



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Influência de características citogenéticas na diversificação e evolução em *Hymenophyllum*
Sm. subg. *Sphaerocionium* (C. Presl) C. Chr. (Hymenophyllaceae, Polypodiopsida), na
Mata Atlântica

Fernanda Pessi de Abreu

Porto Alegre

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Influência de características citogenéticas na diversificação e evolução em *Hymenophyllum*
Sm. subg. *Sphaerocionium* (C. Presl) C. Chr. (Hymenophyllaceae, Polypodiopsida), na
Mata Atlântica.

Fernanda Pessi de Abreu

Projeto de mestrado 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 Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dr^a Eliane Kaltchuk Dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr^o Felipe Gonzatti

Porto Alegre

2022

Resumo: Hymenophyllaceae, ou “filmy ferns”, é uma família de samambaias com mais de 450 espécies de distribuição pantropical. As espécies geralmente são encontradas em ambientes úmidos e com baixa luminosidade e apresentam alta sensibilidade a mudanças ecológicas. *Hymenophyllum* é o gênero com maior riqueza de táxons da família, composto por cerca de 250 espécies circunscritas em 10 subgêneros. Entre os subgêneros de *Hymenophyllum*, *Sphaerocionium* apresenta maior diversidade florística na região neotropical. Na Mata Atlântica, um centro de riqueza e endemismo de samambaias, ocorrem 14 espécies do subgênero, entre essas, quatro espécies são endêmicas e sete constam nas listas de espécies ameaçadas de extinção. As espécies de *Sphaerocionium* são epífitas ou rupestres e possuem como sinapomorfia a presença de tricomas estrelados nas margens, nervuras ou superfície laminar. A monofilia do subgênero foi confirmada por análises moleculares. Porém, as relações entre as espécies não são suficientemente explicadas através de características morfológicas. Nesse sentido, dados citogenéticos tornam-se subsídios para o entendimento da diversificação e evolução do grupo. Em *Sphaerocionium* é conhecido o número cromossômico de dez espécies (número esporofítico conhecido é $2n=72$); todavia, nenhum estudo contemplou populações brasileiras. Outro dado citogenético relevante é o tamanho do genoma, mas essa informação não é conhecida para as espécies do subgênero. A inclusão de dados citogenéticos na filogenia do grupo pode contribuir para o entendimento da história evolutiva. Portanto, este projeto possui como finalidade combinar dados citogenéticos e filogenéticos para realizar inferências sobre a diversificação e evolução das espécies de *Hymenophyllum*, com ênfase no subgênero *Sphaerocionium*, presentes no domínio Mata Atlântica. Para isso serão amostradas 12 espécies ocorrentes nas formações da Mata Atlântica nos três estados do Sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná). O tamanho do genoma será mensurado por meio de citometria de fluxo e a contagem do número cromossômico ocorrerá através de análise meiótica. Esses dados serão relacionados com a filogenia do subgênero. Também será investigada a influência das variações citogenéticas em características morfológicas. Uma análise integrativa utilizando dados citogenéticos são fontes excelentes e insubstituíveis em estudos taxonômicos e evolutivos. Além das análises citogenéticas, esse estudo também pretende realizar uma análise de modelagem de nicho ecológico para conhecer o nicho atual das espécies e averiguar a influência dos fatores climáticos na distribuição potencial dos táxons, visto a alta sensibilidade das Hymenophyllaceae às mudanças ambientais. Por fim, o estudo propiciará subsídios para que sejam traçados esforços de conservação e preservação da biodiversidade de samambaias.

Palavras-chave: Mata Atlântica; nicho ecológico; número cromossômico; tamanho de genoma; samambaia.

Abstract: Hymenophyllaceae, popularly known as filmy ferns, is a family of over 450 species of ferns with a pantropical distribution. They are commonly found in humid low light environments and display a high sensitivity to ecological change. *Hymenophyllum*, the genus with the highest species richness within the family, is composed of approximately 250 species situated in 10 subgenera. Out of these *Hymenophyllum* subgenera, *Sphaerocionium* has the highest floral diversity in the neotropical region. The Atlantic Forest (Mata Atlântica) biome, a hotspot for fern diversity and endemism, is home to 14 species of *Sphaerocionium*, of which four are endemic and seven are included in endangered listings. *Sphaerocionium* species are either epiphytic or rupestrian and share as a synapomorphy the presence of stellate trichomes on the margin, veins or laminar surface. The monophyletic nature of the subgenus has been confirmed by molecular analyses. However, the phylogenetic relationships between the taxa are not sufficiently explained through the use of morphological characteristics. In this sense, cytogenetics data can provide insights towards understanding the diversification and evolution of the group. A chromosome number has already been determined for ten *Sphaerocionium* species ($2n=72$ for sporophyte); albeit no study covers Brazilian populations. Another relevant cytogenetic analysis is the estimation of genome size, but this information is currently unknown for all species of the subgenus. The incorporation of cytogenetic data in the phylogeny may further unravel the evolutionary history of the group. Therefore, this project aims to combine cytogenetic and phylogenetic data in order to contribute novel inferences with respect to the evolution and diversity of *Hymenophyllum* species from the Atlantic Forest, giving emphasis to the *Sphaerocionium* subgenus. For this, 12 species that occur in Atlantic Forest formations at the three southern states of Brazil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná) will be sampled. Genome size will be measured by flow cytometry and chromosome number count through meiotic analyses. The cytogenetic data will be integrated with the subgenus phylogeny, also investigating possible associations to morphological characteristics. Integrative analyses making use of cytogenetic data are essential in taxonomic and evolutionary studies. This study will also carry out an ecological niche modeling analysis for the species in order to verify the influence of climatic factors in the potential taxa distribution, given the high sensitivity of Hymenophyllaceae to environmental change. Overall, the study will offer a foundation on which conservational efforts can be based to preserve the biodiversity of ferns.

Key-words: Atlantic Forest; ecological niche; chromosome number; genome size; ferns.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
3.1. OBJETIVO GERAL	12
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1. AMOSTRAGEM DOS TÁXONS	13
4.2. CONTAGEM DO NÚMERO CROMOSSÔMICO	15
4.3. ESTIMATIVA DO TAMANHO DE GENOMA	15
4.4. EVOLUÇÃO DO NÚMERO CROMOSSÔMICO E DO TAMANHO DE GENOMA	16
4.5. AQUISIÇÃO DE DADOS MORFOLÓGICOS	17
4.6. COMPILAÇÃO DE DADOS DE REPOSITÓRIOS E DA LITERATURA	17
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
4.8. MODELAGEM DE NICHOS ECOLÓGICO	18
5. CRONOGRAMA	18
6. ORÇAMENTO	19
7. INFRAESTRUTURA	20
8. RESULTADOS ESPERADOS	20
9. REFERÊNCIAS	20

1. INTRODUÇÃO

Samambaias e licófitas evoluíram e se diversificaram em cerca de 12 mil espécies existentes em todo o mundo (PPG I, 2016, Mehlreter *et al.*, 2010). Ambos os grupos comumente são referidos artificialmente como pteridófitas e são conhecidos por apresentarem esporos livres, serem vasculares e possuírem ciclo reprodutivo marcado pela alternância de gerações. No Brasil, são reconhecidas mais de 1400 espécies de samambaias e licófitas distribuídas em 39 famílias (Flora do Brasil, 2022). Além disso, o domínio da Mata Atlântica é um dos centros de diversidade e endemismos do grupo na região neotropical (Tryon, 1972). As samambaias, ou monilófitas, integram diferentes ecossistemas e possuem uma ampla diversidade ecológica e morfológica (Judd *et al.*, 2009; Mehlreter *et al.*, 2010).

