



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

JOÃO PAULO SILVA VIEIRA

**MODELAGEM DE NICHOS, VARIABILIDADE GENÉTICA
E CONSERVAÇÃO DE *Anomochloa marantoidea* BRONGN.
(POACEAE), ENDÊMICA DO SUL DA BAHIA, BRASIL**

Feira de Santana - BA

2017

JOÃO PAULO SILVA VIEIRA

**MODELAGEM DE NICHOS, VARIABILIDADE GENÉTICA
E CONSERVAÇÃO DE *Anomochloa marantoidea* BRONGN.
(POACEAE), ENDÊMICA DO SUL DA BAHIA, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito para obtenção do título de mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Dra. Reyjane Patrícia de Oliveira
Coorientadora: Dra. Alessandra Selbach Schnadelbach

Feira de Santana - BA

2017

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

V715m Vieira, João Paulo Silva
Modelagem de nicho, variabilidade genética e conservação de
Anomochloa maranteidea Brongn (Poaceae) endêmica do sul da Bahia,
Brasil./ João Paulo Silva Vieira. Feira de Santana, 2017.
114f.: il.

Orientadora: Reyjane Patrícia de Oliveira
Coorientadora: Alessandra Selbach Schnadelbach
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de
Santana. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais, 2017.

1.Mata Atlântica – Conservação . 2.Maxent. 3.Espécie rara.
I.Oliveira, Reyjane Patrícia de, orient. II.Schnadelbach, Alessandra
Selbach, coorient. III.Universidade Estadual de Feira de Santana. IV.
Titulo.

CDU : 582.542.1

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Patrícia Luz Ribeiro
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB)



Profa. Dra. Daniela Santos Carneiro Torres
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)



Profa. Dra. Reyjane Patrícia de Oliveira
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)
Orientadora e Presidente da Banca

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter nos dotado de sabedoria suficiente para entender o Universo e suas leis matemáticas. Por me guiar e iluminado minha mente para que este trabalho fosse concluído.

À minha família; principalmente minha mãe Valdirene (dona Val), meu irmão Caio (vulgo “Porco”), e à minha noiva Keylla por todo apoio e compreensão para que eu pudesse superar mais essa etapa da minha vida.

À Universidade Estadual de Feira de Santana e ao Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pelo ensino gratuito e de qualidade Ao LAMOL e ao LAPEM pela estrutura concedida e um agradecimento especial aos funcionários Gorete (Gó), Evandro, Danielle (Dani) e Adriana (Dri).

Às minhas orientadoras Reyjane Patrícia e Alessandra, por me aceitarem mais uma vez e confiarem em mim para a realização desse trabalho, assim como por vários esclarecimentos, explicações e conselhos, sempre fazendo o possível e sempre me incentivando a conseguir o melhor. Espero que nossa parceria seja duradoura. Devo também agradecer à Lynn Clark, por suas ideias e direcionamento para que esta pesquisa fosse concluída.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico– processos 484381/2010-5, 562349/2010-3, 563558/2010-5 e 401526/2014-3) e FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – processo PNX0014/2009) pelo apoio financeiro para viagens de campo para coleta e para trabalhos laboratoriais.

Este trabalho não seria possível sem a ajuda nas coletas dos colegas e amigos Iasmin Oliveira (Min), Marcos Dórea (Marquinhos), José Lima Paixão (Zé Lima), Jamile Lima, Jomar Jardim, Maria LS Carvalho (Tutti). Quero também agradecer aos conselhos e esclarecimentos dos professores Cássio van den Berg, Frederic e Cassiano que muito contribuíram para esse trabalho.

Agradeço aos amigos e colegas de laboratório Iasmin (Min, ela de novo), Luane (Lua), Kaio, Andreza (Bê), Maria Cristina (Cris), Dalila e Daiane (Dai) por me ajudarem em muitos momentos, dentro e fora do laboratório, e pelos momentos de descontração.

Agradecimento especial deve ser dado ao povo da aldeia indígena Tupinambá de Olivença, principalmente ao Cacique Babau e ao seu pai, que auxiliaram e permitiram que procurássemos essa planta difícil em áreas próximas à sua aldeia.

Em vão, centenas de milhares de homens, amontoados num pequeno espaço, se esforçavam por desfigurar a terra em que viviam. Em vão a cobriam de pedras para que nada pudesse germinar; em vão arrancavam as ervas tenras que pugnavam por irromper; em vão impregnavam o ar de fumaça; em vão escorraçavam os animais e os pássaros - Em vão... porque até na cidade, a primavera é primavera.

Liev Tolstoi, em "Ressurreição"

Percebi ainda outra coisa debaixo do sol: Os velozes nem sempre vencem a corrida; os fortes nem sempre triunfam na guerra; os sábios nem sempre têm comida; os prudentes nem sempre são ricos; os instruídos nem sempre têm prestígio; pois o tempo e o acaso afetam a todos.

Eclesiastes 9: 11

RESUMO

O gênero *Anomochloa* Brongn. inclui uma única espécie, *A. marantoidea* Brongn., reconhecidamente a mais antiga entre as gramíneas viventes. É uma espécie rara, endêmica da Mata Atlântica do sul do estado da Bahia com apenas duas populações conhecidas até pouco tempo, ambas com poucos indivíduos e nenhuma em área protegida, sendo considerada criticamente ameaçada de extinção. O conhecimento sobre essa espécie é de suma importância para compreender a evolução dentro da família, e assim, o presente trabalho visou ampliar o conhecimento acerca da extensão da distribuição geográfica da mesma e avaliar suas áreas potenciais de ocorrência, bem como conhecer os níveis de diversidade e ameaças genéticas resultantes do pequeno tamanho populacional, dados essenciais para programas que visem sua conservação. Duas novas populações foram localizadas recentemente e o nicho ecológico modelado não divergiu da distribuição esperada, indicando uma alta restrição climática e reafirmando a raridade da espécie. O índice de cobertura vegetal e a precipitação foram os principais requisitos ambientais a influenciar sua distribuição tão restrita. Os níveis de diversidade genética nas populações inferidos por marcadores moleculares indicam que a espécie tem capacidade para responder imediatamente bem em curto prazo e que um plano de conservação pode ser eficiente em manter a atual diversidade específica. Esta diversidade se mostrou relacionada com tamanho populacional, assim, propágulos para o estabelecimento de novas populações em sítios climaticamente adequados devem ser obtidos das maiores populações. Análises de estruturação genética sugerem fragmentação recente e indicam baixo fluxo gênico entre as populações conhecidas da espécie, com consequentes altos níveis de endogamia, por isso é recomendado fluxo gênico mediado por atividade humana entre as populações para evitar depressão endogâmica. É hipotetizado que diferenças genéticas entre as populações são causadas majoritariamente por deriva aleatória, o que tornou populações com menos indivíduos mais diferenciadas geneticamente daquela com o maior número. Isso implica que um número mínimo de indivíduos (~100) é desejável para evitar redução na diversidade genética das populações.

Palavras-chave: Mata Atlântica, Maxent, ISSR, espécie rara

ABSTRACT

The genus *Anomochloa* Brongn. includes a single species, *A. marantoidea* Brongn., known as the earliest extant grass. It is a rare species from the Brazilian Atlantic rainforest, endemic to the southern Bahia. Only two populations were discovered so far, occurring out protected areas with few individuals registered, thus, *A. marantoidea* is considered critically threatened with extinction. The study of this species is highly important to understand evolutionary processes within Poaceae family. The present study aimed to increase the knowledge about its geographic range, to evaluate its potential areas of occurrence and to access its genetic diversity, detecting probable genetic threats as a result of its small population size. These data are essential for the development of conservation programs. Two new populations were recently discovered and the modeled ecological niche to *A. marantoidea* did not diverge from the expected geographical extent, denoting high climatic restriction and reasserting its rarity. The variables Index of Tree Cover and Rainfall are the main components that influence its restricted distribution. The levels of genetic diversity within the populations accessed by molecular markers indicate that *A. marantoidea* exhibits capacity for favorable response in short time and a conservation plan may be efficient to maintain its current genetic diversity. This diversity is correlated to the population size, for this reason, the propagules necessary for establishing new populations in climatically suitable sites must be originated from the largest populations. Genetic structure analysis suggests recent fragmentation and low gene flow among populations showing high levels of inbreeding. In this way, we recommend human mediated gene flow between the populations in order to mitigate the risks of inbreeding depression. It is hypothesized that the genetic differences among populations are caused mostly by random drift, resulting in populations with few individuals more genetically differentiated than the large ones. This implies that a minimum number of individuals (~100) is desirable to avoid the decrease of genetic diversity in populations.

Keywords: Atlantic Forest, Maxent, ISSR, rare species

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	9
CAPÍTULO 1: Modelagem de nicho ecológico e implicações para a conservação de <i>Anomochloa marantoidea</i> Brongn. (Poaceae), a mais antiga das gramíneas, endêmica da Mata Atlântica, Brasil	27
1.1 Introdução	30
1.2 Materiais e Métodos.....	34
1.2.1 Área de estudo e coleta de dados.....	34
1.2.2 Construção do modelo preditivo	35
1.2.3 Teste de conservação de nicho e status de conservação da espécie	37
1.2.4 Avaliação dos modelos.....	38
1.3 Resultados.....	38
1.3.1 Uso do modelo para guiar esforço de coleta em campo	38
1.3.2 Desempenho dos modelos	39
1.3.3 Contribuição das variáveis para a construção do modelo descritivo.....	40
1.3.4 Área de distribuição de habitat potencial	40
1.4 Discussão.....	41
1.4.1 Modelagem de Nicho Ambiental com poucos registros de ocorrência.....	41
1.4.2 Contribuição das variáveis para modelagem do Nicho Fundamental	42
1.4.3 Área de distribuição de habitat potencial e Nível de conservação	45
1.5 Conclusões	47
REFERÊNCIAS.....	48
CAPÍTULO 2: Variabilidade genética e estrutura populacional da mais antiga linhagem de gramíneas, <i>Anomochloa marantoidea</i> Brongn. (Poaceae), como subsídio a sua conservação	67
2.1 Introdução	70
2.2 Materiais e métodos	73
2.2.1 Amostragem, extração e quantificação do DNA.....	73
2.2.2 Amplificação ISSR-PCR e teste de polimorfismo	74
2.2.2 Diversidade Genética	75
2.2.3 Estrutura populacional.....	76
2.3 Resultados.....	79
2.4 Discussão.....	81

2.4.1	A raridade de <i>Anomochloa marantoidea</i> e suas consequências	81
2.4.2	Diversidade genética.....	81
2.4.3	Estruturação populacional	86
2.5	Considerações finais e estratégias para conservação de <i>Anomochloa marantoidea</i>.....	90
	REFERÊNCIAS.....	92
	CONCLUSÃO GERAL	112

INTRODUÇÃO GERAL

Mata Atlântica brasileira

A Mata Atlântica brasileira é um dos mais importantes *hotspots* mundiais de biodiversidade (MYERS et al., 2000), abrigando mais de 15000 espécies de plantas, cerca de 5% da diversidade mundial. Destas 8.000 são endêmicas; 5% também é a proporção da diversidade mundial para vertebrados presentes neste bioma (PINTO et al., 2012). A Mata Atlântica já apresentou uma distribuição contínua ao longo de toda a costa brasileira, estendendo-se até o Paraguai e Argentina, cobrindo mais de 1,5 milhões de km², sendo a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano (TABARELLI et al., 2005).

