



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Desvendando a história evolutiva da espécie críptica
Hymenophyllum sturmii (Hymenophyllaceae, Polypodiopsida)

Fernanda Pessi de Abreu

Porto Alegre

2024



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Desvendando a história evolutiva da espécie críptica
Hymenophyllum sturmii (Hymenophyllaceae, Polypodiopsida)

Fernanda Pessi de Abreu

Projeto de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dr^a Caroline Turchetto

Co-orientador: Prof. Dr^o Felipe Gonzatti

Porto Alegre

2024

Resumo: *Hymenophyllum* subg. *Mecodium* (Hymenophyllaceae) é representado por cerca de 35 espécies de samambaias epífitas com distribuição Pantropical. Na Floresta Atlântica, seis espécies desse subgênero são reconhecidas, incluindo a espécie críptica *Hymenophyllum sturmii*. Apesar de ser endêmica da Floresta Atlântica e do Pampa, *H. sturmii* apresenta uma ampla distribuição geográfica. Essa espécie exibe uma natureza parafilética, não sendo possível estabelecer uma ligação entre a distribuição dessa espécie e as diferentes linhagens evolutivas. A delimitação taxonômica atual para *Mecodium* não permite diferenciar as linhagens evolutivas de *H. sturmii* por meio de caracteres morfológicos. As espécies crípticas representam uma oportunidade para estudos evolutivos, ao mesmo tempo que são um desafio para conservação, visto que resultam em avaliações imprecisas da biodiversidade e dos status de ameaça. O objetivo geral deste projeto é investigar as relações evolutivas em *Hymenophyllum* subg. *Mecodium* com ênfase na espécie críptica *H. sturmii*, a fim de compreender os processos de diversificação do grupo no domínio Floresta Atlântica e no Pampa, bem como contribuir para a delimitação das unidades taxonômicas e disponibilizar informações genéticas para conservação. Para isso serão empregados métodos filogeográficos, modelagem ecológica de nicho, morfometria e citogenética. Essas abordagens irão auxiliar na compreensão dos padrões evolutivos que diferem a *H. sturmii* e outras espécies de *Mecodium*. Desse modo, pretende-se delimitar a taxa que constitui a espécie críptica *H. sturmii*, analisar a diversidade genética e a história demográfica, bem como avaliar os efeitos das mudanças climáticas na distribuição potencial das espécies. Assim, este projeto contribuirá para desvendar as complexas relações evolutivas e taxonômicas em *Hymenophyllum* subg. *Mecodium*.

Palavras-chave: Citogenética, Evolução, Filogeografia, Floresta Atlântica, Hymenophylloideae, Modelagem de Nicho Ecológico, Morfometria, Pampa, Samambaias.

Abstract: *Hymenophyllum* subg. *Mecodium* (Hymenophyllaceae) is represented by around 35 species of epiphytic ferns with a Pantropical distribution. In the Atlantic Forest, six species of this subgenus are recognized, including the cryptic species *Hymenophyllum sturmii*. This species exhibits a paraphyletic nature. Despite being endemic to the Atlantic Forest and the Pampas, *H. sturmii* has a broad geographic distribution. At the moment, it has not been possible to establish a connection between the distribution of this species and different evolutionary lineages. The current taxonomic delimitation for *Mecodium* does not allow differentiation of evolutionary lineages of *H. sturmii* based on morphological characters. Cryptic species represent an opportunity for evolutionary studies but also pose a challenge for conservation as they lead to inaccurate assessments of biodiversity and threat status. The general objective of this project is to investigate the evolutionary relationships in *Hymenophyllum* subg. *Mecodium*, with a focus on the cryptic species *H. sturmii*, to understand the diversification processes of the group within the Atlantic Forest and the Pampas domains, and to contribute to the delimitation of taxonomic units and provide genetic information for conservation purposes. Phylogeographic methods, ecological niche modeling, morphometrics, and cytogenetics will be employed. These approaches will help understand the evolutionary patterns that differentiate *H. sturmii* from other *Mecodium* species. Thus, the aim is to delineate the taxa comprising the cryptic species *H. sturmii*, analyze genetic diversity and demographic history, and evaluate the effects of climate change on the potential distribution of the species. Therefore, this project will contribute to unraveling the complex evolutionary and taxonomic relationships within *Hymenophyllum* subg. *Mecodium*.

Key-words: Atlantic Forest, Cytogenetics, Ecological Niche Modeling, Evolution, Ferns, Hymenophylloideae, Morphometrics, Pampa, Phylogeography.

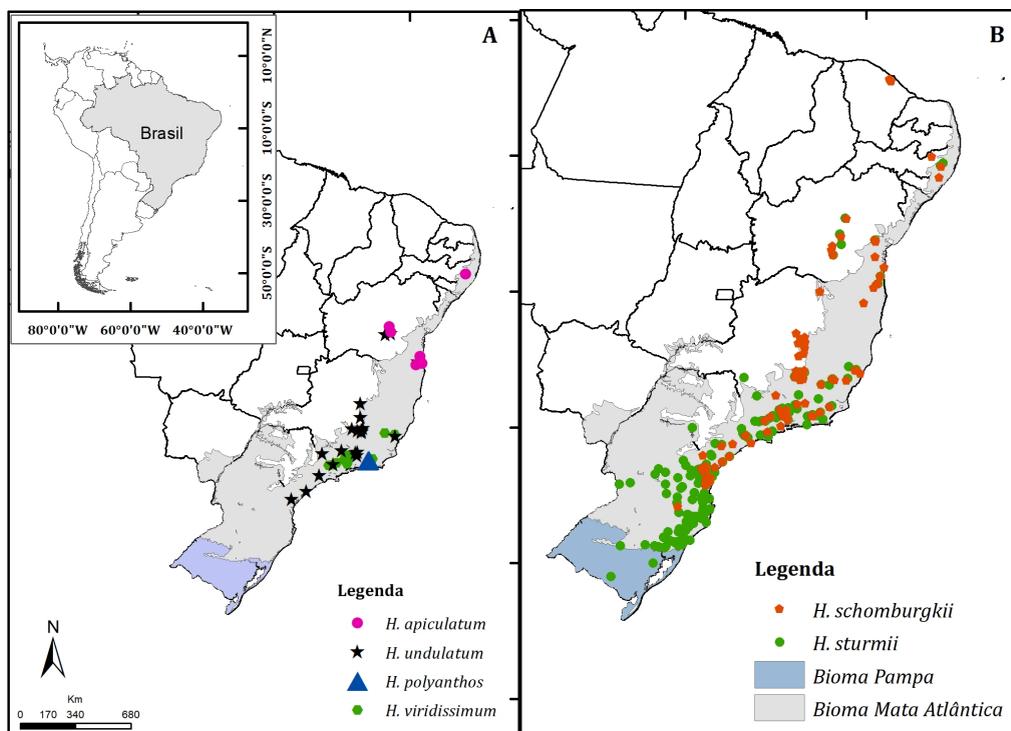
Sumário

1. Introdução	6
2. Justificativa	8
3. Objetivos	10
3.1. Objetivo Geral	10
3.2. Objetivos Específicos	10
4. Materiais e Métodos	11
4.1. Amostragem	11
4.2. Análises Filogeográficas	12
4.3. Modelagem de Nicho Ecológico	13
4.4. Análises Citogenéticas	14
4.5. Análises Morfométricas	15
4.6. Estabelecimento de centros de diversidade genética e conservação	16
5. Cronograma	16
6. Orçamento	17
7. Infraestrutura, Colaborações e Recursos Financeiros	17
8. Resultados esperados	18
9. Referências	19