Hymenophyllaceae Mart. é a única família da ordem Hymenophyllales A.B.Frank e compreende cerca de 430 espécies de samambaias distribuídas em duas subfamílias: Trichomanoideae C.Presl, e Hymenophylloideae Burnett (PPG I, 2016). Os integrantes desta família apresentam esporângios agrupados em soros marginais protegidos por um involúcro, na subfamília Trichomanoideae as espécies possuem involúcros tubulares (em formato de sino), enquanto que os integrantes da subfamília Hymenophylloideae possuem involúcros bivalvos (Ebihara *et al.*, 2006; PPG I, 2016). As espécies da família Hymenophyllaceae são conhecidas comumente como *filmy ferns*, visto que apresentam aspecto translúcido devido ao tecido laminar ser constituído por somente uma camada de células (Iwatsuki, 1990). Além desses, outros aspectos também são importantes para caracterização do grupo, como esporângios com anel oblíquo em relação ao receptáculo, esporos clorofilados e triletos, rizomas finos e longo-reptantes (por vezes ereto e robusto), ausência de estômatos e cutícula (ou possuem cutícula muito reduzida) (Smith *et al.*, 2006).

As espécies da família Hymenophyllaceae possuem distribuição pantropical (Dubuisson *et al.*, 2003a), sendo que a maior abundância e diversidade de espécies são encontradas em florestas tropicais montanhosas (Proctor, 2012). Em geral, essas samambaias são encontradas em ambientes com baixa intensidade luminosa e alta umidade relativa (Parra *et al.*, 2009; Proctor, 2012), como florestas nebulares, áreas de respingo ao redor de cachoeiras, ou em rochas ao longo de corpos hídricos (Ebihara *et al.*, 2007). A não ocorrência das espécies desse grupo em ecossistemas secos, ou de baixa disponibilidade hídrica, e alta sensibilidade a mudanças ecológicas está intimamente relacionado com a

ausência de mecanismos para evitar a perda de água (Gessner, 1939; Zotz & Büche, 2000; Dubuisson *et al.*, 2003a).

Ao longo do tempo existiu uma série de tentativas para classificação infrafamiliar de Hymenophyllaceae, tanto utilizando a taxonomia tradicional (*e.g.* Bosch, 1858; Morton, 1968; Sermolli, 1977; Iwatsuki, 1990;), quanto por meio de técnicas moleculares (*e.g.* Dubuisson, 1997; Pryer *et al.*, 2001; Dubuisson *et al.*, 2003b; Hennequin *et al.*, 2003; Ebihara *et al.*, 2004; Ebihara *et al.*, 2006; Hennequin *et al.*, 2006). Atualmente, são reconhecidos nove gêneros monofiléticos para a família, sendo: *Abrodictyum* C. Presl, *Callistopteris* Copel., *Cephalomanes* C. Presl, *Crepidomanes* (C. Presl) C. Presl, *Didymoglossum* Desv., *Hymenophyllum*, *Vandenboschia* Copel., *Polyphlebium* Copel. e *Trichomanes* L. (Ebihara *et al.*, 2006). *Hymenophyllum* é o gênero com maior riqueza da família, sendo composto por cerca de 250 espécies classificadas em 10 subgêneros (Tabela 1) e distribuídas ao longo dos trópicos, bem como regiões temperadas (Ebihara *et al.*, 2006).

Tabela 1. Subgêneros de *Hymenophyllum* com distribuição geográfica e número de espécies.

Subgênero	Distribuição Geográfica	Nº espécies
<i>Cardiomanes</i> (C. Presl) Ebihara & K. Iwats.	Nova Zelândia	monotípico
<i>Diploöphyllum</i> (Bosch) Ebihara & K. Iwats.	Nova Zelândia	monotípico
<i>Fuciformia</i> Ebihara & K. Iwats.	Chile e Nova Zelândia	2
<i>Globosa</i> (Prantl) Ebihara & K. Iwats	Ásia e Pacífico (somente duas espécies na América)	ca. 25
<i>Hymenoglossum</i> (C. Presl) R.M. Tryon & A.F. Tryon	América e Madagascar	3
<i>Hymenophyllum</i>	cosmopolita	ca. 100
<i>Mecodium</i> C. Presl ex Copel.	cosmopolita	> 35
<i>Myrmecostylum</i> (C. Presl) Ebihara & K. Iwats.	América, Nova Zelândia e Nova Caledônia	ca. 8
<i>Pleuromanens</i> (C. Presl) Ebihara & K. Iwats.	Paleotrópicos, especialmente em regiões do pacífico	5
<i>Sphaerocionium</i> (C. Presl) C. Chr.	cosmopolita	ca. 70

Fonte: Adaptado de Ebihara *et al.*, 2006.

Entre os subgêneros de *Hymenophyllum*, *Sphaerocionium* (C. Presl) C. Chr. apresenta distribuição geográfica cosmopolita e elevada diversidade na região neotropical,

quando comparado com outras linhagens do grupo (Ebihara *et al.*, 2006). Inferências biogeográficas baseadas em dados filogenéticos sugerem que o subgênero *Sphaerocionium* provavelmente teve origem na Nova Zelândia. O tempo estimado para a divergência do grupo é de 37,2 milhões de anos, enquanto que a idade média estimada para a origem do gênero *Hymenophyllum* é de 49,8 milhões de anos (Del Rio *et al.*, 2017). As espécies possuem hábito epifítico e apresentam sinapomorfia marcada pela presença de tricomas estrelados nas margens, nas nervuras ou na superfície laminar. Todavia, as espécies também podem possuir nas frondes e nos rizomas desde tricomas simples e unicelulares até ramificados e multicelulares (Morton 1947; Ebihara *et al.*, 2006; Gonzatti *et al.*, 2020). Assim, a disposição, a densidade e a variação morfológica dos tricomas foram critérios utilizados em diferentes classificações infra subgenérica de *Sphaerocionium* (e.g. Morton 1947; Morton, 1968). Contudo, análises filogenéticas das espécies ocorrentes na Floresta Atlântica, utilizando os marcadores *rps4-trnS* e *trnG-R*, ratificaram a monofilia do subgênero, apesar dos agrupamentos não serem suficientemente explicados pelo padrão de tricomas ou outras características morfológicas (Gonzatti *et al.*, 2020).