Apesar de ser um dos domínios mais favorecidos por áreas de proteção integrais da América do Sul e da existência de muitos instrumentos legais para a sua proteção (BRASIL 2008), as regiões protegidas na Mata Atlântica representam menos de 20% da sua atual extensão, sendo ainda muito comum a realização de atividades ilegais (GALINDO-LEAL e CÂMARA, 2003; TABARELLI et al. 2005). Como consequência, este bioma se encontra atualmente reduzido a fragmentos disjuntos, a maioria em propriedades privadas (RAMBALDI e OLIVEIRA, 2003). Dados recentes indicam que no período entre 2014 e 2015, mais de 18 mil km² da Mata Atlântica foi desmatada (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA e INPE, 2016) e calcula-se que restam apenas 8,5% de remanescentes com área maior que 100 hectares (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2015). Muitos destes fragmentos isolados são insuficientes para a persistência de espécies e manutenção de processos ecológicos e da biodiversidade em longo prazo (RAMBALDI e OLIVEIRA, 2003; SILVA e TABARELLI, 2000).

Devido à sua distribuição heterogênea, várias subdivisões para a Mata Atlântica já foram propostas. Estas são baseadas em grupos biológicos bem conhecidos, a exemplo daquela proposta por Silva e Casteleti (2005). Dentro dessa classificação, a sub-região da Bahia, que se estende de Sergipe ao Espírito Santo, apresenta alto grau de endemismo, principalmente de vertebrados terrestres, borboletas florestais e plantas. Entre as principais plantas endêmicas da região, estão várias espécies de leguminosas (Fabaceae), de palmeiras incluindo algumas de interesse econômico, a exemplo da “piaçava” (*Attalea funifera* Mart.), e muitas gramíneas, especialmente bambus lenhosos e herbáceos (SILVA e CASTELETI, 2005; SODERSTROM; JUDZIEWICZ; CLARK, 1988; THOMAS et al., 1998).

As gramíneas e sua importância

Poaceae (gramíneas) é uma família de monocotiledôneas que tem como característica mais marcante a estrutura das suas inflorescências, que são conhecidas como espiguetas. Suas sépalas foram substituídas por órgãos florais de aspecto folhoso, pálea e lema, e as pétalas substituídas por lodículas (KELLOGG, 2001).

Pela grande diversidade de gêneros e espécies, ampla distribuição e ocupação de diferentes ambientes, além da importância econômica de alguns representantes, Poaceae (gramíneas) é considerada uma das mais importantes famílias de Angiospermas. São mais de 12.000 espécies reunidas em quase 800 gêneros, organizados em 12 subfamílias, com base em informações morfológicas e moleculares (SORENG et al., 2015). Entre seus representantes mais importantes estão o trigo (*Triticum* L.; Pooideae), o milho (*Zea mays* L.; Panicoideae), a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.; Panicoideae) o arroz (*Oryza sativa* L.; Oryzoideae) e os bambus (Bambusoideae).

As subfamílias Anomochlooideae, Pharoideae e Bambusoideae ocorrem especialmente em florestas neotropicais, frequentemente apresentam folhas pseudopeciouladas e padrão fotossintético C₃, enquanto as demais (Oryzoideae, Pooideae, Aristidoideae, Danthonioideae, Chloridoideae, Arundinoideae, Micrairoideae, Panicoideae e Puelioideae) predominam em savanas ou ambientes campestres, com folhas geralmente lineares, não pseudopeciouladas e com via fotossintética C₃ ou C₄ (GPWG II, 2012).

Ao longo da sua evolução, houve uma mudança ecológica na família de um habitat inicialmente florestal e úmido, conservado por algumas subfamílias, para ambientes abertos e secos, o que marcou o início da principal diversificação nas gramíneas, fazendo com que seus representantes conquistassem os mais diversos nichos ecológicos do planeta e se tornassem as plantas dominantes em extensos biomas, denominados *grasslands*, ou “campos gramíneos” (KELLOGG, 2001). Acredita-se que esta transição ocorreu no Mioceno (24-14 ma) e que está ligada com o desenvolvimento de polinização anemófila (LINDER e RUDALL, 2005).

A linhagem mais antiga das gramíneas

A subfamília Anomochlooideae representa a linhagem mais antiga da família Poaceae. Esta tem distribuição neotropical e é constituída por duas tribos monogenéricas, Anomochloae C. E. Hubb. e Streptochaetae C. E. Hubb., que incluem apenas *Anomochloa* Brongn. e *Streptochaeta* Schrad. ex Nees, respectivamente (SORENG et al., 2015). A espécie *A. marantoidea* Brongn., única representante do gênero, foi posicionada inicialmente entre os bambus herbáceos devido ao seu aspecto bambusóide e ao ambiente de ocorrência, além de

caracteres relacionados à anatomia foliar (JUDZIEWICZ e SODERSTROM, 1989). Porém, a partir do início dos estudos filogenéticos em Poaceae na década de 1990, a real posição de *A. marantoidea* na evolução da família foi esclarecida, através de análises baseadas em sequências de DNA do gene *ndhF*, que codifica a enzima NADH desidrogenase F (CLARK, ZHANG e WENDEL, 1995). Ao invés de posicionada entre os bambus herbáceos, que pertencem à subfamília Bambusoideae (tribo Olyreae), *A. marantoidea* tem sido evidenciada como representante da mais antiga linhagem de gramíneas viventes, posição esta que tem sido corroborada por diversas filogenias desde então (BOUCHENAK-KHELLADI et al., 2010; BREMER e BAUM, 2002; BURKE et al., 2016; DUVALL e MORTON, 1996; GAUT et al., 1999; JUDZIEWICZ e CLARK, 2007; MASON-GAMER, WEIL e KELLOGG, 1998; PRASAD et al., 2011).

Esse gênero cujo nome significa “gramínea anômala” foi descrito por Adolphe Theodore Brongniart no século XIX a partir de espécimes cultivados na estufa do *Jardin des Plantes* em Paris (BRONGNIART, 1851). Porém, naquela época não existia muita clareza sobre a origem dos propágulos. Enquanto o artigo de Brongniart indicava “província da Bahia, Brasil”, as etiqueta de espécimes em herbários mostravam, em tradução livre, “Morro chamado, província do Rio de Janeiro”. A única informação consistente sobre a origem dessa espécie era o país, isso levou a buscas no Rio de Janeiro, que não obtiveram sucesso (JUDZIEWICZ e SODERSTROM, 1989). Assim, os espécimes que cresciam em casa de vegetação representavam o único material vivo disponível para o gênero até 1866, quando inevitavelmente morreram e não foram mais encontradas, seja campo ou em cultivo (JUDZIEWICZ e SODERSTROM, 1989; JUDZIEWICZ et al., 1999).

A partir da década de 1960, tiveram início os estudos sobre a Sistemática e Evolução de bambus Neotropicais pelo Dr. Thomas Soderstrom, do Smithsonian Institution, juntamente com sua colega, Cleofé Calderón, os quais investiram em amplas viagens de coleta para diferentes áreas na América Tropical, incluindo a Amazônia e Mata Atlântica. Esses pesquisadores tinham grande interesse em localizar amostras de gêneros de Poaceae pouco conhecidos ou cuja origem era desconhecida, a exemplo de *Anomochloa marantoidea*. Após mais de 100 anos de esforços, em meados de 1976, Cleofé Calderón e o então funcionário da Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Talmón S. Santos, localizaram uma população dessa espécie no município de Una, no Sul da Bahia, o que foi motivo de grande comemoração entre os estudiosos desta família (JUDZIEWICZ e SODERSTROM, 1989). Até o início do presente trabalho, apenas duas populações naturais da espécie eram conhecidas.



Figura 1. *Anomochloa marantoidea*. **A**, Habitat; **B** e **C**, Hábito; **D**, Detalhe da inflorescência. Fotos: J. Vieira (A); J. Lima (B); J. Jardim (C) e C. Silva (D).

Anomochloa marantoidea é exclusiva da região de Una, na Mesorregião do Sul Baiano, microrregião de Ilhéus-Itabuna (também conhecida como Região Cacaueira), ocorre tipicamente em florestas de encosta de morro (Fig. 1 A). Os indivíduos são ervas perenes, cespitosas, de tamanho médio, chegando até 1 m de altura (Fig. 1 B, C); suas folhas são longas e largas (4-7 por colmo), que lembram as de representantes da família Marantaceae, daí seu epíteto específico (JUDZIEWICZ et al., 1999). A inflorescência difere bastante dos demais membros da família, com brácteas conspícuas e estruturas apenas equivalentes às espiguetas (Fig. 1 D) (GPWG, 2001; KELLOGG, 2001; SAJO, LONGHI-WAGNER e RUDALL, 2008; SAJO et al., 2012).