1. Introdução

Hymenophyllaceae Mart. está entre os grupos de samambaias leptosporangiadas ocorrentes na Floresta Atlântica (Gonzatti and Windisch, 2024). Esta é a única família da ordem Hymenophyllales A.B.Frank e compreende cerca de 450 espécies organizadas em nove gêneros com distribuição desde a região tropical até as regiões temperadas (Ebihara *et al.*, 2006; PPG 2016). Essas plantas não possuem adaptações como estômatos e cutícula para controlar a perda de água, tornando-as dependentes da disponibilidade hídrica do ambiente circundante (Dubuisson *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2006). Assim, elas são geralmente encontradas em locais úmidos e com baixa luminosidade (Parra *et al.*, 2009; Proctor 2012). Hymenophyllaceae é dividida em duas subfamílias: Trichomanoideae C.Presl, que abrange oito gêneros; e Hymenophylloideae com apenas o gênero *Hymenophyllum* Sm. (Ebihara *et al.*, 2006; PPG 2016).

Hymenophyllum apresenta 250 espécies circunscritas em 10 subgêneros e delimitadas por caracteres morfológicos e moleculares. *Hymenophyllum* subg. *Mecodium* C. Presl ex Copel. apresenta 35 espécies com hábito comumente epífito. Este subgênero caracteriza-se por apresentar número cromossômico básico de $x = 28$, frondes com tecido laminar de margem inteira e glabro (Ebihara *et al.*, 2006). Atualmente, na Floresta Atlântica brasileira e no Pampa, são reconhecidas seis espécies do subgênero *Mecodium*, incluindo *H. apiculatum* Mett. ex Kuhn, *H. polyanthos* (Sw.) Sw. s.s., *H. schomburgkii* C. Presl ex J. W. Sturm, *H. undulatum* (Sw.) Sw., *H. viridissimum* Fée e *H. sturmii* Bosch (Gonzatti *et al.*, 2023) (**Figura 1**).



Mapa 1: Mapa de distribuição geográfica das espécies/populações de *Hymenophyllum* sub. *Mecodium* ocorrentes nos biomas Mata Atlântica e Pampa, conforme pontos selecionados por Gonzatti *et al.* 2023. **O mapa não compreende todos os pontos de coleta conhecidos para as espécies, apenas pontos já visitados pelo grupo de pesquisa e revisados em herbários.**

As seis espécies são restritas aos neotrópicos; todavia, apresentam peculiaridades em termos de distribuição. *H. viridissimum* é a única espécie de *Mecodium* endêmica da Floresta Atlântica. Por sua vez, *H. apiculatum* possui uma distribuição descontínua, ocorrendo tanto na Floresta Atlântica quanto na região oeste da América do Sul, desde a Guiana até a Bolívia. *H. polyanthos* é encontrada na Floresta Atlântica, também com uma lacuna de distribuição, voltando a ser encontrada desde a Bolívia até o México. Já *H. schomburgkii* apresenta distribuição na Floresta Atlântica, com alguns registros também no Cerrado, e na região da Floresta Amazônica, estendendo-se até a Costa Rica. Quanto a *H. undulatum*, esta espécie é encontrada tanto na Floresta Atlântica quanto na Floresta Amazônica, abrangendo uma vasta extensão pela América do Sul e Central. Por fim, *H. sturmii* é endêmica do Brasil, ocorrendo tanto na Mata Atlântica quanto no Pampa (Gonzatti *et al.*, 2023).

A distribuição geográfica disjunta das espécies, como observado em *H. apiculatum*, *H. polyanthos*, *H. schomburgkii* e *H. undulatum*, são padrões espaciais intrigantes. Essa distribuição descontínua de táxons relacionados pode ser explicada, principalmente, por

eventos de dispersão, através da transposição de uma barreira geográfica preexistente, ou pode ser atribuída a processos vicariantes (Carvalho & Almeida, 2016). Além disso, a atual distribuição disjunta das espécies pode ser resultado de oscilações climáticas por meio de expansões e contrações de nicho ecológico (Hewitt, 2004; Wiens & Donoghue, 2004; Machado *et al.*, 2021; Pinto *et al.*, 2023).

Atualmente, a Floresta Amazônia e a Floresta Atlântica estão separadas por um corredor de vegetação seca (“diagonal seca”) formada pela Caatinga, Cerrado e Chaco (Carvalho & Almeida, 2016; Collevatti *et al.*, 2020; Luebert, 2021). Três rotas de conexão histórica foram propostas para explicar as associações filogeográficas observadas atualmente entre as Florestas Atlântica e Amazônica: uma através das florestas da Bacia do Paraná, do Chaco úmido e do Pantanal (rota sudeste-noroeste); uma segunda através de matas de galeria do Cerrado (rota central); e uma terceira rota através do nordeste do Brasil (rota nordeste) (Costa, 2003; Ledo & Colli, 2017; Machado *et al.*, 2021). Inúmeros grupos de plantas, incluindo samambaias, apresentam distribuição disjunta entre as Florestas Atlântica e Amazônica (Tryon & Tryon 1982, Costa *et al.*, 2017; Maciel *et al.*, 2017; Thode *et al.*, 2019; Masa *et al.*, 2021), sendo potenciais evidências para sustentar conexões anteriores entre esses dois domínios.

Em relação à delimitação das espécies de *Mecodium* encontradas na Floresta Atlântica, as espécies *H. apiculatum*, *H. polyanthos*, *H. schomburgkii*, *H. undulatum* e *H. viridissimum* constituem linhagens distintas e bem definidas. Todavia, *H. sturmii* é considerada uma espécie críptica, exibindo uma natureza parafilética. Apesar de ser endêmica da Mata Atlântica e do Pampa, *H. sturmii* apresenta uma ampla distribuição geográfica. Até o momento, não foi possível estabelecer uma ligação entre a distribuição dessa espécie e as diferentes linhagens evolutivas. Além disso, a delimitação taxonômica atual para *Mecodium* não permite diferenciar as linhagens evolutivas de *H. sturmii* por meio de caracteres morfológicos (Gonzatti *et al.*, 2023).