No domínio Mata Atlântica ocorrem 14 espécies do subgênero *Sphaerocionium* (Tabela 2). Esse domínio é um dos 25 *hotspots* de biodiversidade do mundo (Myers *et al.*, 2000), sendo um centro de riqueza e endemismo de samambaias (Tryon, 1972). Contudo, a fragmentação deste bioma aliado às mudanças climáticas torna-se fonte de ameaça às espécies (Gasper *et al.*, 2021; IPCC, 2014; Ribeiro *et al.*, 2009). Além disso, a diversidade de samambaias está fortemente relacionada com a disponibilidade de água, e modificações ambientais podem afetar a distribuição dos táxons (Gasper *et al.*, 2021; Kessler *et al.*, 2011). Como mencionado anteriormente, as Hymenophyllaceae não possuem mecanismos para evitar a perda de água, tornando-as altamente sensíveis às alterações no clima.

Tabela 2. Informações sobre endemismo, status de conservação e distribuição das espécies do subgênero *Sphaerocionium* (C. Presl) C. Chr. ao longo do domínio Mata Atlântica.

Espécies	Endemismo	Estados brasileiros de ocorrência	Status de conservação*
<i>H. crispum</i> Kunth	não endêmica	MG, RJ, SP, PR, SC e RS	VU
<i>H. delicatulum</i> Sehnem	endêmica	SC e RS	EN
<i>H. elegans</i> Spreng.	não endêmica	BA, MG, ES, RJ, SP, PR e SC	LC

<i>H. fragile</i> (Hedw.) C.V. Morton	não endêmica	MG, ES, RJ, SP, PR, SC e RS	LC
<i>H. glaziovii</i> Baker	endêmica	RJ e SP	DD
<i>H. hirsutum</i> (L.) Sw.	não endêmica	CE, PE, AL, BA, MG, ES, RJ, SP, PR, SC e RS	LC
<i>H. microcarpum</i> Desv.	não endêmica	MG, ES, RJ, SP, PR e SC	NT
<i>H. plumosum</i> Kaulf.	não endêmica	MG, ES, RJ, SP e PR	VU
<i>H. pulchellum</i> Schlttdl. & Cham.	não endêmica	MG, ES, RJ, SP, PR, SC e RS	LC
<i>H. rufum</i> Fée	endêmica	BA, MG, ES, RJ, SP, PR, SC e RS	VU
<i>H. trapezoidale</i> Liebm.	não endêmica	MG	extinta localmente
<i>H. trichophyllum</i> Kunth	não endêmica	MG e SC	EN
<i>H. venustum</i> Desv.	endêmica	BA, MG, ES, RJ, SP, PR, SC e RS	VU
<i>H. vestitum</i> (C. Presl) Bosh	endêmica	BA, ES, RJ, SP, PR, SC e RS	VU

*Status de conservação de acordo com critérios da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN). Siglas: em perigo, EN; vulnerável, VU; quase ameaçada, NT; menos preocupante, LC; dados insuficientes, DD. Fonte: Adaptado de Gonzatti *et al.* (2020)

Entre as espécies do subgênero presentes na Floresta Atlântica, quatro espécies são endêmicas e sete espécies são enquadradas em categorias de ameaça de extinção (criticamente em perigo, em perigo e vulnerável), de acordo com os critérios da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (Gonzatti *et al.*, 2020). A espécie *Hymenophyllum delicatulum* Sehnem também consta na lista dos táxons da flora nativa do Rio Grande do Sul ameaçados de extinção instituída pelo decreto 52.109, de 1º de dezembro de 2014 (Rio Grande do Sul, 2014). Outras quatro espécies do subgênero em questão não estão inseridas no domínio Mata Atlântica, mas possuem ocorrência para o Brasil, sendo *H. angustum* Bosch, *H. karstenianum* J. W. Sturm, *H. lindenii* Hook. e *H. prionema* Kunze ex J.W. Sturm (Gonzatti & Windisch, 2022).

Os estudos citogenéticos de Hymenophyllaceae, começaram após a década de 1950 com a publicação do trabalho de Monton (1950) intitulado “*Problems of Evolution in the Pteridophyta*”. Esta obra foi o marco inicial para investigação dos cromossomos em estudos com samambaias (Britton, 1974). Em Hymenophyllaceae, informações citológicas

fornece um critério adicional para avaliar táxons e proporcionam evidências importantes para elucidação das relações entre as espécies (Brathwaite, 1975).

A reconstrução do número cromossômico ancestral utilizando abordagens filogenéticas propõem para Hymenophyllaceae $n = 36$ e supõe-se que esse número surgiu por poliploidia de 9 (Hennequin *et al.*, 2010). No gênero *Hymenophyllum*, o número cromossômico $n = 36$ também é reconstruído como ancestral e conservado em diferentes linhas evolutivas, como nos subgêneros *Pleuromanes*, *Myrmecostylum*, *Hymenoglossum*, *Cardiomanes*, *Fuciformia*, *Diploophyllum*, *Globosa* e *Sphaerocionium*. Contudo, números cromossômicos mais baixos são encontrados nos subgêneros *Mecodium* e *Hymenophyllum*, sendo provavelmente resultantes de eventos reducionais (Hennequin *et al.*, 2006; Hennequin *et al.*, 2010). No subgênero *Sphaerocionium* é conhecido o número cromossômico para cerca de dez espécies, sendo $2n = 72$ o número esporofítico (Brownlie, 1958; Brownlie, 1965; Walker, 1966; Monton & Vida, 1968; Braithwaite, 1975). Foram analisados nos estudos citogenéticos, espécimes amostradas da Jamaica, Nova Zelândia, Fiji, Tristan da Cunha e Austrália, não sendo contempladas populações brasileiras.

Além do número cromossômico, outra característica citogenética importante de ser investigada é o tamanho do genoma. Em samambaias, estudos sugerem que o tamanho do genoma pode estar relacionado com diferentes fatores. Henry e colaboradores (2014) exploraram a relação entre o tamanho do genoma e onze características morfológicas e ecológicas, como comprimento dos estômatos, comprimentos dos esporos, comprimento e largura da lâmina foliar, tipo de habitat e preferência por luz (Henry *et al.*, 2014). Outros trabalhos também correlacionaram o tamanho do genoma com número de cromossomos (Clark *et al.*, 2016), tamanho de esporos (Dyer *et al.*, 2013) e habitat (Wang *et al.*, 2022). Contudo, apesar da relevância para o estabelecimento de novos *insights*, no gênero *Hymenophyllum* são conhecidos os tamanhos do genoma somente para os subgêneros *Globosa*, *Hymenophyllum* e *Mecodium*, num total de apenas cinco espécies: *Hymenophyllum badium* Hook. & Grev. (1C = 16,51 pg), *H. sibthorpioides* Bory ex Willd. (1C = 18,05 pg), *H. barbatum* Bosch (1C = 22,84 pg), *H. polyanthos* Sw. (1C = 16,16 pg), e *H. coreanum* Nakai (1C = 14,85 pg) (Clark *et al.*, 2016; Kim & Kim, 2020; Fujiwara *et al.*, 2021). Em média, as samambaias possuem um tamanho de genoma de 1C = 14,29 pg (Clark *et al.*, 2016). Portanto, apesar dos avanços em metodologias, em geral, as

samambaias ainda carecem de informações acerca do tamanho do genoma (Lima *et al.*, 2021).