Pela distribuição tão restrita, pequeno número de populações e de indivíduos em cada população, *Anomochloa marantoidea* está entre as espécies mais raras do mundo. E por ser um táxon basal e raro de uma importante família, torna-se ainda mais importante, principalmente do ponto de vista evolutivo e biogeográfico (THOMAS, 2007). Com base em estudos antigos, a origem da família Poaceae era hipotetizada para o continente africano, apontando os bambus como sua linhagem mais antiga (RAVEN e AXELROD, 1974). Contudo, uma vez que a localização de clados basais é interpretada como indicativo de centros de origem do grupo (HEADS, 2009), a inclusão de sequências de DNA de *A. marantoidea* em estudos filogenéticos e biogeográficos apontou evidências para o surgimento das gramíneas em florestas da América do Sul ou Gondwana (BOUCHENAK-KHELLADI et al., 2010; BREMER e BAUM, 2002; CLARK, ZHANG e WENDEL, 1995; KELLOGG, 2001; PRASAD et al., 2011).

Também é consenso entre os pesquisadores que espécies raras apresentam características que as diferem de espécies com distribuição mais ampla, podendo esta raridade ser devida a fatores intrínsecos, como por exemplo, seu sistema reprodutivo e mecanismos de dispersão (ESPELAND e EMAM, 2011; KUNIN e GASTON, 1993) e a fatores externos, como alterações ambientais e intervenção humana (GOERCK, 1997). Cada um desses fatores tem diferentes implicações para a conservação de espécies e demandam medidas conservacionistas específicas. No trabalho clássico acerca de padrões de raridade de espécies realizado por Rabinowitz (1981), a autora propõe uma classificação em sete grupos, onde as espécies que ocupam o grupo mais ameaçado seriam aquelas com distribuição restrita, pequeno número populacional e que apresentam especificidades ambiental. *Anomochloa marantoidea* pode claramente se encaixar nesse grupo, por todos os atributos já mencionados, justificando o investimento em estudos que priorizem sua conservação.

Diversidade Genética

A diversidade genética de uma espécie é estimada pela quantidade de diferentes alelos e genótipos detectados. Mudanças nas frequências de alelos de populações e espécies são a base do processo evolutivo. A variabilidade genética é a matéria-prima sobre a qual surgem mudanças adaptativas que podem garantir a sobrevivência de uma entidade evolutiva sob determinada pressão seletiva (FRANKHAM, 1995). Diferenças entre genes, por menores que sejam, podem corresponder a diferentes aminoácidos durante o processo de transcrição e, conseqüentemente, gerar diferentes proteínas. Proteínas diferentes podem significar diferenças em processos bioquímicos ou na morfologia de membros de uma mesma espécie (FRANKHAM, BRISCOE e BALLOU, 2002).

A IUCN reconhece a necessidade de conservação da biodiversidade em três níveis: diversidade genética, diversidade de espécies e diversidade de ecossistemas (IUCN, UNEP e WWF, 1980). Entretanto, muito ceticismo já houve em relação à pertinência do uso de dados sobre a diversidade genética para fins de conservação. Já foi argumentado que espécies tornavam-se extintas apenas devido a fatores ecológicos (e.g.: perda de habitat, espécies invasoras, mudanças climáticas) e que a variabilidade genética pouco influenciava ou que não havia tempo hábil para que esta viesse a influenciar no vigor das espécies (HAMRICK e GODT, 1996a).

Os muitos estudos já desenvolvidos em diferentes grupos de plantas mostram que o conhecimento sobre os níveis de variabilidade genética são extremamente importantes para detectar os polimorfismos nas populações; encontrar genótipos únicos e prioritários para conservação; e indicar as possíveis ameaças à conservação genética, como depressão por endogamia e efeito de gargalo, especialmente em populações pequenas (ELLSTRAND e ELAM, 1993; KRAMER e HAVENS, 2009). Além disso, este tipo de análise pode revelar aspectos desconhecidos da biologia de uma espécie, como por exemplo, forma de reprodução (HAMRICK e GODT, 1996b; CHARLESWORTH, 2003) e padrões de dispersão em plantas (OURBORG, PIQUOT e VAN GROENENDAEL, 1999), sendo de grande utilidade em estudos de grupos ameaçados.

A estrutura e a diversidade genética das populações podem ser inferidas através de marcadores moleculares neutros, uma vez que estes refletem os processos evolutivos que afetam todo o genoma e podem ser usados como indicadores de variação adaptativa (LYNCH et al., 1999; HEDRICK 2001). Um dos mais utilizados e mais promissores destes marcadores são os ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeat*) (GUPTA et al., 1994). Essa técnica é baseada em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e envolve a amplificação de sequências de DNA

utilizando apenas um *primer* por reação, geralmente ancorado, composto por uma sequência SSR; duas regiões repetidas destes orientarão a amplificação do DNA em direções opostas (REDDY, SARLA e SIDDIQ, 2002). Esta reação gera padrões de banda para vários *loci* a partir de uma única reação de PCR, cobrindo uma grande parte do genoma alvo sem necessidade de conhecimento prévio das sequências de DNA (ALLENDORF, LUIKART e AITKEN, 2013; KOJIMA et al., 1998). Os *loci* são interpretados como bialélicos, onde os alelos são a presença ou ausência de bandas visualizadas em um gel por eletroforese (WOLFE e LISTON, 1998).

Os polimorfismos detectados pelos ISSRs são revelados através de diferenças na frequência e na distribuição das regiões de SSR's no genoma analisado e por variações nos sítios de anelamento de *primers* ancorados (REDDY, SARLA e SIDDIQ, 2002), mas também há a possibilidade de perda completa do sítio ou rearranjo estrutural de cromossomos. Estas alterações fazem com que os *primers* não anelem e a reação de amplificação não ocorra, causando a ausência de bandas (WOLFE e LISTON, 1998). Uma vez que a taxa de mutação dos SSRs está entre as mais altas para marcadores moleculares, a chance de polimorfismo nos ISSRs é grande, mesmo esta dependendo de que haja dois SSRs com um motivo comum orientado na fita oposta do DNA, dentro de uma distância amplificável por PCR (WOLFE, XIANG e KEPHART, 1998).

Originalmente utilizada em plantas cultivadas (FANG e ROOSE, 1997; FANG et al., 1997; ZIETKIEWICZ, RAFALSKI e LABUDA, 1994), a técnica de ISSR-PCR foi utilizada em populações naturais inicialmente por Wolfe e colaboradores, auxiliando na identificação de padrões de hibridação e fluxo gênico (WOLFE e LISTON, 1998; WOLFE, XIANG e KEPHART, 1998). Os ISSRs têm tido ampla utilização por diferenciarem rapidamente indivíduos proximamente relacionados, podendo ser aplicados com muito sucesso em estudos taxonômicos (FANG, KRUEGER e ROOSE, 1998). Além disso, quando comparados a análises de sequências de DNA de *locus* único, marcadores *multiloci* reduzem o risco de se delimitar espécies erroneamente por introgressão ou classificação de linhagem incorreta (DUMINIL e DI MICHELE, 2009; HAUSDORF e HENNIG, 2010). Marcadores ISSR são também comumente utilizados para determinar diversidade genética e estruturação populacional de plantas ameaçadas como subsídio a conservação (FAJARDO et al., 2017; GONZÁLEZ-LÓPEZ et al., 2014; HUANG, ZHANG e LI, 2009; JIMÉNEZ et al., 2017; KNOX et al., 2016; LU, YORKSON e MORDEN, 2016; NARZARY, RANA e RANADE, 2010; NUNES et al., 2017), bem como para avaliação de vigor e adaptação local (SILVA et al., 2014; WANG et al., 2016).

Modelagem de nicho ecológico

No campo da conservação, a modelagem de nicho ecológico tornou-se nos últimos anos uma importante ferramenta. Por meio desta têm-se abordado várias questões relacionadas principalmente a planos de conservação, quando informações de campo são escassas (GUISAN e THUILLER, 2005). Entre as muitas aplicações da técnica estão: quantificação de nicho ecológico (KUMAR e STOHLGREN, 2009; YANG et al., 2013); avaliação de efeitos de impacto climático (TÉLLEZ-VALDÉS e DÁVILA-ARANDA, 2003; PEARSON e DAWSON, 2003); predição do potencial invasor de espécies (PETERSON e VIEGLAIS, 2001) e ocorrência de espécies raras (PEARSON et al., 2007; GUISAN et al., 2006) e avaliação do *status* de conservação das espécies (PAPEŞ e GUAUBERT, 2007; PENA et al., 2014).

A premissa central da modelagem é que a distribuição conhecida de uma espécie fornece informações úteis sobre seus requisitos ambientais, e desta forma, regiões geográficas que apresentem ambiente similar àquele onde as espécies já foram observadas podem então ser localizadas (PEARSON e DAWSON, 2003). De acordo com Soberón (2007), os preditores ambientais utilizados na construção de modelos de nicho podem envolver diferentes condições e recursos. Estas duas classes de variáveis podem ser relacionadas aos conceitos clássicos de nicho ecológico de Grinnell (1917) e Elton (1927), respectivamente. O conceito de Grinnell se refere especialmente às condições ecológicas não interativas requeridas para a manutenção de uma população numa determinada área (ex. variáveis climáticas), assemelhando-se ao conceito de nicho fundamental (NF) de Hutchinson (1957). Por outro lado, o conceito de Elton foca em interações bióticas com outras espécies e na dinâmica do consumo de recursos (nicho realizado. NR) (PETERSON et al., 2011; SOBERÓN, 2007). Ambos os conceitos são importantes e complementares para o entendimento da distribuição geográfica das espécies, que envolve além destas, variáveis relacionadas à capacidade evolutiva e de movimentação e/ou dispersão das espécies (SOBERÓN e PETERSON, 2005).

Enquanto dados para variáveis relacionadas ao conceito de nicho “Grinnelliano” estão largamente disponíveis para modelagem ecológica na atualidade (ex. temperatura; precipitação; topografia; etc.), características de nicho “Eltoniano” permanecem difíceis de mensurar remotamente, demandando um enorme esforço em campo e um conhecimento prévio de seus parâmetros iniciais. Além disso, tais interações podem ser tão complexas que torna-se impossível defini-las operacionalmente (SOBERÓN, 2007). Assim, a menos que a sobreposição total de NF, NR e capacidade de dispersão seja característica da espécie

estudada, a grande maioria dos modelos de distribuição de espécies estimam apenas o NF, ou nicho Grinnelliano (SOBERÓN e PETERSON, 2005), desta forma, em trabalhos de modelagem ecológica, ao invés de usar-se o termo “modelo de distribuição de espécies”, opta-se o uso do termo *Environmental Niche Modeling* (ENM), “modelo de nicho ambiental”, em tradução livre. Diante disto, os resultados de uma modelagem ecológica devem ser interpretados cuidadosamente, não devendo ser tomados como inequívocos, pois há fatores que não podem ser considerados no modelo e que fazem com que a espécie raramente esteja presente em todos os sítios que apresentem condições climáticas favoráveis (PEARSON et al., 2007).