Espécies crípticas são constituídas por linhagens evolutivas distintas; porém, devido às marcantes convergências morfológicas que as tornam praticamente indistinguíveis, são agrupadas sob uma única designação de espécie (Bickford *et al.*, 2007; Heethoff 2018). Em samambaias, espécies crípticas são relativamente comuns e foram reportadas em diferentes grupos (Paris *et al.*, 1989; Yatabe *et al.*, 2009; Bauret *et al.* 2017). O estudo de espécies crípticas pode proporcionar novos *insights* sobre padrões e processos

evolutivos (Fiser *et al.*, 2018). Um exemplo notável foi uma pesquisa realizada na Ásia com samambaias do gênero *Dicranopteris* Bernh, na qual, através da integração de dados moleculares e morfológicos, foi possível identificar as diferentes linhagens genéticas (Wei *et al.*, 2022). Outro estudo envolvendo samambaias foi conduzido com a espécie críptica *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn, com abordagens filogenéticas e cariotípicas (Adjie *et al.*, 2017). É perceptível que o estudo de espécies crípticas é desafiador, sendo necessário a utilização de múltiplas abordagens para a identificação e diferenciação precisa das linhagens. Desta forma o emprego de métodos genéticos populacionais, como a filogeografia, juntamente com modelagem de nicho podem ser fundamentais para explorar a delimitação de linhagens evolutivas (Pahad *et al.*, 2019). Além disso, técnicas citogenéticas e métodos morfométricos são ferramentas muito importantes em estudos taxonômicos e evolutivos em samambaias (Dyer *et al.*, 2013; Vasques *et al.*, 2019).

Assim, este projeto busca integrar abordagens filogeográficas, ecológicas, morfométricas e citogenéticas a fim de responder às seguintes perguntas: (i) Será que as oscilações climáticas ocorridas no passado poderiam oferecer uma explicação para a atual distribuição disjunta entre as Florestas Amazônica e Atlântica para as espécies de *Mecodium*? Além disso, qual rota de conexão poderia explicar as associações encontradas nesses dois domínios? (ii) Qual o padrão de diversidade e estrutura genética populacional da espécie críptica *H. sturmi*? (iii) Quais linhagens evolutivas independentes podem ser identificadas? (iv) Será que as populações de *H. sturmi* ocorrentes no bioma Mata Atlântica e Pampa diferem entre si em termos de estrutura citogenética, filogeográfica e morfológica? (v) Como as oscilações climáticas durante períodos glaciais e interglaciais influenciaram a distribuição atual dessas linhagens? E, como essas linhagens irão responder às mudanças climáticas futuras? (vi) As espécies da Mata Atlântica do subgênero *Mecodium*, incluindo a espécie críptica *H. sturmi*, apresentam variações morfológicas e citogenéticas congruentes com os dados moleculares? Além disso, essas características poderiam ter influenciado a evolução e diferenciação dessas espécies? (vii) Até que ponto a variação nas características citogenéticas podem explicar as variações morfológicas no subgênero *Mecodium*? (viii) As Unidades de Conservação já existentes nos biomas Mata Atlântica e Pampa são suficientes para garantir a preservação da diversidade genética atual e futura deste grupo de samambaias?

2. Justificativa

A Floresta Atlântica é um dos biomas mais ricos em biodiversidade no planeta, sendo considerada a segunda maior floresta tropical da América do Sul. Com alta riqueza de espécies e taxas de endemismo, é considerada um dos 25 *hotspots* de biodiversidade mundial (Myers *et al.*, 2000; Rezende *et al.* 2018). No entanto, esse bioma tem sofrido uma descontrolada perda da sua cobertura vegetal levando à fragmentação de habitat (Ribeiro *et al.*, 2009). Esta perda de habitat aliada às mudanças climáticas e intensas pressões antropogênicas apresenta ameaça à conservação das espécies (Ribeiro *et al.*, 2009; Gasper *et al.*, 2021; IPCC 2023). Além disso, a Floresta Atlântica é o domínio fitogeográfico brasileiro mais diverso para todos os grupos de plantas, com exceção das gimnospermas (BFG 2018). Hymenophyllaceae está entre as samambaias que ocorrem neste domínio, que é considerado um centro de diversidade para as samambaias na região neotropical (Tryon 1972; Gonzatti and Windisch, 2024). Dentro desse grupo, a espécie críptica *H. sturmi* se destaca pela sua complexa história evolutiva, semelhanças morfológicas entre as diferentes linhagens e ampla distribuição geográfica.

De forma similar a Mata Atlântica, o domínio fitogeográfico conhecido como Pampa, embora ainda pouco conhecido, apresenta uma diversidade biológica surpreendente, que soma mais de 12.503 espécies (Andrade *et al.*, 2023). Apesar da aparente uniformidade, o Pampa é composto por diferentes fisionomias que englobam formações florestais e campestres (Hasenack *et al.*, 2010), abarcando uma série de ecossistemas fundamentais para o suprimento de serviços ecossistêmicos insubstituíveis, como a proteção dos recursos hídricos, solos e a manutenção de espécies da fauna e flora (Kuplich *et al.*, 2016). Tratando-se de samambaias e licófitas, ainda pouco se sabe sobre a real diversidade do grupo neste domínio fitogeográfico. Até 2014 apenas cinco espécies tinham sua ocorrência reconhecida no Pampa (Forzza *et al.*, 2012; Prado and Hirai, 2014), o que mudou recentemente com o fomento de pesquisas e desenvolvimento de novos levantamentos. Atualmente é estimada a ocorrência de 165 espécies de samambaias e licófitas segundo Andrade *et al.* (2023). O estado de conservação das mesmas neste bioma é ainda difícil de estimar, visto que o Pampa tem sofrido acentuados impactos antrópicos. Dados do MapBiomas mostram que somente no Pampa brasileiro, foram perdidos 20% de toda a cobertura vegetal original nesse domínio fitogeográfico entre os anos 2000 a 2010 (Lanfranco *et al.*, 2022).

A presença de espécies crípticas, como *H. sturmi*, é particularmente problemática do ponto de vista da conservação. A falta de clareza na delimitação dos táxons pode levar a estimativas imprecisas de biodiversidade e distribuição geográfica, assim como subestimar os *status* de ameaça e resposta às mudanças climáticas (Bickford *et al.*, 2007). A integração de abordagens filogeográficas, ecológicas, morfológicas e citogenéticas representa uma oportunidade única para preencher as lacunas de conhecimento existentes em relação a *H. sturmi* e outras espécies do subgênero *Mecodium* na Floresta Atlântica. A combinação dessas abordagens permitirá elucidar questões relacionadas ao padrão de diversidade genética, estrutura populacional, variação morfológica e citogenética, bem como influência dos fatores climáticos na distribuição geográfica das linhagens evolutivas.