Atualmente, diversos estudos têm buscado dados de número cromossômico e de tamanho de genoma para a compreensão de aspectos evolutivos e biogeográficos em plantas das mais diversas famílias vegetais, uma vez que quando utilizados conjuntamente outras informações, como morfológicas e moleculares, possibilitam uma análise integrativa das espécies (Guerra 2008; Pellicer *et al.*, 2018). Os dados citológicos são fontes excelentes e insubstituíveis para estudos taxonômicos e evolutivos (Guerra, 2012).

Dentre os diversos fatores que influenciam na manutenção das populações de uma espécie, cada vez mais tem sido reportado os impactos causados pelas alterações climáticas. À medida que a taxa e a magnitude das mudanças climáticas aceleram, a compreensão das suas consequências para as espécies torna-se cada vez mais importante (Wiens *et al.*, 2009). Nesse sentido, a modelagem de nicho ecológico pode ser utilizada para identificar áreas de endemismo e avaliar efeitos das mudanças climáticas através da inferência da distribuição atual e futura das espécies, ambas aplicações que auxiliam em estratégias para conservação (Peterson & Vieglais, 2001; Silva, 2013). Estudos integrativos, combinando dados de diversidade genética, citogenéticos e de modelagem de nicho ecológico são valiosos para o entendimento da dinâmica evolutiva dos táxons, além de contribuírem na conservação de espécies ameaçadas de extinção (Sohnet *et al.*, 2013). Assim, a realização de estudos de modelagem de nicho para *Hymenophyllum* subg. *Sphaerocionium* é de grande relevância, visto que o grupo apresenta elevada diversidade e endemismo na Mata Atlântica, que está entre os habitats mais ameaçados por mudanças climáticas, causando perda de biodiversidade (Scarano & Ceotto, 2015; Boit *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Hymenophyllum subg. *Sphaerocionium* apresenta elevada diversidade florística no neotrópico. Na Mata Atlântica, esse subgênero possui espécies endêmicas e táxons em estado de ameaça de extinção. É importante ressaltar que esse bioma sofreu considerável redução de área e modificações ecológicas colocando em risco a conservação da biodiversidade. Aliado a isso, as espécies da família Hymenophyllaceae possuem alta sensibilidade às mudanças ambientais, devido às suas características morfológicas e ecológicas. Assim, as alterações no micro ou macrohabitat podem significar um risco para conservação dessas espécies. É fundamental a compreensão da diversificação e história

evolutiva dos grupos taxonômicos para que sejam traçados esforços de conservação e preservação da biodiversidade. Apesar disso, as relações de parentesco entre as espécies de *Sphaerocionium* inferidas através do uso de marcadores moleculares não foram suficientemente explicadas por meio de características morfológicas. Nesse contexto, incluir na filogenia do grupo informações citogenéticas, como tamanho de genoma e número cromossômico, proporciona uma contribuição essencial para o entendimento da diversificação e evolução do subgênero. Até o momento, nenhum estudo citogenético foi realizado com populações do gênero *Hymenophyllum* ocorrentes na Mata Atlântica. Em complemento, a modelagem de nicho ecológico das espécies do subgênero pode contribuir para o entendimento da influência das mudanças climáticas na distribuição e diversidade desse grupo de samambaias. Essa abordagem também contribui para a compreensão do nicho ecológico ocupado atualmente pelas espécies ao longo das formações fitogeográficas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho possui como objetivo combinar dados citogenéticos e filogenéticos para realizar inferências sobre a diversificação e evolução das espécies de *Hymenophyllum* (Hymenophyllaceae), com ênfase no subgênero *Sphaerocionium*, presentes no domínio Mata Atlântica no Sul do Brasil.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar os números cromossômicos de espécies de *Hymenophyllum* subg. *Sphaerocionium* incluindo diferentes populações do domínio Mata Atlântica;
- b) Estimar o tamanho do genoma das espécies de *Hymenophyllum* subg. *Sphaerocionium* a partir de citometria de fluxo;
- c) Relacionar o número cromossômico e o tamanho de genoma com dados filogenéticos, a fim de inferir a história evolutiva do subgênero *Sphaerocionium*;
- d) Investigar a influência do tamanho do genoma e do número cromossômico em características morfológicas das espécies de *Hymenophyllum* subg. *Sphaerocionium*, para verificar a relação entre essas variáveis;

- e) Realizar a modelagem de nicho ecológico das espécies de *Hymenophyllum* subg. *Sphaerocionium* para conhecer o nicho atual das espécies;
- f) A partir dos dados de modelagem futura, inferir os impactos das mudanças climáticas na distribuição potencial dos táxons e sua vulnerabilidade;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAGEM DOS TÁXONS

Serão amostradas 12 espécies de *Hymenophyllum* subg. *Sphaerocionium* (Tabela 3) ocorrentes nas formações da Mata Atlântica nos três estados da região Sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná). 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 (2020). Nessa revisão, foram realizadas expedições de campo entre 2016 e 2018 nas formações da Mata Atlântica e materiais de herbário também foram revisados, a fim de delimitar a distribuição geográfica das espécies.

Tabela 3. Populações que serão amostradas para cada espécie.

