. 2, p. 236-269, 2001.
- SMITH, A. R. Comparison of fern and flowering plant distributions with some evolutionary interpretations for ferns. **Biotropica**, v. 4, p. 4–9, 1972.
- SMITH, A. R. *et al.* A classification for extant ferns. **Taxon**, v. 55, p. 705-731, 2006.
- SNUC (Sistema Nacional de Unidades de Conservação) – MMA (Ministério do Meio Ambiente). Disponível em: www.mma.gov.br/snuc. Acesso em: 01/04/2011.

- SONEGO, R.C. *et al.* Descrição da estrutura de uma Floresta Ombrófila Mista, RS, Brasil, utilizando estimadores não-paramétricos de riqueza e rarefação de amostras. **Acta Bot. Bras.**, v. 21, p. 943-955, 2007.
- SPORNE, K.R. **The morphology of pteridophytes; the structure of ferns and allied plants**. London: Hutchinson University Library, 1970.
- SU, Y. *et al.* Population genetic structure and phylogeographical pattern of a relict tree fern, *Alsophila spinulosa* (Cyatheaceae), inferred from cpDNA *atpB-rbcL* intergenic spacers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 109, p. 1459-1467, 2004.
- TABERLET, P. *et al.* Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, v. 17, p. 1105-1109, 1991.
- TAJIMA, F. The Effect of Change in Population Size on DNA Polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 597-601, 1989.
- TRYON, R. M. Development and evolution of fern floras of oceanic islands. **Biotropica**, v. 2, p. 76-84, 1970.
- TRYON, R. M. Endemic areas and speciation in tropical American ferns. **Biotropica**, v. 4; p. 76-84, 1972.
- TRYON, R. M. The biogeography of species, with special reference to ferns. **Botanical Review**, v. 52, p. 118-156, 1986.
- TRYON, R.M.; TRYON, A.F. **Ferns and allied plants, with special reference to Tropical America**. New York: Springer-Verlag, 1982.
- TRYON, A.F.; LUGARDON, B. Spores of the pteridophyta, p. 648. New York: Springer-Verlag, 1991.
- VAN de HEEDE, C.J. *et al.* Phylogenetic analysis of *Asplenium* subgenus *ceterach* (Pteridophyta: Aspleniaceae) based on plastid and nuclear ribosomal ITS DNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 90, p. 481-495, 2003.
- VAN KONIJNENBURG-VAN CITTERT, J.H.A. Ecology of some Late Triassic-Early Cretaceous ferns in Eurasia. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 119, p. 113-124, 2002.
- VELOSO, H.P. *et al.* Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: IBGE, 1991.
- VELOSO, H.P.; GOES FILHO, L. **Fitogeografia brasileira - classificação fisionômico-ecológica da vegetação neotropical**. 1982. Boletim Técnico do Projeto RADAMBRASIL, Série Vegetação 1: 1-80.

- WANG, Z-J; GUAN, K-Y. Genetic structure and phylogeography of a relict tree fern, *Sphaeropteris brunoniana* (Cyatheaceae) from China and Laos inferred from cpDNA sequence variations: Implications for conservation. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 49, p.72-79, 2011.
- W.C.M.C. (World Conservation Monitoring Centre) - International trad tree ferns: an evaluation on the application of CITES. Draft report, 1995. Disponível em: <http://www.unep-wcmc.org/>. Acesso em: 14/04/2009.
- WOLFE, A.D. *et al.* Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. **Mol. Ecol.**, v. 7, p. 1107-1125, 1998.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, p. 114-138, 1943.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1951.
- YEH, F. *et al.* Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis, Popgene version 1.31, 1999. Disponível em: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>. Acesso em: 01/12/2010.
- YOUNG, A. *et al.* The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Tree**, v. 11, p. 413-418, 1996.
- ZIETKIEWICZ, E. *et al.* Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-183, 1994.