Para se garantir um ENM robusto, há um processo a ser seguido, constituído por seis passos, segundo Guisan e Zimmermann (2000): conceitualização; preparação dos dados; ajuste do modelo; avaliação do modelo; predições espaciais e avaliação da aplicabilidade do modelo. Atenção especial deve ser dada à primeira fase, onde será definido o objetivo da construção do ENM, e, portanto é quando será definida a escala espaço-temporal e a resolução geográfica do estudo, bem como serão selecionadas as variáveis ambientais pertinentes à espécie alvo. Para as variáveis ambientais selecionadas, deve-se evitar a multicolinearidade que pode ocorrer se o ENM for construído utilizando-se preditores altamente correlacionados. Estes preditores devem ser removidos (ELITH e LEATHWICK, 2009), dando preferência àqueles que apresentam maior significado biológico para a espécie alvo (GUISAN e THUILLER, 2005). A área de estudo, comumente denominada “*background*” por pesquisadores da área, deve ser definida biogeograficamente, evitando-se utilizar circunscrições políticas, devendo esta refletir o atual conhecimento de distribuição da espécie (ELITH et al., 2011; SOBERÓN, 2007)

Para a construção do modelo, normalmente é utilizada uma tabela de presença e ausência da espécie numa área potencial. Há várias bases de dados *online* que disponibilizam dados de pontos de ocorrência georeferenciados para diversas espécies (ex. *SpeciesLink*). Porém é importante utilizar apenas dados de origem confiável [ex. espécie determinada pelo especialista; dados geográficos obtidos por sistema *Global Position System* (GPS)]. Para um ponto de ausência ser validado, são necessárias amostragens excessivas, a menos que a espécie em estudo possa ser facilmente observada em apenas uma amostragem (ANDERSON, LEW e PETERSON, 2003). Portanto, para espécies raras, com dados de localização escassos ou de difícil observação, pouco provavelmente o pesquisador irá dispor de dados de ausência. Em casos como este, o problema pode ser contornado com o uso de

métodos que utilizam pseudoausências aleatorizadas na área de estudo (GUISAN e ZIMMERMANN, 2000; PEARSON et al., 2007).

Um exemplo bem conhecido de modelo deste perfil de apenas-presença é a abordagem de envelopes climáticos implementada no pacote BIOCLIM (NIX, 1986). Este foi o primeiro modelo de distribuição de espécies, disponível para uso científico desde 1984, e o qual permanece em uso com sucesso até os dias atuais. O pacote foi utilizado para criar base de dados WorldClim (HIJMANS et al., 2005), que é a base de dados climáticos mais utilizada para estudos de modelagem de distribuição de espécies (BOOTH et al., 2014). WorldClim contém dados de temperatura e precipitação para todo o planeta, excluindo a Antártica, contendo atualmente 19 índices bioclimáticos que foram calculados a partir de dados compilados de diversas estações meteorológicas. O banco de dados consiste em registros de estações de 47.554 diferentes localidades para precipitação, de 24.542 localidades para temperatura média, e de 14.835 localidades para temperatura mínima e máxima, abrangendo o período entre 1950-2000 (HIJMANS et al., 2005). Além disso, WorldClim conta com dados paleoclimáticos e projeções para o futuro do *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC). Estes dados estão disponíveis para download na forma de superfícies climáticas em <http://www.worldclim.org>.

Justificativa e objetivo do trabalho

Pela importância científica de *Anomochloa marantoidea* e pelas ameaças estocásticas e/ou antropológicas e provavelmente genéticas que esta vem passando e que podem rapidamente levar a sua extinção, fica clara a necessidade de investimento na aplicação de métodos que busquem entender os efeitos destas forças sobre sua diversidade genética, assim como ampliar o conhecimento sobre questões ecológicas relacionadas ao seu ambiente de ocorrência.

A presente dissertação teve como objetivos identificar o nicho climático, bem como o potencial de ocorrência, e analisar os níveis de variabilidade e estruturação genética dessa espécie, por meio de modelagem de nicho ecológico e marcadores moleculares. A partir destas informações foram sugeridas medidas de conservação para a espécie, visando garantir a conservação desse importante patrimônio genético.

REFERÊNCIAS

- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. e AITKEN, S. N. **Conservation and the genetics of populations**. 2. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2013.
- ANDERSON, R. P.; LEW, D. e PETERSON, A. T. Evaluating predictive models of species' distributions: criteria for selecting optimal models . **Ecological Modelling**, v. 162, n. 3, p. 211 - 232, doi:[https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(02\)00349-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(02)00349-6), 2003.
- BOOTH, T. H. et al. BIOCLIM: the first species distribution modelling package, its early applications and relevance to most current MaxEnt studies. **Diversity and Distributions**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2014.
- BOUCHENAK-KHELLADI, Y. et al. Biogeography of the grasses (Poaceae): a phylogenetic approach to reveal evolutionary history in geographical space and geological time. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 162, n. 4, p. 543-557, 2010.
- BRASIL. Decreto nº 6.660, de 21 de novembro de 2008. Regulamenta dispositivos da Lei nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006, que dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica. **Diário Oficial da União**, 2008.
- BREMER, K. e BAUM, D. Gondwanan evolution of the grass alliance of families (Poales). **Evolution**, v. 56, n. 7, p. 1374-1387, doi:10.1554/0014-3820(2002)056[1374:GEOTGA]2.0.CO;2, 2002.
- BRONGNIART, A. Description d'un nouveau genre de Graminées du Brésil. **Annales des Sciences Naturelles, Botanique (Paris)**, 3. v. 16, p. 368-372, 1851.
- BURKE, S. V. et al. Phylogenomics and Plastome Evolution of Tropical Forest Grasses (*Leptaspis*, *Streptochaeta*: Poaceae). **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1993, doi:10.3389/fpls.2016.01993, 2016.
- CHARLESWORTH, D. Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 358, n. 1434, p. 1051-70, 2003.
- CLARK, L. G.; ZHANG, W. e WENDEL, J. F. A phylogeny of the grass family (Poaceae) based on *ndhF* sequence data. **Systematic Botany**, v. 20, n. 4, p. 436-460, 1995.
- DUMINIL, J. e DI MICHELE, M. Plant species delimitation: a comparison of morphological and molecular markers. **Plant Biosystems**, v. 143, n. 3, p. 528-542, 2009.
- DUVALL, M. R. e MORTON, B. R. Molecular Phylogenetics of Poaceae: An Expanded Analysis of *rbcl* Sequence Data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 5, n. 2, p. 352-358, doi:<http://dx.doi.org/10.1006/mpev.1996.0030>, 1996.
- ELITH, J. et al. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. **Diversity and Distributions**, v. 17, n. 1, p. 43-57, doi:10.1111/j.1472-4642.2010.00725.x, 2011.

ELITH, J. e LEATHWICK, J. The contribution of species distribution modelling to conservation prioritization. In: **Spatial Conservation Prioritization: Quantitative Methods & Computational Tools**. Oxford, UK: Oxford University Press, p. 70-93, 2009.

ELLSTRAND, N. C. e ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual review of Ecology and Systematics**, p. 217-242, 1993.

ELTON, C. S. **Animal Ecology**. London: Sedgwick and Jackson, 1927.

ESPELAND, E. K. e EMAM, T. M. The value of structuring rarity: the seven types and links to reproductive ecology. **Biodiversity and conservation**, v. 20, n. 5, p. 963-985, 2011.

FAJARDO, C. G. et al. Negligence in the Atlantic forest, northern Brazil: a case study of an endangered orchid. **Biodiversity and Conservation**, v. 26, n. 5, p. 1047-1063, 2017.

FANG, D. e ROOSE, M. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, n. 3, p. 408-417, 1997.

FANG, D.; KRUEGER, R. R. e ROOSE, M. L. Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 123, n. 4, p. 612-617, 1998.

FANG, D. et al. Fingerprinting trifoliolate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, n. 1, p. 211-219, 1997.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. Relatório Anual de Atividades – Edição 2015. **Fundação SOS Mata Atlântica**, 2015.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA e INPE. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2014–2015. **Fundação SOS Mata Atlântica e INPE**, São Paulo, 2016.

FRANKHAM, R. Conservation genetics. **Annual review of genetics**, v. 29, n. 1, p. 305-327, 1995.

FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A. e BALLOU, J. D. **Introduction to conservation genetics**. [S.l.]: Cambridge University Press, 2002.

GALINDO-LEAL, C. e CÂMARA, I. G. Atlantic Forest Hotspot Status: An Overview. In: CARLOS GALINDO-LEAL; IBSEN DE GUSMÃO CÂMARA (Eds.). **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Washington: Island Press, p. 3–11, 2003.

GAUT, B. S. et al. Patterns of genetic diversification within the *Adh* gene family in the grasses (Poaceae). **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 8, p. 1086, doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026198, 1999.

GOERCK, J. M. Patterns of rarity in the birds of the Atlantic forest of Brazil. **Conservation Biology**, v. 11, n. 1, p. 112–118, 1997.

GONZÁLEZ-LÓPEZ, O. et al. Genetic variation of the endangered *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca* (Gentianaceae) in populations from the Northwest Iberian Peninsula. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 6, p. 10052-10066, 2014.

GRASS PHYLOGENY WORKING GROUP (GPWG). Phylogeny and Subfamilial Classification of the Grasses (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 88, n. 3, p. 373–457, 2001.

GRASS PHYLOGENY WORKING GROUP II (GPWG II). New grass phylogeny resolves deep evolutionary relationships and discovers C4 origins. **New Phytologist**, v. 193, n. 2, p. 304–312, doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03972.x, 2012.

GRINNELL, J. The niche-relationships of the California Thrasher. **The Auk**, v. 34, n. 4, p. 427-433, 1917.

GUISAN, A. e ZIMMERMANN, N. E. Predictive habitat distribution models in ecology. **Ecological Modelling**, v. 135, n. 2-3, p. 147-186, doi:10.1016/S0304-3800(00)00354-9, 2000.