Espécies	Pontos de coleta com coordenadas geográficas	Nº populações
<i>H. crispum</i>	Cambará do Sul - RS (-50.051833, -28.996556)	7
	Caxias do Sul - RS (-51.010639, -29.016456)	
	São José dos Ausentes - RS (-49.808028, -28.614194)	
	São Joaquim - SC (-49.635397, -28.142194)	
	Urupema - SC (-49.856389, -27.922222)	
	Campina Grande do Sul - PR (-48.863722, -25.262611)	
<i>H. delicatum</i>	Caxias do Sul - RS (-50.971322, -28.882622)	4
	Cambará do Sul - RS (-50.051833, -28.996556)	
	São José dos Ausentes - RS (-49.975217, -28.598203)	
	São Francisco de Paula - RS (-50.58359, -29.448099)	
<i>H. fragile</i>	Cambará do Sul - RS (-50.078792, -29.158775)	8
	Morrinhos do Sul - RS (-50.005556, -29.395)	
	Urubici - SC (-49.386528, -28.057917)	
	Rio do Sul - SC (-49.509411, -27.282064)	
	São Bonifácio - SC (-48.897389, -27.805167)	
	Campina Grande do Sul - PR (-48.863722, -25.262611)	
	Morretes - PR (-48.929722, -25.455833)	
Ponta Grossa - PR (-50.16189, -25.09499)		
<i>H. elegans</i>	Urubici - SC (-49.59170, -28.01499)	4
	Rio do Sul - SC (-49.509411, -27.282064)	
	Ponta Grossa - PR (-49.957639, -25.189167)	
	Campina Grande do Sul - PR (-48.863722, -25.262611)	

<i>H. hirsutum</i>	Rio do Sul - SC (-49.509411, -27.282064) Ponta Grossa - PR (-49.957639, -25.189181)	2
<i>H. microcarpum</i>	Anitápolis - SC (-49.179111, -27.967944) São Bonifácio - SC (-48.897389, -27.821833) Rio do Sul - SC (-49.509411, -27.282064) Pico Camapuã - PR (-48.863722, -25.262611)	4
<i>H. plumosum</i>	Ponta Grossa - PR (-49.95, -25.15) Piraí do Sul - PR (-50.0580556, -24.4361111) Balsa Nova - PR (-49.635601, -25.58390)	3
<i>H. pulchellum</i>	Cambará do Sul - RS (-50.14469, -29.04780) São Francisco de Paula - RS (-50.5835990, -29.448099) São José dos Ausentes - RS (-49.988528, -28.804806) São Joaquim - SC (-49.93170, -28.293899) Garuva - SC (-48.85499, -26.026699) Urubici - SC (-49.5917, -28.01499) Campina Grande do Sul - PR (-48.863722, -25.262611) Ponta Grossa - PR (-49.957639, -25.189167)	8
<i>H. rufum</i>	Cambará do Sul - RS (-50.049722, -29.012583) São José dos Ausentes - RS (-49.813361, -28.626917) São Joaquim - SC (-49.635278, -28.141944) Urupema - SC (-49.856944, -27.922222) Urubici - SC (-49.386528, -28.057917) Santa Rosa de Lima - SC (-49.313972, -28.41875)	6
<i>H. trichophyllum</i>	Bom Jesus - RS (-50.326944, -28.715278) Rio do Sul - SC (-49.509411, -27.282064)	2
<i>H. venustum</i>	Morrinhos do Sul - RS (-50.005556, -29.395) São Francisco de Paula - RS (-50.071111, -29.370278) São Bonifácio - SC (-48.897389, -27.821667) Garuva - SC (-48.976778, -26.024583) Campina Grande do Sul - PR (-48.847722, -25.230083)	5
<i>H. vestitum</i>	São Francisco de Paula - RS (-50.5835, -29.448099) Cambará do Sul - RS (-50.042333, -29.180028) São Bonifácio - SC (-48.897389, -27.821833) Garuva - SC (-48.976778, -26.024583) Piraquara - PR (-49.06330, -25.44169) Campina Grande do Sul - PR (-49.05530, -25.305599) São José dos Pinhais - PR (-49.20640, -25.534700)	7

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Entre as espécies do subgênero *Sphaerocionium* ocorrentes na área de estudo somente *H. glaziovii* e *H. trapezoidale* não serão incluídas na amostragem, visto que a primeira é pouco delimitada e duvidosa taxonomicamente e a segunda está localmente extinta (Gonzatti *et al.*, 2020). Por fim, materiais testemunho de cada população serão depositados no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio

Grande do Sul (ICN) e as duplicatas serão encaminhadas ao Herbário da Universidade de Caxias do Sul (HUCS).

4.2. CONTAGEM DO NÚMERO CROMOSSÔMICO

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-propionico a 2% (Monton, 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.

4.3. ESTIMATIVA DO TAMANHO DE GENOMA

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 citômetro de fluxo FACS Aria. 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. EVOLUÇÃO DO NÚMERO CROMOSSÔMICO E DO TAMANHO DE GENOMA

A reconstrução filogenética será inferida com base em uma matriz de dados de duas regiões do genoma plastidial (*rps4-trnS* e *trnG-R*) disponível no GenBank para populações

da Mata Atlântica (Tabela 4), sendo também incluídas outras amostras. Os dados serão editados e alinhados usando o algoritmo ClustalW implementado no Mega v.10 (Kumar *et al.*, 2018). Serão utilizadas as análises de Máximas Parcimônia e Máxima Verossimilhança conforme implementado no software Mesquite v.3.7 (Maddison & Maddison, 2021) para reconstrução da história evolutiva dos caracteres citogenéticos. Esse procedimento será realizado separadamente para o número cromossômico e tamanho do genoma. A inferência da evolução do número cromossômico também será realizada utilizando o programa ChromEvol v.2, que é baseado em modelos de verossimilhança (Mayrose *et al.*, 2010; Glick & Mayrose 2014).

Tabela 4. Número de acesso do GenBank para os marcadores *rps4-trnS* e *trnG-R*.

Espécies	<i>rps4-trnS</i>	<i>trnG-R</i>
<i>H. crispum</i> Kunth	MN257856	MN257878
<i>H. delicatulum</i> Sehnem	MN257857	MN257879
<i>H. elegans</i> Spreng.	MN257858, MN257859, MN257860	MN257880, MN257881, MN257882
<i>H. fragile</i> (Hedw.) C.V. Morton	MN257861	MN257883
<i>H. hirsutum</i> (L.) Sw.	MN257862, MN257863, MN257864, MN257865, MN257866,	MN257884, MN257885, MN257886, MN257887, MN257888
<i>H. microcarpum</i> Desv.	MN257867, MN257868,	MN257889, MN257890
<i>H. plumosum</i> Kaulf.	MN257869	MN257891
<i>H. pulchellum</i> Schltdl. & Cham.	MN257870	MN257892
<i>H. rufum</i> Fée	MN257872	MN257894
<i>H. venustum</i> Desv.	MN257873	MN257895
<i>H. vestitum</i> (C. Presl) Bosh	MN257874, MN257875, MN257876, MN257877	MN257896, MN257897, MN257898, MN257899

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

4.5. AQUISIÇÃO DE DADOS MORFOLÓGICOS

Os dados morfológicos serão compilados para características quantitativas (comprimento e largura da fronde, largura e comprimento da lâmina foliar, tamanho das células da lâmina foliar e dos esporos) e características categóricas (morfologia dos tricomas no estipe, distribuição e densidade dos tricomas na lâmina). Para obter os dados

das características contínuas será utilizado régua ou paquímetro, também serão medidas três replicatas por espécime. Serão mensurados os vouchers já depositados nos herbários HUICS e ICN, bem como os provenientes das coletas realizadas durante o desenvolvimento do projeto. Adicionalmente, as medidas dos esporos serão extraídas do trabalho de Lorscheitter e colaboradores (1999), no qual foi realizada a descrição morfológica dos esporos das samambaias ocorrentes do Rio Grande do Sul, também serão consultados outros trabalhos na literatura.