Por fim, as samambaias, embora sejam um dos grupos de plantas mais negligenciados, possuem um potencial valioso para estudos evolutivos das plantas terrestres, por serem a linhagem irmã de todas as plantas com sementes (Sessa and Der, 2016). Apesar da relevância significativa em estudos evolutivos, trabalhos incluindo abordagem de genética de populações com samambaias têm sido negligenciados, em especial na América do Sul, onde nenhuma pesquisa envolvendo este grupo de plantas foi realizada (Pelosi & Sessa, 2021).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do projeto é investigar as relações evolutivas no gênero *Hymenophyllum* subg. *Mecodium* com ênfase para a espécie críptica *Hymenophyllum sturmi* a fim de compreender os processos evolutivos do grupo no domínio da Floresta Atlântica e do Pampa, bem como contribuir para a delimitação das unidades taxonômicas e disponibilizar informações genéticas para conservação.

3.2. Objetivos Específicos

- a) Investigar através das modelagem de nicho ecológico se as oscilações climáticas do passado podem ter impactado a atual distribuição disjunta das espécies do subgênero *Mecodium* da Floresta Atlântica;
- b) Determinar o número cromossômico e estimar o tamanho de genoma para as espécies do subgênero *Mecodium* que ocorrem na Floresta Atlântica e no Pampa;

- c) Relacionar o número cromossômico e o tamanho de genoma com dados filogenéticos, a fim de inferir a história evolutiva do subgênero *Mecodium*;
- d) Caracterizar a variação do involúcro das espécies do subgênero *Mecodium* da Floresta Atlântica por meio de morfometria geométrica;
- e) Identificar os diferentes morfotipos das linhagens que compõem a espécie críptica *H. sturmi* e comparar com as outras espécies do subgênero *Mecodium* da Floresta Atlântica através de morfometria linear;
- f) Relacionar os dados citogenéticos e morfométricos com a filogenia do grupo para investigar a influência dessas características na história evolutiva de *Hymenophyllum* subg. *Mecodium*;
- g) Estimar a diversidade genética e estrutura filogeográfica, bem como a história demográfica das linhagens que compõem a espécie críptica *H. sturmi*;
- h) Realizar a modelagem de nicho ecológico para o passado, presente e futuro para as diferentes linhagens de *H. sturmi*;
- a) Identificar centros de diversidade genética e centros prioritários para conservação de ao longo da Mata Atlântica e do Pampa para *H. sturmi*;
- a) Atualizar a taxonomia do subgênero *Mecodium* para o domínio da Mata Atlântica e Pampa, com base nos resultados filogeográficos, ecológicos, citogenéticos e morfológicos obtidos neste estudo.

4. Materiais e Métodos

4.1. Amostragem

Serão amostradas seis espécies de *Hymenophyllum* subg. *Mecodium* ocorrentes nas formações da Mata Atlântica e do Pampa (**Fig. 1**). Para amostragem das populações serão utilizados os pontos de ocorrência do mapa de distribuição presente na revisão para o subgênero publicada por Gonzatti e colaboradores (2023), bem como será consultada em conjunto com os bancos de dados *SpeciesLink* (<https://specieslink.net/>) e Global Biodiversity Information Facility – GBIF (<https://www.gbif.org/>). Serão priorizadas em nossa amostragem, Unidades de Conservação Estaduais e Federais, bem como outros pontos onde a ocorrência das espécies já é conhecida (**Tabela 1**). As licenças para coletas serão solicitadas nos órgãos competentes antes da realização das mesmas.

Os materiais testemunho de cada população serão depositados no Herbário da Universidade de Caxias do Sul (HUCS), e as duplicatas serão encaminhadas ao Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN).

Tabela 1: Lista de localidades selecionadas para a amostragem de espécies de *Hymenophyllum* subg. *Mecodium* ao longo dos biomas da Mata Atlântica e do Pampa.

Estado/Municípios	Bioma	UCs
Estado do Rio Grande do Sul: Bagé, Bom Jesus, Cambará do Sul, Canela, Faxinal do Soturno, São Francisco de Paula, São José dos Ausentes,	Mata Atlântica e Pampa	Centro de Pesquisa Pró-Mata/PUC, Floresta Nacional de Canela, Parque Aparados da Serra
Estado de Santa Catarina: Garuva, São Bonifácio, Urubici	Mata Atlântica	Parque Estadual da Serra do Tabuleiro, Parque Nacional de São Joaquim
Estado do Paraná: Campina Grande do Sul, Ponta Grossa	Mata Atlântica	Parque Estadual de Vila Velha, Parque Estadual Pico Paraná
Estado de São Paulo: Cruzeiro, São José do Barreiro	Mata Atlântica	Área de Proteção Ambiental da Serra da Mantiqueira, Parque Nacional da Serra da Bocaina,
Estado de Minas Gerais: Alto Caparaó, Baependi, Ouro Preto, Rio Preto	Mata Atlântica	Parque Estadual do Itacolomi, Parque Estadual da Serra do Papagaio, Parque Nacional do Caparaó
Estado do Rio de Janeiro: Itatiaia, Nova Friburgo, Teresópolis,	Mata Atlântica	Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Parque Nacional do Itatiaia, Área de Proteção Ambiental de Macaé de Cima
Estado da Bahia: Arataca, Mucugê, Palmeiras	Mata Atlântica	Parque Nacional da Serra das Lontras, Parque Natural Municipal do Morro do Pai Inácio
Estado de Pernambuco: Jaqueira	Mata Atlântica	Reserva Particular do Patrimônio Natural Frei Caneca

4.2. Modelagem de Nicho Ecológico*

*Inicialmente, a modelagem de nicho ecológico será conduzida para todas as espécies de *Mecodium* encontradas na Mata Atlântica. Em uma etapa posterior, a modelagem de nicho ecológico será agregada às análises filogeográficas, com foco exclusivo na espécie *H. sturmii*.

Os pontos de ocorrência para as seis espécies serão obtidos dos bancos de dados *SpeciesLink* (<https://specieslink.net/>), GBIF (<https://www.gbif.org/>) e Reflora (<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/>). Os registros encontrados serão

filtrados utilizando o pacote *CoordinateCleaner* em R (Zizka *et al.*, 2019). Os nichos da distribuição passada, presente e futura serão previstos separadamente para as seis espécies de *Mecodium* presentes na Floresta Atlântica, bem como para as diferentes linhagens de *H. sturmi*. Os dados climáticos serão extraídos dos repositórios *PaleoClim* (Brown and Dolan, 2018) e *WorldClim* (Hijmans *et al.*, 2005), com resolução de 2,5 arco-minutos. Os modelos serão projetados incluindo dados para o período atual (1950-200), Holoceno (ca. 6 mil anos), o último máximo glacial (LGM, ca. 21 mil anos) e para o último período interglacial (LIG, ca. 120 mil anos). Além disso, serão feitas previsões para cenários com condições climáticas futuras em 2050. As variáveis climáticas serão selecionadas por análise de correlação utilizando o pacote *usdm* em R (Naimi 2017), sendo escolhidas as variáveis com menor taxa de correlação. Para modelar a probabilidade de distribuição, será utilizado o algoritmo *MaxEnt* (Phillips *et al.*, 2006), disponível no pacote *dismo* em R (Hijmans *et al.*, 2022). Adicionalmente, para os modelos de projeção futura os resultados serão sobrepostos com polígonos do *World Database on Protected Areas* (Hanson 2022), para estimar se as áreas climaticamente adequadas para as linhagens estarão sob proteção das unidades de conservação.