GUISAN, A. e THUILLER, W. Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. **Ecology Letters**, v. 8, n. 9, p. 993-1009, doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00792.x, 2005.

GUISAN, A. et al. Using niche-based models to improve the sampling of rare species. **Conservation Biology**, v. 20, n. 2, p. 501-11, 2006.

GUPTA, M. et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik**, v. 89, n. 7-8, p. 998-1006, doi:10.1007/BF00224530, 1994.

HAMRICK, J. L. e GODT, M. J. W. Conservation Genetics of Endemic Plant Species. In: **Conservation Genetics: Case Histories from Nature**. [S.l.]: Springer US, p. 281-304, 1996a.

HAMRICK, J. L. e GODT, M. J. W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 351, n. 1345, p. 1291-1298, 1996b.

HAUSDORF, B. e HENNIG, C. Species Delimitation Using Dominant and Codominant Multilocus Markers. **Systematic Biology**, v. 59, n. 5, p. 491, doi:10.1093/sysbio/syq039, 2010.

HEADS, M. Globally basal centres of endemism: the Tasman-Coral Sea region (south-west Pacific), Latin America and Madagascar/South Africa. **Biological Journal of the Linnean Society**, v 96, n 1, p 222–245, doi:10.1111/j.1095-8312.2008.01118.x, 2009.

HEDRICK, P. W. Conservation genetics: where are we now? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 11, p. 629-636, 2001.

HIJMANS, R. J. et al. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **International journal of climatology**, v. 25, n. 15, p. 1965-1978, 2005.

HUANG, Y.; ZHANG, C.-Q. e LI, D.-Z. Low genetic diversity and high genetic differentiation in the critically endangered *Omphalogramma souliei* (Primulaceae): implications for its conservation. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 47, n. 2, p. 103-109, 2009.

HUTCHINSON, G. E. Concluding Remarks. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 22, p. 415-427, doi:10.1101/SQB.1957.022.01.039, 1957.

IUCN (INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES); UNEP (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME) e WWF (WORLD WILDLIFE FUND). **World conservation strategy: living resource conservation for sustainable development**. [S.l.]: Gland, Switzerland: IUCN, 1980.

JIMÉNEZ, J. F. et al. Genetic diversity of *Narcissus tortifolius*, an endangered endemic species from Southeastern Spain. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 151, n. 1, p. 117-125, 2017.

JUDZIEWICZ, E. J. e CLARK, L. G. Classification and biogeography of new world grasses: Anomochloideae, Pharoideae, Ehrhartoideae, and Bambusoideae. **Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany**, v. 23, n. 1, p. 303-314, 2007.

JUDZIEWICZ, E. J. e SODERSTROM, T. R. Morphological, anatomical, and taxonomic studies in *Anomochloa* and *Streptochaeta* (Poaceae: Bambusoideae). **Smithsonian Contributions to Botany**, n. 68, p. 1-52, 1989.

JUDZIEWICZ, E. J. et al. **American bamboos**. [S.l.]: Smithsonian Institution Press, 1999.

KNOX, J. S. et al. Genetic Diversity and Population Structure of the Endemic Disjunct Species, *Helenium virginicum* (Asteraceae). **The American Midland Naturalist**, v. 175, n. 2, p. 242-260, 2016.

KELLOGG, E. A. Evolutionary History of the Grasses. **Plant Physiology**, v. 125, n. 3, p. 1198-1205, doi:10.1104/pp.125.3.1198, 2001.

KOJIMA, T. et al. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, n. 1, p. 37-45, doi:10.1007/s001220050706, 1998.

KRAMER, A. T. e HAVENS, K. Plant conservation genetics in a changing world. **Trends in plant science**, v. 14, n. 11, p. 599-607, 2009.

- KUMAR S. e STOHLGREN T.J. Maxent modeling for predicting suitable habitat for threatened and endangered tree *Canacomyrica monticola* in New Caledonia. **Journal of Ecology and the Natural Environment**, v. 33, n. 4, p. 094–098, 2009.
- KUNIN, W. E. e GASTON, K. J. The biology of rarity: patterns, causes and consequences. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 8, n. 8, p. 298-301, 1993.
- LINDER, H. Peter e RUDALL, Paula J. Evolutionary history of Poales. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 36, p. 107-124, 2005.
- LU, P.-L.; YORKSON, M. e MORDEN, C. W. Population Genetics of the Endemic Hawaiian Species *Chrysodracon hawaiiensis* and *Chrysodracon auwahiensis* (Asparagaceae): Insights from RAPD and ISSR Variation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1341, 2016.
- LYNCH, M. et al. The quantitative and molecular genetic architecture of a subdivided species. **Evolution**, v.53, n.1, p. 100-110, 1999.
- MASON-GAMER, R. J.; WEIL, C. F. e KELLOGG, E. A. Granule-bound starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 12, p. 1658, doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025893, 1998.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.
- NARZARY, D.; RANA, T. S. e RANADE, S. A. Genetic diversity in inter-simple sequence repeat profiles across natural populations of Indian pomegranate (*Punica granatum* L.). **Plant biology (Stuttgart, Germany)**, v. 12, n. 5, p. 806-13, doi:10.1111/j.1438-8677.2009.00273.x, 2010.
- NIX, H. A. A biogeographic analysis of Australian elapid snakes. In: **Atlas of elapid snakes of Australia**. [S.l: s.n.], v. 7, p. 4-15, 1986.
- NUNES, C. et al. *Myrciaria dubia*, an Amazonian fruit: population structure and its implications for germplasm conservation and genetic improvement. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 16, n. 1, 2017.
- OUBORG, N.; PIQUOT, Y. e VAN GROENENDAEL, J.. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, v. 87, n. 4, p. 551-568, 1999.
- PAPeŞ, M. e GAUBERT, P. Modelling ecological niches from low numbers of occurrences: assessment of the conservation status of poorly known viverrids (Mammalia, Carnivora) across two continents. **Diversity and Distributions**, v. 13, n. 6, p. 890-902, 2007.
- PEARSON, R. G. e DAWSON, T. P. Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful? **Global Ecology and Biogeography**, v. 12, n. 5, p. 361-371, 2003.

PEARSON, R. G. et al. Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. **Journal of biogeography**, v. 34, n. 1, p. 102-117, 2007.

PENA, J. C. de C. et al. Assessing the conservation status of species with limited available data and disjunct distribution. **Biological Conservation**, v. 170, p. 130 - 136, doi:http://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.12.015, 2014.

PETERSON, A. T. et al. **Ecological niches and geographic distributions**. [S.l.]: Princeton University Press, 2011.

PETERSON, A. T. e VIEGLAIS, D. A. Predicting Species Invasions Using Ecological Niche Modeling: New Approaches from Bioinformatics Attack a Pressing Problem. **BioScience**, v. 51, n. 5, p. 363, doi:10.1641/0006-3568(2001)051[0363:PSIUEN]2.0.CO;2, 2001.

PINTO, L.P. et al. Vivem na Mata Atlântica. In: SCARANO, F.R.; SANTOS, I.L.; MARTINS, A.C.I.; SILVA, J.M.C.; GUIMARÃES, A.L. & MITTERMEIER, R.A. (Eds.). **Biomass brasileiros: retratos de um país plural**. Rio de Janeiro: Casa da Palavra, p 16–55, 2012.

PRASAD, V. et al. Late Cretaceous origin of the rice tribe provides evidence for early diversification in Poaceae. **Nature Communications**, v. 2, p. 480, 2011.

RABINOWITZ, D. Seven forms of rarity. In: HUGH SYNGE (Ed.). **The Biological Aspects of Rare Plant Conservation**. Chichester, United Kingdom: Wiley, p. 205–217, 1981.

RAMBALDI, D.M. e OLIVEIRA, D.A.S. **Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2003.

RAVEN, P. H. e AXELROD, D. I. Angiosperm Biogeography and Past Continental Movements. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 61, n. 3, p. 539-673, 1974.

REDDY, P. M.; SARLA, N. e SIDDIQ, E. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002.

SAJO, M. G.; LONGHI-WAGNER, H. M. e RUDALL, P. J. Reproductive morphology of the early-divergent grass *Streptochaeta* and its bearing on the homologies of the grass spikelet. **Plant Systematics and Evolution**, v. 275, n. 3, p. 245, doi:10.1007/s00606-008-0080-5, 2008.

SAJO, M. G. et al. Homologies of the flower and inflorescence in the early-divergent grass *Anomochloa* (Poaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, n. 4, p. 614–628, 2012.

SILVA, C. A. et al. Reproductive success and genetic diversity of *Psychotria hastisepala* (Rubiaceae), in fragmented Atlantic forest, Southeastern Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 62, n. 1, p. 369-380, 2014.

SILVA, J. M. C. Da. e CASTELETI, C. H. M. Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. In: CARLOS GALINDO-LEAL; IBSEN DE GUSMÃO CÂMARA (Eds.). **Mata**

Atlântica: Biodiversidade, ameaças e perspectivas. Tradução Edna Reis Lama. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, p. 43–59, 2005.

SILVA, J. M. C. Da. e TABARELLI, M. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic forest of northeast Brazil. **Nature**, v. 404, n. 6773, p. 72–74, doi:10.1038/35003563, 2000.

SOBERÓN, J. Grinnellian and Eltonian niches and geographic distributions of species. **Ecology Letters**, v. 10, n. 12, p. 1115-23, 2007.

SOBERÓN, J. e PETERSON, A. T. Interpretation of models of fundamental ecological niches and species' distributional areas. **Biodiversity Informatics**, v. 2, p. 1-10, 2005.

SODERSTROM, T. R.; JUDZIEWICZ, E. J. e CLARK, L. G. Distribution patterns of neotropical bamboos. (Vanzolini, P. E. e Heyer, W. R., Eds.) In: PROCEEDINGS OF A WORKSHOP ON NEOTROPICAL DISTRIBUTION PATTERNS. **Anais...** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988.

SORENG, R. J. et al. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). **Journal of Systematics and Evolution**, v. 53, n. 2, p. 117-137, 2015.

TABARELLI, M. et al. Espécies ameaçadas e planejamento da conservação. In: CARLOS GALINDO-LEAL; IBSEN DE GUSMÃO CÂMARA (Eds.). **Mata Atlântica: Biodiversidade, ameaças e perspectivas.** Tradução Edna Reis Lama. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 2005. p. 86–94.