4.6. COMPILAÇÃO DE DADOS DE REPOSITÓRIOS E DA LITERATURA

Além dos dados gerados durante a execução deste projeto, será realizada busca em repositórios e literatura especializada, a fim de obter dados complementares para as análises, tanto para as espécies do subgênero *Sphaerocionium*, quanto para outras espécies do gênero *Hymenophyllum*. As contagens de número cromossomos serão extraídas do Index to Plant Chromosome Number (Goldblatt & Johnson, 1979) e The Chromosome Counts Database (Rice *et al.*, 2015), bem como em publicações. Os valores de tamanho de genoma serão obtidos no repositório Plant DNA C-values Database (Leitch *et al.*, 2019) e artigos científicos.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para testar a correlação entre as variáveis citogenéticas (tamanho de genoma e número cromossômico) e os caracteres morfológicos quantitativos, incluindo as medidas dos esporos, será calculada a correlação por meio do teste de Pearson. Os resultados serão avaliados através dos valores do coeficiente r e a visualização ocorrerá por meio de diagramas de dispersão. Já a relação entre as variáveis citogenéticas (tamanho de genoma e número cromossômico) e os caracteres categóricos será avaliada por meio de teste de comparação de médias. As análises estatísticas serão realizadas em R v.4.0.2 (R Core Team, 2020), que é adequado para dados biológicos e aplicação de estatística (Gentleman, 2008).

4.8. MODELAGEM DE NICHOS ECOLÓGICO

Os pontos de ocorrência das espécies serão obtidos dos bancos de dados SpeciesLink (CRIA, 2022) e Global Biodiversity Information Facility – GBIF (GBIF, 2022), bem como dos registros citados em Gonzatti *et al.* (2020). Os registros encontrados

serão filtrados, utilizando os critérios de disponibilidade completa dos dados e revisão taxonômica. Os dados bioclimáticos serão extraídos do repositório WorldClim (Hijmans *et al.*, 2005), com resolução de 2,5 arco-minutos. As variáveis bioclimáticas serão cuidadosamente selecionadas por análise de correlação utilizando o pacote *usdm* (Naimi, 2017) em R, sendo escolhidas as variáveis com menor taxa de correlação; pois, até mesmo camadas levemente correlacionadas são conhecidas por influenciar a precisão dos modelos de distribuição de espécies (Veloz, 2009). Para modelar a probabilidade de distribuição das espécies, será utilizado o algoritmo MaxEnt (Phillips *et al.*, 2006), disponível no pacote 'dismo' (Hijmans *et al.*, 2022) em R. Os modelos serão projetados para 2050 em cenários otimistas e pessimistas de mudanças climáticas. As análises serão realizadas utilizando a linguagem de programação R (R Core Team, 2020).

5. CRONOGRAMA

Tabela 5. Cronograma das atividades que serão realizadas durante o mestrado.

Atividades	2022											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Ingresso no PPGBM	█											
Redação do Projeto			█	█	█	█	█	█	█			
Revisão Bibliográfica	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Expedições de coleta					█	█	█	█	█	█	█	█
Realização das disciplinas*		█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Análises citogenéticas					█	█	█	█	█	█	█	█
Exame de proficiência							█	█				

Atividades	2023											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Revisão Bibliográfica	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Expedições de coleta	█	█	█	█	█	█						
Realização das disciplinas*	█	█	█	█	█	█						
Análises citogenéticas	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Análises estatísticas							█	█	█	█	█	█

Reconstrução filogenética			
Estágio docência			
Escrita de artigos científicos			
Redação da dissertação			
Seminário de dados			
Entrega da dissertação para comissão de pós-graduação			
Defesa			

*As disciplinas que serão cursadas durante o mestrado são seminários (GEP00007 e GEP00007); genética estatística (GEP00010); métodos de análises filogeográficas (GEP00195); genética, evolução e conservação de plantas (GEP0305); sistemática filogenética (GEP00088); citotaxonomia (BOT00146); fundamentos de sistemática (BOT00051); bioinformática aplicada à sistemática, biogeografia e macroevolução (BOT00175); tópicos especiais II: teoria e prática em biogeografia de plantas (BOT00027) e práticas de ensino em genética (GEP00069). Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6. ORÇAMENTO

Tabela 6. Orçamento estimado para execução do projeto.

Elemento de despesa	Descrição dos equipamentos e recursos	Valor estimado
Expedições de coleta	Combustível, acomodação e alimentação	R\$ 4000,00
Análise meiótica	Reagentes e utensílios de laboratório (vidraria, pipetas pasteur, tubo cônico, lâminas e lamínulas de microscopia, luvas)	R\$ 500,00
Citometria de fluxo	Reagentes (tampão, iodeto de propídeo, RNase) e utensílios de laboratório (pipeta, luvas, lâmina de barbear, filtros)	R\$ 3000,00

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

7. INFRAESTRUTURA

Para realização deste projeto será utilizada a infraestrutura física e tecnológica do Instituto de Biociência da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, incluindo o laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Genética. Também será usufruída a infraestrutura da Universidade de Caxias do Sul, como o Museu de Ciências Naturais da e apoio logístico.

8. RESULTADOS ESPERADOS

A partir da realização do presente estudo espera-se a melhor compreensão da história evolutiva e diversificação das espécies de *Hymenophyllum* subg. *Sphaerocionium*. Além disso, presume-se que as variações citogenéticas tenham correlação com as características morfológicas. Em relação à modelagem de nicho, pretende-se conhecer o nicho atual das espécies e averiguar a influência das mudanças climáticas na alteração da distribuição potencial das espécies do grupo estudado, tendo em vista que apresentam alta sensibilidade às mudanças ambientais. No final dos estudos serão obtidos dados para a publicação de dois artigos científicos. O primeiro sobre a influência das variações citogenéticas na evolução e diversificação de espécies de *Hymenophyllum* subg. *Sphaerocionium*, e o segundo artigo relacionado a modelagem de nicho e a influência das mudanças climáticas na distribuição das espécies do subgênero.

9. REFERÊNCIAS

Boit A, Sakschewski B, Boysen L, Cano-Crespo A, Clement J, Garcia-alaniz N, Kok K, Kolb M, Langerwisch F, Rammig A, Sachse R (2016) Large-scale impact of climate change vs. land-use change on future biome shifts in Latin America. *Global change biology* 22:3689-701.

Bosch RB (1858) Synopsis Hymenophyllacearum. *Nederlandsch kruidkundig archief* 3: 341-419.