4.3. Análises Citogenéticas

Para as análises citogenéticas e morfométricas todas as espécies do subgênero *Mecodium* presentes na Floresta Atlântica serão coletadas. Isso inclui *H. apiculatum*, *H. polyanthos*, *H. schomburkii*, *H. undulatum*, *H. viridissimum* e a espécie críptica *H. sturmi*.

Para contar o número de cromossomos das espécies selecionadas para este estudo, frondes com soros em diferentes estágios de maturação serão fixadas imediatamente após a coleta, por cerca de 24 horas em Carnoy (3 etanol absoluto: 1 ácido acético glacial). Em seguida, as amostras serão armazenadas no congelador até o momento da análise. Os esporângios individuais em estágio adequado de desenvolvimento serão preparados para análise meiótica seguindo o método de esmagamento e coloração em aceto-carmim a 2% ou carmim-propiónico a 2% (Manton 1950). As contagens de cromossomos meióticos ocorrerão em esporócitos, preferencialmente, em diacinese. As análises serão realizadas em fotomicroscópio Zeiss Axioplan e a captura e tratamento das imagens empregando o software AxioVision.

O conteúdo de DNA total será avaliado por citometria de fluxo de acordo com Dolezel *et al.* (2007). A cultivar *Pisum sativum* L. 'Ctirad' (2C = 9,09 pg; Dolezel *et al.*, 2007) será utilizada como padrão interno. Esse poderá ser modificado, conforme os resultados obtidos nas análises. As frondes jovens das espécies analisadas e o padrão interno serão picados com uma lâmina de barbear em uma placa de Petri sobre o gelo contendo 1 mL de tampão de lise. O tampão será determinado com base na qualidade dos picos nos histogramas de fluxo. A suspensão será filtrada através de uma malha de nylon de 35 µm e os núcleos serão corados com iodeto de propídio. Também será adicionado RNase a solução. O conteúdo de DNA será mensurado em um citômetro de fluxo FacsAria. Os valores 2C de DNA e os desvios padrão para cada táxon serão calculados utilizando uma relação linear dos sinais fluorescentes dos núcleos corados entre a amostra e o padrão interno.

4.4. Análises Morfométricas

As análises morfométricas serão realizadas para todas as espécies de *Mecodium* ocorrentes na Floresta Atlântica, utilizando tanto as amostras coletadas em campo, quanto materiais provenientes de herbários. Para tanto, revisões em coleções de Herbário serão realizadas por meio de visitas presenciais ou pedido de empréstimo. Pretende-se revisar ao menos as principais coleções de herbário do Sul do Brasil, como PACA, ICN, UPCB e MBM, os quais concentram o maior volume de amostras de *Mecodium* coletadas em diferentes regiões da Mata Atlântica e do Pampa, cobrindo uma ampla diversidade morfológica do grupo.

Para a morfometria linear serão realizadas medidas de características quantitativas: diâmetro do rizoma e do estípite, comprimento do estípite, comprimento e largura da ala do estípite, comprimento e largura da fronde, comprimento e largura da lâmina foliar, comprimento e largura da pina basal, comprimento e largura da pina média, e comprimento e largura do invólucro. As medidas serão mensuradas com paquímetro digital. Também serão realizadas medidas de materiais digitalizados utilizando o software ImageJ v.1.5 (Rasband 2004). Inicialmente, serão aplicadas análises de estatística descritiva e inferencial. Em seguida, será realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA), para entender como os caracteres explicam a variação presente nas espécies. Também será realizada uma análise de clusterização, para verificar se as delimitações propostas são

correspondentes com os dados da morfometria. As análises estatísticas serão realizadas em R.

Na morfometria geométrica serão analisadas as variações no formato e no tamanho do invólucro. As imagens fotográficas adquiridas serão organizadas em arquivos no formato TPS utilizando o software TPSUtil v.1.3850. A adição manual dos pontos de referência ocorrerá utilizando o software TpsDig2 (Rohlf 2015). Os arquivos serão sobrepostos através da Análise Generalizada de Procrustes. Essa etapa é necessária para eliminar os efeitos de posição, escala e orientação (Rohlf and Slice, 1990). A matriz resultante será utilizada para analisar o formato do invólucro independente do seu tamanho através de uma PCA e Análise de Variáveis Canônicas no MorphoJ (Klingenberg 2011). O tamanho do invólucro será mensurado através do centróide, que será transformado em log (Zelditch *et al.*, 2012), e as diferenças entre as espécies serão testadas através de uma Análise de Variância seguido pelo teste de post hoc. Também será realizada uma Análise Multivariada de Covariância usando o formato como variável de resposta, tamanho como covariável e espécie ou população como preditores para levar em conta os efeitos alométricos. Essas análises serão executadas com o pacote Geomorph em R (Adams *et al.*, 2018).

4.1. Análises Filogeográficas

As análises filogeográficas serão realizadas apenas para a espécie críptica *H. sturmii*, que será coletada ao longo de toda sua distribuição geográfica na Floresta Atlântica e do Pampa. Folhas jovens de aproximadamente 10 a 15 indivíduos por ponto de coleta serão preservadas em sílica gel, a fim de possibilitar a subsequente extração de DNA genômico.

Será realizada uma etapa de seleção dos marcadores moleculares para identificação de polimorfismos. Inicialmente, serão analisadas as sequências de marcadores plastidiais (espaçadores *atpB*, *rbcL*, *matK* e *rps4* e as regiões codificantes *atpB-rbcL*, *rbcL-accD*, e *rps4-trnS*) publicadas para *H. sturmii* (Vasques *et al.*, 2019; Gonzatti *et al.* 2023). Também serão testados outros marcadores utilizados em estudos filogeográficos com samambaias, como os marcadores plastidiais *trnH-psbA* e *trnL-trnF* e o marcador nuclear *gapCp* (Wang *et al.*, 2011; Schuler *et al.*, 2022). Será realizado um teste piloto das etapas de amplificação

e sequenciamento com um subconjunto de amostras para identificar o nível de polimorfismo dos marcadores e selecionar os alvos para amplificação.

O DNA genômico de cada amostra será extraído utilizando o kit de extração DNeasy plant mini - QIAGEN. A quantidade e a qualidade do DNA serão avaliadas e visualizadas, respectivamente, por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose. Os marcadores selecionados serão amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com protocolos descritos para cada marcador e ajustados quando necessário. O sequenciamento do DNA será realizado por demanda. O alinhamento das sequências será realizado no software MAFFT v.7 (Kato *et al.*, 2013). O software ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) será utilizado para realizar análises descritivas da diversidade genética (número de haplótipos, número de sítios polimórficos, diversidade haplotípica e nucleotídica). Também será construída uma rede genealógica de haplótipos utilizando o método *median-joining networks* através do programa NETWORK v.4.1 (Bandelt *et al.*, 1999).