TÉLLEZ-VALDÉS, O. e DÁVILA-ARANDA, P. Protected Areas and Climate Change: a Case Study of the Cacti in the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve, México. **Conservation Biology**, v. 17, n. 3, p. 846-853, 2003.

THOMAS, W. W. Survival of the rarest. **Natural History**, v. 116, n. 5, p. 24-27, 2007.

THOMAS, W. W. et al. Plant endemism in two forests in southern Bahia, Brazil. **Biodiversity & Conservation**, v. 7, n. 3, p. 311–322, 1998.

WANG, T. et al. Local adaptation to temperature and precipitation in naturally fragmented populations of *Cephalotaxus oliveri*, an endangered conifer endemic to China. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

WOLFE, A. D. e LISTON, A. Contributions of PCR-Based Methods to Plant Systematics and Evolutionary Biology. In: **Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing.** Boston, MA: Springer US, p. 43-86, 1998.

WOLFE, A. D.; XIANG, Q. e KEPHART, S. R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 9, p. 1107-1125, 1998.

YANG, X. et al. Maxent modeling for predicting the potential distribution of medicinal plant, *Justicia adhatoda* L. in Lesser Himalayan foothills. **Ecological Engineering**, v. 51, p. 83-87, 2013.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A. e LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.

CAPÍTULO 1

Modelagem de nicho ecológico e implicações para a conservação de *Anomochloa marantoidea* Brongn. (Poaceae), a mais antiga das gramíneas, endêmica da Mata Atlântica, Brasil

**Modelagem de nicho ecológico e implicações para a conservação de
Anomochloa marantoidea Brongn. (Poaceae), a mais antiga das gramíneas,
endêmica da Mata Atlântica, Brasil**

João Paulo Silva Vieira^{1*}, Alessandra S. Schnadelbach^{1,2}, Frederic Mendes Hughes¹, Jomar
G. Jardim², Lynn G. Clark³, Reyjane Patrícia de Oliveira¹

¹Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de
Feira de Santana, Avenida Transnordestina, Feira de Santana, Bahia, 44031-460, Brasil

²Universidade Federal do Sul da Bahia, Rodovia de Acesso para Itabuna, km 39, Itabuna,
Bahia, 45613-204, Brasil

³ Dept. of Ecology, Evolution and Organismal Biology, 251 Bessey Hall, Iowa State
University, Ames, Iowa, U.S.A.

*Autor para correspondência. E-mail: jpsilva@uefs.br; Tel: +55 75 99107-7725

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico– processos 484381/2010-5, 562349/2010-3, 563558/2010-5 e 401526/2014-3) e FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – processo PNX0014/2009) pelo apoio financeiro para viagens de campo para coleta e para trabalhos laboratoriais. Também agradecemos Iasmin Oliveira, Marcos Dórea, José Paixão, Jamile Lima, Maria LS Carvalho e pelo povo da aldeia indígena Tupinambá de Olivença pelo auxílio nas coletas. RPO também agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (PQ1D).

Esse manuscrito será submetido à Revista “Biodiversity and Conservation”

RESUMO

Desde as primeiras filogenias moleculares envolvendo as gramíneas (Poaceae) o gênero monotípico *Anomochloa* Brongn. despontou como a mais antiga linhagem vivente da família. Por esse motivo, seu único representante, *A. marantoidea* Brongn. tem sido considerado uma espécie crucial para o entendimento dos padrões de evolução e diversificação nesse grupo. *Anomochloa marantoidea* é extremamente rara, endêmica do Brasil, conhecida somente da Mata Atlântica do sul do Estado da Bahia. Apesar de descrita no século XIX, apenas duas populações foram registradas até o momento. Poucos aspectos sobre sua ecologia e biologia reprodutiva são conhecidos, o que torna difícil a tomada de medidas que possam ajudar a preservar este importante patrimônio genético. No presente trabalho, duas variáveis topográficas, seis bioclimáticas e uma vegetacional foram utilizadas para modelar a distribuição potencial de *A. marantoidea*, para testar a hipótese de conservação de nicho e verificar suas possíveis exigências ambientais. Um modelo preditivo também foi construído para guiar esforço de coleta. Duas novas populações foram localizadas, e três destas, bem como boa parte do nicho ecológico estão compreendidos numa área de reserva indígena proposta, que já deveria ter sido reconhecida pelo governo do Brasil desde 2009. O nicho ecológico não divergiu da distribuição esperada, confirmando a conservação de nicho e indicando uma alta restrição climática, reafirmando a raridade da espécie. O índice de cobertura vegetal e a precipitação são os principais requisitos ambientais que influenciam sua restrita distribuição. Menos da metade dos sítios adequados para ocorrência da espécie encontra-se em áreas protegidas, mas nestas pode ser realizado esforço de coleta para localizar prováveis populações desconhecidas e/ou podem ser utilizadas para o estabelecimento de novas populações.

Palavras-chave: espécie ameaçada, MaxEnt, ENM, espécie rara, estado da Bahia, modelagem preditiva de espécies

1.1 Introdução

O gênero monotípico *Anomochloa* Brongn., que inclui apenas *A. marantoidea* Brongn., representa a mais antiga linhagem existente da importante família das gramíneas (Poaceae) (Clark et al. 1995; Duvall e Morton 1996; Mason-Gamer et al. 1998; Gaut et al. 1999; Kellogg 2000; Bremer e Baum 2002; Bouchenak-Khelladi et al. 2010; Prasad et al. 2011; Burke et al. 2016), sendo considerada uma das espécies mais raras do mundo (Soderstrom 1984; Thomas 2007). Os indivíduos são ervas perenes, cespitosas, podendo chegar até 1 m de altura em ambiente natural (Figura 1 A, B); apresentam entre 4-7 folhas longas e largas por colmo, se assemelhando aos representantes da família Marantaceae (daí seu epíteto específico) (Judziewicz et al. 1999) (Figura 1 C). *Anomochloa marantoidea* possui inflorescências não homólogas (ou o estabelecimento de homologias é difícil) às espiguetas características da família (Figura 1 D), uma vez que não apresenta lodículas nem palea ou lema (GPWG 2001; Kellogg 2001; Sajo et al. 2008; Sajo et al. 2012).

A divergência de *Anomochloa* é estimada entre 69-70 ma (Burke et al. 2016). A espécie que o representa é essencial em análises evolutivas dentro da família das gramíneas, uma vez que o estudo de linhagens antigas (ex. morfológico, fisiológico, ecológico) é de extrema importância para compreender a evolução do grupo ao qual pertencem (Allendorf e Luikart 2009). Uma forma de quantificar a diversidade genética dentro de um grupo monofilético é através dos comprimentos de ramos de uma filogenia molecular, uma vez que estes representam a quantidade de mutações (Vézquez and Gittleman 1998). Desta forma, linhagens monotípicas antigas (ramos longos), como *Anomochloa*, contribuem fortemente para a diversidade dos grupos a que pertencem, sendo portanto, prioritárias para a conservação. (Krajewski 1991; Allendorf and Luikart 2009)

Este é justamente o caso de *Anomochloa marantoidea*, que é uma das espécies de Poaceae endêmicas da Mata Atlântica do sul do estado da Bahia (Judziewicz et al. 1999). Esta

região apresenta alto grau de endemismo, principalmente para gramíneas (Soderstrom et al. 1988; Thomas et al. 1998; Silva e Casteleti 2005). De acordo com Clark (1990), esta área contém 48% dos gêneros de bambus herbáceos (tribo Olyreae) do Novo Mundo, sendo cinco destes gêneros endêmicos. *Anomochloa marantoidea* foi redescoberta nesta região em 1972 após mais de um século de buscas, sendo que era conhecida apenas por plantas cultivadas em estufa em Paris que foram utilizadas para descrever o gênero; sobre estes exemplares era sabido apenas que advinham do Brasil. Após alguns anos, estes espécimes eventualmente morreram, apesar dos esforços para conservação (Brongniart 1851; Soderstrom 1984; Judziewicz e Soderstrom 1989). Mesmo após a redescoberta, muitas tentativas de encontrar novas populações falharam, sendo que até hoje apenas mais uma localidade foi encontrada para a espécie (Soderstrom 1984; Judziewicz e Soderstrom 1989). A espécie ocorre no sub-bosque de florestas em encostas de morro, em elevações entre 120-200 metros, nas proximidades dos municípios de Una e São José da Vitória (Judziewicz et al. 1999) (Figura 2 A-C).

A espécie ocorre em apenas duas populações (4,2 Km de distância uma da outra), ambas constituídas por poucos indivíduos ($n < 20$), que perdem espaço principalmente para o plantio de cacau (*Theobroma cacao* L.) denominado “cabruca”, no qual creescem à sombra da floresta nativa, porém o sub-bosque é retirado (Figura 2 D) (Thomas 2007). Além disso, com o declínio da cultura do cacau no Brasil, outras atividades mais danosas ao ambiente começaram a ser desenvolvidas e a aumentar o risco de extinção de *A. marantoidea*, como o desmatamento para plantio de banana e pupunha e a pecuária (Oliveira et al. 2011). Nenhuma das populações ocorre em áreas protegidas.

Apesar das leis de proteção ambiental, a Mata Atlântica é um bioma altamente fragmentado como consequência de intenso desflorestamento (Galindo-Leal e Câmara 2003; Tabarelli et al. 2005; Fundação SOS Mata Atlântica e INPE 2016). *Anomochloa marantoidea*

foi inserida entre as espécies criticamente ameaçadas de extinção na lista do Ministério do Meio Ambiente (MMA 2008) e no Livro Vermelho da Flora do Brasil (Filgueiras et al. 2013), com base nos critérios da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN). Os principais argumentos para a tal inclusão envolvem o pequeno número de indivíduos maduros e a redução populacional que a espécie vem sofrendo (Filgueiras et al. 2013).