Braithwaite AF (1975) Cytotaxonomic observations on some Hymenophyllaceae from the New Hebrides, Fiji and New Caledonia. *Botanical Journal of the Linnean Society* 71: 167-189.

Britton DM (1974) The significance of chromosome numbers in ferns. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61:310-317.

Brownlie G. (1965) Chromosome numbers in some Pacific Pteridophyta. *Pacific Science* 19:493-497.

Brownlie G (1954) Introductory note to cyto-taxonomic studies of New Zealand Ferns. *Transactions of the Royal Society of New Zealand* 82:665-666.

Brownlie G (1957) Chromosome numbers in New Zealand Ferns. Transactions of the Royal Society of New Zealand 85:213-216.

Brownlie G (1958) Chromosome numbers in New Zealand ferns. Transactions of the Royal Society of New Zealand 85:213-216.

Brownlie G (1961) Additional chromosome numbers - New Zealand ferns. Transactions of the Royal Society of New Zealand 1:1-4.

Clark J, Hidalgo O, Pellicer J, Liu H, Marquardt J, Robert Y, Christenhusz M, Zhang S, Gibby M, Leitch IJ & Schneider H (2016) Genome evolution of ferns: evidence for relative stasis of genome size across the fern phylogeny. New Phytologist 210:1072-1082

Del Rio C, Hennequin S, Rouhan G, Ebihara A, Lowry PP, Dubuisson JY, Gaudeu M (2017) Origins of the fern genus *Hymenophyllum* (Hymenophyllaceae) in New Caledonia: Multiple independent colonizations from surrounding territories and limited in situ diversification. Taxon 66:1041-1064

Doležel J, Greilhuber J & Suda J (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. Nature protocols 2:2233-2244.

Dubuisson JY, Hennequin S, Douzery EJP, Cranfill RB, Smith AR & Pryer KM (2003b) rbcL Phylogeny of the Fern Genus *Trichomanes* (Hymenophyllaceae), with Special Reference to Neotropical Taxa. International Journal of Plant Sciences 164: 753-761.

Dubuisson JY, Hennequin S, Rakotondrainibe F & Schneider H (2003a) Ecological diversity and adaptive tendencies in the tropical fern *Trichomanes* L.(Hymenophyllaceae) with special reference to climbing and epiphytic habits. Botanical Journal of the Linnean Society 142:41-63.

Dubuisson JY (1997) rbcL Sequences: A Promising Tool for the Molecular Systematics of the Fern Genus *Trichomanes* (Hymenophyllaceae)?. Molecular Phylogenetics and Evolution 8:128-138.

Dyer RJ, Pellicer J, Savolainen V, Leitch IJ & 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 Biology 13:1-13.

Ebihara A, Dubuisson JY, Iwatsuki K, Hennequin S & Ito M (2006) A taxonomic revision of Hymenophyllaceae. *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants* 51:221-280.

Ebihara A, Hennequin S, Iwatsuki K, Bostock PD, Matsumoto S, Jamn R, Dubuisson JY & Ito M (2004) Polyphyletic origin of *Microtrichomanes* (Prantl) Copel. (Hymenophyllaceae), with a revision of the species. *Taxon* 53:935-948.

Ebihara A, Iwatsuki K, Ito M, Hennequin S & Dubuisson JY (2007) A global molecular phylogeny of the fern genus *Trichomanes* (Hymenophyllaceae) with special reference to stem anatomy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 155:1-27.

Ebihara A, Iwatsuki K, Kurita S & Ito M (2002) Systematic position of *Hymenophyllum rolandi-principis* Rosenst. or a monotypic genus *Rosenstockia* Copel. (Hymenophyllaceae) endemic to New Caledonia. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 53:35-49.

Fabbri F (1965) Secondo supplemento alle tavole cromosomiche delle Pteridophyta di Alberto Chiarugi. *Caryologia* 18:675-731.

Fujiwara T, Liu H, Meza-Torres EI, Morero RE, Vega AJ, Liang, Z, Ebihara A, Leitch IJ & Schneider H (2021) Evolution of genome space occupation in ferns: linking genome diversity and species richness. *Annals of Botany* 20:1-12

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

GBIF: The Global Biodiversity Information Facility (2022) GBIF Home Page. [cited 2022 Jul 29]. Available from: www.gbif.org

Gentleman R (2008) *R Programming for Bioinformatics*. CRC Press, New York, 328 pp.

Gessner F (1939) Die Assimilation der Hymenophyllaceen. *Protoplasma* 34:102-116.

Glick L & Mayrose I (2014) ChromEvol: assessing the pattern of chromosome number evolution and the inference of polyploidy along a phylogeny. *Molecular Biology and Evolution* 31:1914-1922.

Goldblatt P & Johnson DE (ed.). (1979) Index to plant chromosome numbers. Missouri Botanical Garden, St. Louis. Disponível em: <http://legacy.tropicos.org/Project/PCN>. Acesso em: 20 junho. 2022.

Gonzatti F, Windisch PG, Scariot FJ, Echeverrigaray S, Ritter MR (2020) Revision of *Hymenophyllum* subg. *Sphaerocionium* (Hymenophyllaceae) in the Atlantic Forest Domain (Brazil), Based on Molecular and Morphological Evidence. *Systematic Botany* 45:707–748.

Gonzatti F, Windisch PG (2022) Hymenophyllaceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB115861>>. Acessado em: 08 Junho 2022

Guerra M (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research* 120:339-350.

Hennequin S, Ebihara A, Dudson JY & Schneider H (2010) Chromosome number evolution in *Hymenophyllum* (Hymenophyllaceae), with special reference to the subgenus *Hymenophyllum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55:47–59.

Hennequin S, Ebihara A, Ito M, Iwatsuki K & Dubuisson JY (2003) Molecular systematics of the fern genus *Hymenophyllum* s.l. (Hymenophyllaceae) based on chloroplastic coding and noncoding regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27:283-301.

Hennequin S, Ebihara A, Ito M, Iwatsuki K & Dubuisson JY (2006) New Insights into the Phylogeny of the Genus *Hymenophyllum* s.l. (Hymenophyllaceae): Revealing the Polyphyly of *Mecodium*. *Systematic Botany* 31:271-284.

Henry TA, Bainard JD & Newmaster SG (2014) Genome size evolution in Ontario ferns (Polypodiidae): evolutionary correlations with cell size, spore size, and habitat type and an absence of genome downsizing. *Genome* 57:555-566.

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

Hijmans RJ, Phillips S, Leathwick J & Elith J (2022) Package ‘dismo’ Species Distribution Modeling. R Package Version 1.3-8.

IPCC (2014) Climate Change 2014: synthesis report. Geneva, Switzerland, 169 pp.

Iwatsuki K (1990) Hymenophyllaceae. In: Krammer KU and Green PS (eds) The families and genera of vascular plants. Pteridophytes and Gymnosperm. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, pp 157-163.