As relações filogenéticas entre os haplótipos será analisada por Inferência Bayesiana utilizando o software BEAST 1.6.1 (Drummond and Rambaut, 2007). Para quantificar a diferenciação genética entre as populações será utilizado o índice F_{ST} . Também será realizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA), pela qual é possível estabelecer níveis hierárquicos de diferenciação populacional. Ambas as análises serão executadas através do programa ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010). Para relacionar distância genética e distância geográfica será aplicada uma Análise Espacial da Variância Molecular (SAMOVA) através do programa SAMOVA v.1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002). Além disso, para analisar a estrutura genética das populações por agrupamento de indivíduos será realizada a análise bayesiana da estrutura populacional pelo software BAPS v.2 (Corander *et al.*, 2004). Por fim, os testes de neutralidade D de Tajima F (Tajima 1989) de Fu (Fu 1997) serão utilizados para identificar possíveis processos demográficos históricos (expansão e contração), usando o software ARLEQUIN v. 3.5. Além disso, as mudanças no tamanho da população ao longo do tempo serão estimadas com uma análise Bayesiana (*Bayesian skyline plot* - BSP) implementada no programa BEAST.

4.6. Estabelecimento de centros de diversidade genética e conservação

A partir das análises dos coeficientes de variação genética entre as populações (F_{IT}) e dentro das populações (F_{ST}), previamente descritos no item 6.2 desta metodologia, serão identificados os *hotspots* de diversidade genética para *H. sturmi* ao longo dos domínios da Mata Atlântica e Pampa. Uma sobreposição cartográfica entre as distribuições das populações de maior diversidade genética e as Unidades de Conservação existentes nos domínios do Bioma Pampa e Mata Atlântica será realizada para a identificação de possíveis *gaps* de conservação ao longo destes biomas.

Será aplicado o fluxograma proposto por Ottewell *et al.* (2016), a fim de determinar estratégias de conservação genética em nível populacional baseadas em medidas de diferenciação genética e diversidade genética das espécies alvo deste projeto. A análise também levará em conta aspectos conservacionistas observados em campo, como fragmentação dos fragmentos florestais, pressão antrópica e extensão das populações. Dessa forma, será elaborado um guia que definirá as áreas prioritárias para conservação de *H. sturmi*, além de recomendações de ações de manejo destinadas às unidades de conservação e órgãos conservacionistas, visando à manutenção efetiva da diversidade genética do grupo.

5. Cronograma

Tabela 2. Cronograma das atividades que serão realizadas durante o doutorado.

Atividades	Semestres							
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
Realização das disciplinas	█							
Exame de proficiência		█						
Revisão Bibliográfica	█							
Expedições de coleta	█							
Modelagem de Nicho Ecológico			█			█		
Escrita do Artigo I				█				
Qualificação				█				
Escrita do Artigo de Divulgação Científica				█				
Análises citogenéticas	█							
Análises Morfométricas			█					
Escrita do Artigo II				█				
Análises Filogeográficas			█					
Escrita do Artigo III							█	

6. Orçamento

Tabela 3. Orçamento estimado para execução do projeto.

Elemento de despesa	Descrição dos equipamentos e recursos	Valor estimado
Diárias de campo	Combustível, acomodação, passagens aéreas, alimentação.	R\$ 19.200,00
Análises citogenéticas	Reagentes (corante carmim, álcool etílico, ácido acético glacial, ácido propiônico, 1% triton x100, 2-β-Mercaptoetanol, ribonuclease, Na ₂ SO ₃ , Tri-HCl, PVP-40)	R\$ 6.000,00
Extração e Amplificação de DNA	Reagentes (kit de extração DNeasy plant mini - QIAGEN, isopropanol, taq DNA polimerase, dNTPs, primers, entre outros)	R\$ 10.000,00
Sequenciamento de DNA	Reagentes (conditioner, BigDye, Pop 7, Catodo, Anodo, entre outros).	R\$ 25.000,00
Total		R\$ 60.000,00

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

7. Infraestrutura, Colaborações e Recursos Financeiros

Em relação à infraestrutura, o projeto conta com diversos laboratórios especializados no desenvolvimento das análises previstas no roteiro metodológico proposto. Estão inclusos o Laboratório de Evolução, Ecologia Química e Quimiotaxonomia, liderado pela orientadora do projeto, a Dra. Caroline Turchetto, no qual serão realizadas análises de filogeografia e de modelagem de nicho ecológico. O Laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Genética da UFRGS, liderado pela Dra. Eliane K. dos Santos, onde serão realizadas as análises de contagem cromossômica e de citometria de fluxo das amostras. O Laboratório de Enologia e Microbiologia Aplicada (LEMA) do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS), liderado pela Dra. Ana Paula L. Delamare, o qual possui todos os

equipamentos para extração, purificação, PCR e sequenciamento de material genético. Além disso, conta com o Herbário da Universidade de Caxias do Sul – HUICS, tendo como curador o Dr. Felipe Gonzatti, coorientador do projeto. No HUICS, será realizado o tomo do material botânico coletado, empréstimos de material, e equipamentos (microscópios, lupas e paquímetros) para a realização das análises morfométricas.

É importante mencionar que a aluna Fernanda possui acúmulo da bolsa de doutorado com atividade docente, dedicando-se 20 horas semanais como professora de ciências em escolas da educação básica em Caxias do Sul. Por isso, é importante estabelecer parcerias com laboratórios externos à UFRGS.

Em relação aos recursos financeiros, este projeto já conta com subsídio do Projeto PROTAX (processo número 21/2551-0000780-0) da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do projeto Universal (processo número 403738/2023-7) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Também já foi submetido ao edital Pesquisador Gaúcho (FAPERGS), IAPT Biodiversity Challenge, e LinnéSys - Systematics Research Fund.

8. Resultados esperados

Por meio da análise de modelagem de nicho, será possível reconstruir a distribuição passada das espécies, proporcionando um entendimento mais robusto dos fatores que contribuíram para a atual distribuição disjunta, especialmente entre as Florestas Atlântica e Amazônica. Esses dados serão relacionados com a filogenia do grupo. Além disso, pretende-se identificar a rota de conexão mais provável entre esses dois domínios para o grupo de estudo. A partir das análises filogeográficas será possível delimitar as espécies que compõem a espécie críptica *H. sturmii*, bem como elucidar os padrões de diversidade e estrutura genética, e história demográfica. Em conjunto com as análises filogeográficas, a modelagem de nicho ecológico permitirá conhecer a dinâmica evolutiva das diferentes linhagens de *H. sturmii*, assim como explorar o nicho atual das espécies e averiguar a influência das mudanças climáticas na distribuição potencial. A predição da distribuição futura poderá auxiliar em estratégias de conservação. Em relação às análises citogenéticas e morfométricas, o presente trabalho irá identificar caracteres diagnósticos para as espécies do subgênero *Mecodium* e esclarecer as variações fenotípicas encontradas na Floresta Atlântica. Essas características também irão ser relacionadas à filogenia do grupo.