Os conhecimentos acerca da extensão da distribuição geográfica e dos aspectos ecológicos de uma espécie, bem como de suas áreas potenciais de ocorrência são essenciais para programas de conservação (Andelman e Willig 2002). Porém, para diversos organismos esse conhecimento é muitas vezes escasso para assegurar que uma decisão correta seja tomada (Austin 1998), principalmente quando relacionado a espécies raras ou com poucas localidades de ocorrência conhecidas (Andelman e Willig 2002; Papeş e Gaubert 2007). Em países tropicais ou em desenvolvimento, ainda é comum o desconhecimento da distribuição geográfica de várias espécies, devido principalmente à falta de esforço de coleta e de localizações precisas (Pearson et al. 2007).

A modelagem de nicho ecológico (ENM, de sua sigla em inglês) relaciona matematicamente dados de espécies — geralmente pontos de ocorrência — a variáveis ambientais preditoras para produzir um mapa de predições de habitat (Guisan e Zimmermann 2000). Inicialmente, a técnica era empregada majoritariamente em estudos com espécies com ampla distribuição geográfica (ex. Peterson e Vieglais 2001; McNyset 2005; Phillips et al. 2006), porém, a quantidade de trabalhos acerca da distribuição potencial de espécies raras ou endêmicas vem aumentando recentemente (ex. Engler et al. 2004; Bourg et al. 2005; Guisan et al. 2006; Peterson e Papeş 2006; Papeş e Gaubert 2007; Pearson et al. 2007; de Siqueira et al. 2009; Pena et al. 2014; Syfert et al. 2014; Batalha-Filho e Miyaki 2016), contribuindo principalmente para o planejamento e adoção de estratégias de conservação de espécies e/ou em locais onde os dados de amostragem são incompletos. Neste campo, as principais

aplicações da inferência de áreas potenciais de ocorrência de uma espécie são: definir áreas prioritárias para conservação; analisar o potencial de espécies invasoras; fazer projeções para o futuro, avaliando o impacto das mudanças climáticas sobre a distribuição; e uma das aplicações mais promissoras da técnica, a possibilidade de acelerar a detecção de áreas de ocorrência desconhecidas para determinado organismo ou grupo biológico (Guisan e Thuiller 2005).

Tendo em vista a importância da espécie e a grande ameaça que as poucas populações conhecidas de *Anomochloa marantoidea* enfrentam, Filgueiras e Gonçalves (2004) sugeriram a realização de estudos de modelagem de nicho ambiental como uma estratégia para direcionar esforço de coleta e melhorar seu estado de conservação. ENMs também podem ser utilizados para testar se o nicho ecológico é conservado ao longo do tempo, seja dentro de uma espécie ou num grupo de espécies relacionadas: quando há conservação de nicho, as condições climáticas estão entre os principais fatores limitantes da distribuição geográfica da espécie e o nicho predito não diverge do esperado, assim os fatores climáticos que governam esta distribuição podem ser identificados (Wiens et al. 2010).

Diferentes algoritmos de modelagem estão disponíveis, e a escolha do mais adequado para criar um modelo deve ser avaliada em cada caso, pois a escolha do algoritmo pode afetar grandemente o modelo gerado. Nos resultados de trabalhos que buscaram comparar a eficiência de diferentes algoritmos para a produção de ENMs através de diferentes metodologias, o algoritmo Maxent (Phillips et al. 2006) apresentou alto desempenho, superando métodos alternativos (Elith et al. 2006; Wisz et al. 2008). A teoria de máxima entropia utilizada no programa tem como pressuposto que, baseando-se em informações incompletas, a inferência mais razoável sobre uma distribuição de probabilidades desconhecidas deve ser a inferência mais aleatória que corresponda à “toda informação conhecida” (Jaynes 1957). Para construções de ENMs, esta teoria é aplicada de forma a

minimizar a entropia relativa entre densidades de probabilidades; uma definida pelos dados de presença e outra definida pela área geográfica do estudo (Elith et al. 2011). O MaxEnt também se mostrou extremamente útil para casos em que o número de pontos de ocorrência é pequeno, mesmo com menos de cinco observações, também obtendo melhor desempenho em comparação a outros métodos (Papeş e Gaubert 2007; Pearson et al. 2007) se mostrando também eficiente em localizar novas ocorrências de espécies raras de plantas (Williams et al. 2009).

O objetivo deste trabalho foi utilizar ENMs produzidos pelo MaxEnt como estratégia para direcionar esforço de coleta e para testar conservação de nicho de *Anomochloa marantoidea*, identificando possíveis fatores e condições climáticas que possam limitar a sua distribuição; bem como inferir a localização de sítios mais adequados climaticamente. Tais conhecimentos podem possibilitar a avaliação do nível de conservação atual da espécie, bem como a indicação de novas áreas prioritárias para reintrodução (Guisan e Thuiller 2005).

1.2 Materiais e Métodos

1.2.1 Área de estudo e coleta de dados

As áreas de mata higrófila do Sul Baiano apresentam clima quente e úmido, não apresentando uma estação seca distinta, e onde as temperaturas médias anuais variam de 24 a 25°C e com 1200-1800mm de precipitação média anual (Mori et al. 1983). A área onde *Anomochloa marantoidea* ocorre está na subdivisão da Mata Atlântica denominada Floresta Ombrófila Densa (FOD), caracterizada por temperatura média de 25°C e elevada precipitação, praticamente sem período de seca; a vegetação é composta de macro e mesofanerófitos, lianas lenhosas e epífitas (IBGE 2006).

Para testar conservação de nicho da espécie e identificar áreas onde a espécie pode persistir, busca-se identificar áreas com habitat adequado, mas não necessariamente ocupado

(Merow et al. 2013), para tal foi modelada toda a região de Floresta Ombrófila Densa (FOD), usando como máscara o Mapa da Área de Aplicação da Lei nº 11.428, de 2006 (IBGE 2006) (Figura 3). A área é composta por aproximadamente 130.000 *pixels* de 1 km² cada. Para a criação do modelo de nicho ecológico para guiar esforço de coleta selecionou-se uma área geográfica (*background*) que reduza os efeitos da dispersão da espécie (Soberón 2007; Elith et al. 2011; Merow et al. 2013), para tal foi modelada apenas as áreas da FOD adjacentes aos registros de ocorrência de *Anomochloa marantoidea*, representado uma porção relativamente mais reduzida de gradientes ecológicos quando comparada a toda a FOD.

No início do presente estudo, apenas duas populações naturais eram conhecidas para a espécie. A “população original” descoberta por Calderón e colaboradores no ano de 1976 está localizada no km 5 da rodovia BA-669 sentido São José da Vitória – Una (km5), a segunda população se encontra 4,2 km distante da primeira, no mesmo sentido da rodovia por Emmet e colaboradores (km15). Para garantir a precisão das informações, ao invés de usar coordenadas geográficas disponíveis em bancos de dados como *speciesLink* e *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF), estes registros foram analisados, excluindo dados de coletas antigas, duplicadas ou com coordenadas imprecisas (ex. coordenada central no município de Una). Os pontos geográficos restantes foram utilizados apenas para auxiliar a localizar as populações de *Anomochloa marantoidea in situ* e, com utilização de aparelho de GPS portátil (Garmin), obterem-se dados mais precisos e confiáveis. Também foi realizado esforço de coleta em fragmentos de Mata Atlântica próximos às populações conhecidas. Informações sobre as populações estão na Tabela 1.

1.2.2 Construção do modelo preditivo

A partir da base de dados WorldClim (Hijmans et al. 2005) foram obtidos 19 arquivos de camadas ambientais *raster* do pacote BIOCLIM (Nix 1986) e mais uma variável

topográfica, usando a maior resolução disponível, 30 *arc-seconds* (~1 km), caracterizando as condições bioclimáticas atuais. As camadas bioclimáticas estão relacionadas aos tratos temperatura e precipitação. Adicionalmente, uma variável vegetal (porcentagem de cobertura arbórea) e uma topográfica (declividade; *Slope*) da base de dados NASA-MODIS (National Aeronautics and Space Administration; MODerate-resolution Imaging Spectroradiometer) foram obtidas do Ambdata (Amaral et al. 2013), totalizando 22 variáveis. Ambdata é uma base de dados do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), disponível em: www.dpi.inpe.br/Ambdata.

Foi feito um recorte das camadas ambientais, que apresentam informações de todo o globo, para representar apenas a área de estudo. A extração foi feita com auxílio da ferramenta *Extract by Mask* no aplicativo ArcMap 10.3 da plataforma ArcGis (ESRI, Redlands, California). No programa ENMTools (Warren et al. 2010), foi feita uma análise de correlação entre as 22 variáveis disponíveis, a fim de verificar se uma ou mais camadas apresentavam a mesma informação para a área de estudo selecionada. Foram mantidas para criação do modelo apenas uma das variáveis de cada conjunto que apresentaram entre si correlação igual ou superior a 80% (correlação de Pearson), para selecionar variáveis que forneçam maior poder preditivo ao modelo. A seleção de variáveis que permaneceram foi feita levando em consideração o conhecimento ecológico disponível sobre *Anomochloa marantoidea* e demais gramíneas de mata fechada (Elith e Leathwick 2009).

Para construção do modelo, foi utilizado o Maxent versão 3.3.3 (Phillips e Dudík 2008). Como poucos registros de ocorrência estão disponíveis para a espécie ($n < 10$), foi utilizado método de reamostragem *cross-validation* (Pearson et al. 2007). Valores padrões recomendados para o programa foram mantidos: número máximo de iterações de 500 e limiar de convergência (*convergence threshold*) de 10^{-5} . Foram calculadas curvas de resposta para as variáveis e as contribuições para o modelo para cada variável ambiental incluída.

A fim de obter-se um modelo mais permissivo apropriado para objetivos de identificação de áreas desconhecidas para a espécie, foi aplicado um limite fixo que rejeita 10% dos menores valores preditos (T10), como indicado por Pearson et al. (2007). A natureza contínua dos valores de adequabilidade para cada célula foi mantido, evitando que a informação de quais são os “sítios mais prováveis” fosse perdida.

Este mapa de adequabilidade foi exportado em formato KMZ (*Keyhole Markup language Zipped*) usando ArcMap 10.3, para ser visualizado no Google Earth (Google, Mountain View, California), buscando localizar e visualizar as reais condições de habitat para cada sítio. Visitas foram realizadas aos sítios que apresentaram maior adequabilidade de habitat. Assim que localizado qualquer registro novo por meio de coletas em campo, um novo ENM seria construído, utilizando estes novos pontos geográficos, como indicado por Guisan et al. (2006). Amostras de populações foram enviadas aos herbários HUEFS e CEPEC (sigla segundo Thiers 2017).