Judd WS, Campbell C, Kellogg EA, Stevens PF & Donoghue MJ (2009) Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético. 3ª edição. Artmed Editora, Porto Alegre, 630 pp.

Kessler M, Kluge J, Hemp A, Ohlemüller R (2011) A global comparative analysis of elevational species richness patterns of ferns. *Global Ecology and Biogeography* 20:868-880.

Kim HT & Kim JS (2020). The dynamic evolution of mobile open reading frames in plastomes of *Hymenophyllum* Sm. and new insight on *Hymenophyllum coreanum* Nakai. *Scientific reports* 10:1-11.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C & Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution* 35:1547-1549

Leitch IJ, Johnston E, Pellicer J, Hidalgo O & Bennett MD (2019) Plant DNA C-values Database (Release 7.1). Disponível em: <https://cvalues.science.kew.org/>. Acesso em: 22 de junho de 2022.

Lima LV, Sousa SM, Almeida TE & Salino A (2021) State of the art in cytogenetics, insights into chromosome number evolution, and new C-value reports for the fern family Gleicheniaceae. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 93:1-14.

Lorscheitter ML, Ashraf AR, Windisch PG & Mosbrugger V (1999). Pteridophyte spores of Rio Grande do Sul flora, Brazil. Part II. *Palaeontographica Abteilung B* s.v:71-235.

Love A (1976) IOPB Chromosome Number Reports LIII. *Taxon* 25:483-500.

Maddison WP & Maddison DR (2021) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis - version 3.70. Disponível em: <http://www.mesquiteproject.org>. Acesso em: 22 de junho de 2022.

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

Manton I & Sledge WA (1954) Observations on the cytology and taxonomy of the pteridophyte flora of Ceylon. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 238:127-185.

Manton I & Vida G (1968) Cytology of the fern flora of Tristan da Cunha. Proceedings of the Royal Society of London 170:361-379.

Mayrose I, Barker MS & Otto SP (2010) Probabilistic models of chromosome number evolution and the inference of polyploidy. Systematic Biology 59:132-44.

Mehltreter K, Walker LR & Shares JM (2010) Fern ecology. Cambridge University Press, New York, 444 pp.

Mehra PN & Singh G (1957) Cytology of Hymenophyllaceae. Journal of Genetics 55:379-393.

Morton CV (1947) The American species of *Hymenophyllum*, section *Sphaerocionium*. Systematic Plant Studies 29:139-201

Morton CV (1968) The genera, subgenera, and sections of the Hymenophyllaceae. Contributions from the United States National Herbarium 38:153-214.

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

Naimi B (2017) usdm: Uncertainty analysis for species distribution models. R Package 1.1-18.

Parra MJ, Acuña K, Corcuera L & Saldaña A (2009) Vertical distribution of Hymenophyllaceae species among host tree microhabitats in a temperate rain forest in Southern Chile. Journal of Vegetation Science 20:588-595.

Pellicer J, Hidalgo O, Dodsworth S & Leitch IJ (2018) Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. *Genes*, 9:88-102.

Peterson AT & Vieglais DA (2001) Predicting Species Invasions Using Ecological Niche Modeling: New Approaches from Bioinformatics Attack a Pressing Problem: A new approach to ecological niche modeling, based on new tools drawn from biodiversity informatics, is applied to the challenge of predicting potential species' invasions. *BioScience* 51:363–371

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

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. *Annals of botany* 109:1019-1026.

Pryer KM, Schneider H, Smith AR, Cranfill R, Wolf PG, Hunt JS & Sipes SD (2001a) Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. *Nature* 409:618-622.

Pryer KM, Smith AR, Hunt JS & Dubuisson JY (2001b) rbcL data reveal two monophyletic groups of filmy ferns (Filicopsida: Hymenophyllaceae). *American Journal of Botany*, v. 88, n. 6, p. 1118-1130, 2001.

Pteridophyte Phylogeny Group I (2016) A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. *Journal of systematics and evolution* 54:563-603.

Rasbach H, Rasbach K & Bennert HW (1990). New records and new cytological results for the fern flora of Madeira. *Fern Gaz* 13:391-395.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 4.0.2. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org>. Acesso em: 20 junho de 2022.

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

Rice Anna, Glick L, Abadi S, Einhorn M, Kopelman NM, Salman-Minkov A, Mayzel J, Chay O & Mayrose I (2015). Chromosome Counts Database (CCDB)—a community resource of plant chromosome numbers. *New Phytologist* 206:19-26.

Rio Grande do Sul. 2014. Decreto nº 52.109, de 01 de dezembro de 2014. Assembléia Legislativa. Declara As Espécies da Flora Nativa Ameaçadas de Extinção no Estado do Rio Grande do Sul. Publicado no DOE nº 233, de 02 de dezembro de 2014.

Scarano FR & Ceotto P (2015) Brazilian Atlantic forest: impact, vulnerability, and adaptation to climate change. *Biodiversity and Conservation* 24:2319–2331.

Sermolli REGP (1977) Tentamen Pteridophytorum genera in taxonomicum ordinem redigendi. *Webbia* 31:313-512.

Sessa EB & Der J (2016) Evolutionary genomics of ferns and lycophytes. *Advances in Botanical Research* 78:215-254.

Silva CSPBR (2013) Ecological niche modeling, cytogenetics and phylogeography of the genera *Geomalacus* and *Letourneuxia* (Gastropoda, Pulmonata) from the Iberian-Moroccan region. Doutorado em Ciências Biológicas com Especialidade em Biologia Evolutiva, Universidade do Algarve.

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

Tatuno S & Takei M (1969). Karyological studies in Hymenophyllaceae. I. Chromosome of the genus *Hymenophyllum* and *Mecodium* in Japan. *Bot Mag Tokyo* 82:121-129.

Tindale MD & Roy SK (2002). A cytotaxonomic survey of the Pteridophyta of Australia. *Australian Systematic Botany* 15:839-937.

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

Veloz SD (2009) Spatially autocorrelated sampling falsely inflates measures of accuracy for presence-only niche models. *Journal of Biogeography* 36:2290-2299.

Walker TG (1966) A cytotoxic survey of the Pteridophytes of Jamaica. *Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh*, 66:169-237.

Wang FG, Wang AH, Bai CK, Jin DM, Nie LY, Harris AJ, Che L, Wang JJ, Li SY, Xu L, Shen H, Gu YF, Shang H, Duan L, Zang CX, Chen HF & Yan YH (2022) Genome Size Evolution of the Extant Lycophytes and Ferns. *Plant Diversity* 44:141-152.

Wiens JA, Stralberg D, Jongsomjit D, Howell CA, Snyder MA (2009) Niches, models, and climate change: assessing the assumptions and uncertainties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:19729-36.

Zotz G & Büche M (2000) The epiphytic filmy ferns of a tropical lowland forest-species occurrence and habitat preferences. *Ecotropica* 6:203-206.