O projeto resultará em dados para publicação de pelo menos três artigos científicos: o primeiro contendo a modelagem de nicho ecológico para as seis espécies do subgênero *Mecodium* presentes na Floresta Atlântica, o segundo relacionado à influência das características morfológicas e citogenéticas na evolução do gênero *Mecodium* na Floresta Atlântica, e o terceiro contendo a filogeografia e modelagem de nicho para a espécie críptica *H. sturmii*. No momento, estamos considerando como possíveis alvos as revistas *Molecular Ecology*, *Perspectives in Ecology Evolution and Systematics* e o *Botanical Journal of the Linnean Society*. Como produto do doutorado, será também publicada uma chave de identificação para as espécies do subgênero *Mecodium*, contemplando as delimitações taxonômicas realizadas após a execução deste projeto. É importante salientar que o desdobramento taxonômico apresenta impacto direto no status de conservação das espécies, sendo extremamente importante fornecer subsídios para correta identificação das espécies. Também será realizada a publicação de um artigo de divulgação científica na revista BioDiverso do Instituto de Biociências da UFRGS.

9. Referências

- Adams DC, Collyer M, Kaliontzopoulou A and Sherratt E (2018) Geomorph: Software for geometric 519 morphometric analyses. R package version 3.0.6.
- Adjie B, Masuyama S, Ishikawa H and Watano Y (2007) Independent origins of tetraploid cryptic species in the fern *Ceratopteris thalictroides*. *J Plant Res* 120:129-138.
- Andrade BO, William D, Alves AC, Teixeira AE, Janisch AD, Lia BR, Barros CCJ, Marie B *et al.* (2023) 12,500+ and counting: biodiversity of the Brazilian Pampa. *Frontiers of Biogeography*. *Front Biogeogr* 15(2):1-14.
- Bandelt HJ and Röhl PF (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48.
- Bauret L, Rouhan G, Hirai RY, Perrie L, Prado J, Salino A, Senterre B, Shepherd L, Sundue M *et al.* (2017) Molecular data, based on an exhaustive species sampling of the fern genus *Rumohra* (Dryopteridaceae), reveal a biogeographical history mostly shaped by dispersal and several cryptic species in the widely distributed *Rumohra adiantiformis*. *Bot J Linn Soc* 185(4):463-481.

BFG (2018) Brazilian Flora 2020: innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). *Rodriguésia* 69:1513-1527.

Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK and Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol* 22(3):148-155.

Brown H and Dolan C (2018) PaleoClim, high spatial resolution paleoclimate surfaces for global land areas. *Nature* 5:180254.

Carvalho CJBD and Almeida EAB (2016) *Biogeografia da América do Sul - Análise de Tempo, Espaço e Forma*. Roca, Rio de Janeiro, 324 pp.

Centro de Referência e Informação Ambiental (CRIA). 2011. Specieslink - simple search. Disponível em: <<https://specieslink.net/>>. Acesso em: 15 de abril de 2024.

Collevatti RG, Lima NE and Vitorino LC (2020). The diversification of extant angiosperms in the South America dry diagonal. *Neotropical diversification: Patterns and processes*. Springer Cham, 547-568.

Corander J, Waldmann P, Marttinen P and Sillanpää MJ (2004) BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* 20(15): 2363-2369.

Costa LP (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *J. Biogeogr.* 30(1):71-86.

Costa PC, Lorenz-Lemke AP, Furini PR, Coronado ENH, Kjellberg F and Pereira RA (2017). The phylogeography of two disjunct Neotropical *Ficus* (Moraceae) species reveals contrasted histories between the Amazon and the Atlantic Forests. *Bot. J. Linn.* 185(2):272-289.

Doležel J, Greilhuber J and Suda J (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat Protoc* 2:2233-2244.

Drummond AJ and Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7(1):1-8.

Dubuisson JY, Hennequin S, Rakotondrainibe F and Schneider H (2003) Ecological diversity and adaptive tendencies in the tropical fern *Trichomanes* L. (Hymenophyllaceae) with special reference to climbing and epiphytic habits. *Bot J Lin. Soc* 142:41-63.

Dupanloup I, Schneider S and Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol Ecol* 11(12):2571-2581.

Dyer RJ, Pellicer J, Savolainen V, Leitch IJ and Schneider H (2013) Genome size expansion and the relationship between nuclear DNA content and spore size in the *Asplenium monanthes* fern complex (Aspleniaceae). *BMC Plant Biol* 13:219.

Ebihara A, Dubuisson J-Y, Iwatsuki K, Hennequin S and Ito M (2006) A taxonomic revision of Hymenophyllaceae. *Blumea* 51:221-280.

Excoffier L and Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Biol Evol* 10:564–567.

Fiser C, Robinson CT and Malard F (2018) Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept. *Mol Eco* 27:613–635.

Forzza RC, Baumgratz JFA, Bicudo CEM, Canhos DAL, Carvalho Jr. AA, Coelho MAN, Costa AF, Costa DP *et al.* (2012) New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. *BioScience* 62:39–45.

Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.

Gasper AL, Grittz GS, Russi CH, Schwartz CE and Rodrigues AV (2021) Expected impacts of climate change on tree ferns distribution and diversity patterns in subtropical Atlantic Forest. *Perspect. Ecol. Conserv* 19:369-378.

GBIF: The Global Biodiversity Information Facility (2022) GBIF Home Page. Disponível em: <www.gbif.org>. Acesso em 15 de abril de 2024.

Gonzatti F, Vasques DT, Windisch PG, Ritter MR and Motomi I (2023) Systematics and Taxonomy of the *Hymenophyllum polyanthos* Complex in the Brazilian Atlantic Forest Domain. *Sys Bot* 48(1):55-77.

Gonzatti F and Windisch PG. Hymenophyllaceae. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 15 de abril de 2024.

Hanson JO (2022) wdpar: Interface to the world database on protected areas. *J. Open Source Softw.* 7:4594.

Hasenack H, Weber EJ, Boldrini I and Trevisan R (2010) Mapa de sistemas ecológicos da ecorregião das savanas uruguaias em escala 1: 500.000 ou superior e relatório técnico descrevendo insumos utilizados e metodologia de elaboração do mapa de sistemas ecológicos. Porto Alegre: UFRGS.

Heethoff M (2018) Cryptic species—conceptual or terminological chaos? A response to Struck *et al.* *Trends Ecol Evol* 33:310.

Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359(1442):183-195.

Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG and Jarvis A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol* 25(15):1965-1978.

Hijmans RJ, Phillips S, Leathwick J and Elith J (2022) Package ‘dismo’ Species Distribution Modeling. R Package Version 1:3-8.

IPCC, 2023: Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, pp. 1-34.

Katoh K and Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30(4):772-780.

Klingenberg CP (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour* 11(2):353-357.

Kuplich TM, Capone V and Costa LFF (2016) Avanço da soja no bioma Pampa em Aceguá, RS. In: I Congresso Internacional do Pampa/III Seminário da Sustentabilidade da Região da Campanha, Santa Maria. Anais. Santa Maria: UFSM. 31:83-100.

Lanfranco B, Fernández E, Ferraro B and Lima JMS (2022) Historical changes in the Pampas biome, land use, and climate change. In: Seo, S.N, Ling, L., Thailand, C.M. (Eds.), Handbook of Behavioral Economics and Climate Change (pp. 162–191). Edward Elgar Publishing Ltd., United Kingdom.

Ledo RMD and Colli GR (2017) The historical connections between the Amazon and the Atlantic Forest revisited. *J. Biogeogr.* 44 (11):2551-2563.

Luebert Federico (2021) The two South American dry diagonals. *Front. Biogeogr.* 13(4):1-14.

Machado AF, Ritter CD, Miranda CL, Bredin YK, Pereira MJRP and Duarte L (2021). Potential mammalian species for investigating the past connections between Amazonia and the Atlantic Forest. *PloS one* 16(4):e0250016.

Maciel JR, Sanchez-Tapia A, Siqueira MFD and Alves M (2017). Palaeodistribution of epiphytic bromeliads points to past connections between the Atlantic and Amazon forests. *Bot. J. Linn.* 183(3):348-359.

Manton I (1950) Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta. University Press, New York, 338 pp.

Masa-Iranzo I, Sanmartín I, Caruzo MBR and Riina R (2021) Skipping the Dry Diagonal: spatio-temporal evolution of *Croton* section *Cleodora* (Euphorbiaceae) in the Neotropics. *Bot. J. Linn.*, 197(1):61-84.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GA and Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.

Naimi B (2017) Package ‘usdm’. Uncertainty analysis for species distribution models. Wien: www.cran.r-project. Org.

Ottewell KM, Bickerton DC, Byrne M and Lowe AJ (2016) Bridging the gap: A genetic assessment framework for population-level threatened plant conservation prioritization and decision-making. *Divers Distrib* 22(2):174-188.

Pahad G, Montgelard C and van Vuuren BJ (2019) Phylogeography and niche modelling: Reciprocal enlightenment. *Mammalia* 84(1):10-25.

Paris CA, Wagner FS and Wagner, Jr. WH (1989). Cryptic species, species delimitation, and taxonomic practice in the homosporous ferns. *Am Fern J* 79(2):46-54.

Parra MJ, Acuña K, Corcuera LJ and Saldaña A (2009) Vertical distribution of Hymenophyllaceae species among host tree microhabitats in a temperate rain forest in Southern Chile. *J Veg Sci* 20:588-595.

Pelosi JA and Sessa EB (2021) From genome to populations: a meta-analysis and review of fern population genetics. *Int. J. Plant Sci.* 182(5):325–343.

Phillips SJ, Anderson RP and Schapire RE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol Modell* 190:231-259.

Pinto MP, Beltrão-Mendes R, Talebi M and Lima AA (2023) Primates facing climate crisis in a tropical forest hotspot will lose climatic suitable geographical range. *Sci. Rep.* 13(1):641.

Prado J and Hirai RY (2014) Biogeography of the Brazilian Atlantic forest: evidence from phylogenetic data sets and perspectives for fern and lycophytes studies. *Fern Gaz* 19:241-257

Proctor MCF (2012) Light and desiccation responses of some Hymenophyllaceae (filmy ferns) from Trinidad, Venezuela and New Zealand: poikilohydry in a light-limited but low evaporation ecological niche. *Ann Bot* 109:1019-1026.

Pteridophyte Phylogeny Group I (2016) A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. *J Syst Evol* 54:563-603.

Rasband WS (2004) ImageJ. Bethesda MD, USA: National Institutes of Health. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 17 abril 2024

Rezende CL, Scarano FR, Assad ED, Joly CA, Metzger JP, Strassburg BBN, Tabarelli M, Fonseca GA and Mittermeier RA (2018) From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. *Perspec. Ecol Conser.* 16(4):208-214.

Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ and Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol Conserv* 142:1141-1153.

Rohlf FJ (2015). The TPS series of software. *Hystrix* 26:9-12.

Rohlf FJ AND Slice D (1990). Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Syst Zool* 39:40–59.

Schuler SB, Hamza H, Blanca G, Romero-García AT and Suarez-Santiago VN (2022) Phylogeographical Analyses of a Relict Fern of Palaeotropical Flora (*Vandenboschia speciosa*): Distribution and Diversity Model in Relation to the Geological and Climate Events of the Late Miocene and Early Pliocene. *Plants* 11:839.

Sessa EB and Der JP (2016) Evolutionary genomics of ferns and lycophytes. *Adv Bot Res* 78:215-254

Smith AR, Pryer KM, Schuettpelz E, Korall P, Schneider H and Wolf PG (2006) A classification for extant ferns. *Taxon* 55:705-731.

Tajima F (1989). Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595

Thode VA, Sanmartín I and Lohmann LG (2019) Contrasting patterns of diversification between Amazonian and Atlantic forest clades of Neotropical lianas (Amphilophium, Bignoniaceae) inferred from plastid genomic data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 133:92-106.

Tryon R (1972) Endemic areas and geographic speciation in tropical American ferns. *Biotropica* 4:121-131.

Vasques DT, Ebihara A, Hirai RY, Prado J and Motomi I (2019) Phylogeny of *Hymenophyllum* subg. *Mecodium* (Hymenophyllaceae), with special focus on the diversity of the *Hymenophyllum polyanthos* species complex. *Plant Syst Evol* 305:811-825.

Wang L, Wu Z-Q, Bystriakova N, Ansell SW, Xiang Q-P, Heinrichs J, Schneider H and Zhang X-C (2011) Phylogeography of the Sino-Himalayan fern *Lepisorus clathratus* on “the roof of the world”. PloS one 6(9):e25896.

Wei Z, Xia Z, Shu J, Shang H, Maxwell SJ, Chen L, Zhou X, Xi W *et al.* (2022) Phylogeny and taxonomy on cryptic species of forked ferns of Asia. Front Plant Sci 12:1-12.

Wiens JJ and Donoghue MJ (2004) Historical biogeography, ecology and species richness. Trends Ecol. Evol. 19(12):639-644.

Yatabe Y, Shinohara W, Matsumoto S and Murakami N (2009) Patterns of hybrid formation among cryptic species of bird-nest fern, *Asplenium nidus* complex (Aspleniaceae), in West Malesia. Bot J Linn Soc 160(1): 42-63.

Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets GD and Fink W (2012) Geometric morphometrics for biologists: a primer. academic press, 2012.

Zizka A, Silvestro D, Andermann T, Azevedo J, Ritter CD, Edler HF, Herdean A, Ariza M *et al.* (2019) CoordinateCleaner: Standardized cleaning of occurrence records from biological collection databases. Methods Ecol Evol 10(5):744-751.