1.2.3 Teste de conservação de nicho e status de conservação da espécie

Uma vez que se conseguiu um maior conhecimento da real distribuição geográfica da espécie por meio de novos registros de ocorrência, buscou-se construir uma representação mais restritiva e descrever o nicho fundamental (NF) da espécie. Para tal, foram adicionados os novos registros e um novo ENM foi construído. A construção do modelo se deu semelhante ao descrito no item acima, exceto pela seleção das variáveis preditoras (uma vez que se usou um diferente *background*) e do *threshold* e, que nesse caso, diferentemente de se utilizar um fixo de 10% como anteriormente, utilizou-se o *threshold* que se baseia em maximizar a soma de sensibilidade e especificidade (*sum of sensitivity and specificity*, SSS). Este modelo foi usado para calcular o “mínimo polígono convexo” (MPC), menor polígono no qual nenhum ângulo interno seja maior que 180° e que contenha todos os pontos de

ocorrência, representando a extensão de ocorrência da espécie, através da opção *convex hull* da ferramenta *Minimum Bounding Geometry*, no ArcMap 10.3. Também foi utilizado a aplicação GeoCAT (disponível em geocat.kew.org), que auxilia na identificação da área de ocupação (*Area of Occupancy; AOO*) e extensão de ocorrência (*Extent of Occurrence; EOO*) para espécies ameaçadas segundo as diretrizes da IUCN (2016) e indica as categorias de ameaça correspondente.

Para inferir o estado de conservação para a espécie foi utilizado o método descrito por Papeş e Gaubert (2007), construindo um *shapefile* de reservas designadas e propostas, através dos dados de áreas protegidas globais da IUCN (UNEP-WCMC 2017). Assim, foi possível avaliar as proporções de sítios adequados para *Anomochloa marantoidea* que se encontram sobre proteção, bem como a de sítios não protegidos. Os cálculos foram realizados no ArcMap 10.3.

1.2.4 Avaliação dos modelos

O algoritmo MaxEnt avalia esta performance usando *Receiver Operating Characteristic Curve* (ROC curve) e *Area Under Curve* (AUC). Valores AUC entre 0,5 e 1 são esperados em um modelo. Um valor AUC de 0,5 representa uma predição aleatória, enquanto valores próximos a 1 representam bons modelos (Phillips et al. 2006). Swets (1988) categorizou a performance de modelos baseada em AUC considerando valores 0,8-0,9 como bons e acima de 0,9 como excelentes. O software pValueCompute também foi utilizado para avaliar a acurácia dos modelos pois avalia a significância estatística (*p* valor) para modelos construídos com amostras pequenas (Pearson et al. 2007)

1.3 Resultados

1.3.1 Uso do modelo para guiar esforço de coleta em campo

No decorrer do trabalho, foi encontrada uma nova população de *Anomochloa marantoidea* com 11 indivíduos, localizada próxima à Serra do Padeiro (Terra Indígena) entre os municípios Una e Buerarema (Figura 2 A). Por se tratar de uma espécie ameaçada, a localização exata desta nova população não será citada, porém esta informação pode ser localizada na exsicata (*J.G.Jardim & J.P.S.Vieira 6786*) depositada no herbário CEPEC (Sigla segundo Thiers 2007). Não foram amostrados para herbário espécimes da população com menos indivíduos (Km5). Devido ao grande nível de perturbação antrópica nos sítios, foi encontrado em uma das populações (Km15) um espécime aparentemente recém-pisoteado, que foi coletado e depositado no Herbário HUEFS (*R.P.Oliveira et al. 2233*) (Sigla segundo Thiers 2007) (Tabela 1).

Utilizando como guia o mapa obtido por modelagem preditiva e com auxílio do Google Earth, também foi localizada uma nova população de *Anomochloa marantoidea*. A população SR encontra-se numa área de acesso difícil, próxima à Fazenda Santa Rosa, situadas dentro de Terra Indígena (Figura 2 B). Esta se tornou a população conhecida da espécie com o maior número de indivíduos ($n > 100$) (*J.P.S.Vieira et al. 1* HUEFS) e também não terá sua exata localização revelada. O modelo final construído com quatro registros de ocorrência é representado na Figura 4, com auxílio do qual se espera que novas populações possam ser coletadas.

1.3.2 Desempenho dos modelos

O valor obtido AUC obtido foram 0,997 para o modelo descritivo e 0,843 para o preditivo, o que os classificam de acordo com os valores de Swets (1988) como excelente e bom, respectivamente. Para os resultados obtidos por *jackknife*, as taxas de acertos para o modelo preditivo construído utilizando-se de quatro pontos de ocorrência foi de 100% ($p < 0,05$); o modelo no qual foi utilizado *threshold* SSS obteve sucesso em três das quatro

replicações ($p < 0,05$). Tais resultados também mostram que modelos construídos foram estatisticamente significantes.

1.3.3 Contribuição das variáveis para a construção do modelo descritivo

Após a análise de correção entre as variáveis, a partir de um conjunto inicial de 22 variáveis, foram utilizadas oito para construir o modelo preditivo e nove para construir o modelo que busca representar climaticamente o *background*. As variáveis ambientais que foram utilizadas na construção dos modelos, bem como seus respectivos códigos estão na Tabela 2. Os valores encontrados para cada variável utilizada no modelo descritivo para cada um dos pontos de ocorrência de *Anomochloa marantoidea* estão representados na Tabela 3.

As variáveis que mais contribuíram para a construção dos modelos foram: porcentagem de cobertura arbórea (*tree*); variação de temperatura diurna (*bio2*); precipitação anual (*bio12*) e precipitação no trimestre mais seco (*bio17*). O resultado do teste *jackknife* mostrou que quando usadas independentemente, as variáveis *tree*, *bio2* e *bio17* foram as variáveis que apresentam informações mais úteis. As demais variáveis apresentaram ganho baixo, não contendo muita informação por si só (ganho $< 0,5$). A variável ambiental que mais diminuiu o ganho quando excluída foi *bio12* (ganho $< 2,0$), tendo esta, portanto, a maior parte da informação que não está presente nas outras variáveis. O resultado do teste de *jackknife* para todas as variáveis estão na Figura 5. As curvas de resposta para as variáveis mais úteis (*tree*; *bio12*; *bio2* e *bio17*) estão representadas na Figura 6.

1.3.4 Área de distribuição de habitat potencial

O modelo que descreve o nicho fundamental de *Anomochloa marantoidea* é apresentado na Figura 7, no qual os valores contínuos de adequabilidade de habitat foram convertidos para dados de presença/ausência. A área predita corresponde à aproximadamente

0,33% do *background*, sendo que os sítios mais adequados à espécie encontram-se concentrados em dois conjuntos principais: um ao norte, tendo a cidade de Castro Alves como limite norte e com uma baixa concentração de sítios. O outro conjunto está localizado mais ao sul da área, com uma maior quantidade de sítios, sendo que a maioria destes está nos municípios Una e Buerarema e restritos a áreas relativamente próximas às populações conhecidas. Aproximadamente 34% da área potencial de ocorrência encontra-se sob unidades de conservação. A *EOO* e a *AOO* calculadas conforme as diretrizes da IUCN foram de 12,244 km² (categoria CR) e 16 km² (categoria EN), respectivamente (Figura 7).

Nos modelos construídos, dois pixels representando sítios adequados à espécie estavam presentes há uma grande distância dos demais (1.600 quilômetros), no Estado de Santa Catarina, porém estes foram excluídos das representações dos mapas das imagens 2 e 4, bem como da construção do polígono da Figura 7, pois causariam superestimação do MPC que representa a extensão da distribuição da espécie (IUCN 2016).

1.4 Discussão

1.4.1 Modelagem de Nicho Ambiental com poucos registros de ocorrência

A construção de ENMs com poucos registros de ocorrência traz consigo alguns problemas. O principal deles é que a maioria dos algoritmos mais comumente utilizados é bastante sensível a um baixo número amostral, fazendo com que a acurácia dos modelos produzidos seja prejudicada (Reese et al. 2005). No entanto o algoritmo Maxent tem se mostrado extremamente útil para casos em que o número de pontos de ocorrência é pequeno, mesmo com menos de cinco observações, obtendo melhor desempenho em comparação a outros métodos (Papeş e Gaubert 2007; Pearson et al. 2007).

Outro problema ocorre na etapa de seleção do *threshold* para a obtenção de um modelo de presença-ausência. Comumente, quando se busca um significado ecológico utiliza-

se o *threshold* baseado em limiar de mínima presença (*Lowest Presence Threshold*; LPT), que considera sítios com valores adequados para que ao menos uma observação para a espécie possa ser registrada, ou seja, onde todas as ocorrências conhecidas estão presentes (Pearson et al. 2007). Porém este valor é sensível a baixo número de pontos de ocorrência (Bean et al. 2012). No entanto, os resultados de Liu et al. (2005; 2013) indicaram que o método de seleção de *threshold* que se baseia em maximizar a soma de sensibilidade e especificidade (*sum of sensitivity e specificity*, SSS) é um dos mais indicados para construção de ENM's, e por isso este método foi utilizado aqui para gerar o mapa binário de presença-ausência.

Finalmente, o método de avaliação sucesso preditivo de ENMs, *bootstrap*, demanda que uma proporção dos registros seja reservada para “testar” o modelo, não sendo, portanto, um método apropriado para um conjunto de dados escasso. Neste estudo, outra metodologia para avaliação foi utilizada; ela avalia o sucesso de um modelo em localizar um ponto de ocorrência excluído, sendo que este é construído com as $n-1$ pontos de ocorrência restantes, utilizando um método de reamostragem *jackknife* (*leave-one-out*) (Pearson et al. 2007) implementado nas versões mais recentes do Maxent e permitindo uma avaliação de significância estatística através do *software* pValueCompute (Pearson et al. 2007).

1.4.2 Contribuição das variáveis para modelagem do Nicho Fundamental

As curvas de resposta mostram como a mudança de cada variável afeta individualmente a adequabilidade ambiental, revelando informações sobre o nicho ecológico da espécie. O Maxent previu diminuição na adequabilidade ambiental em regiões com: cobertura arbórea esparsa (menor que 80%); elevada flutuação de temperatura (variação de temperatura média diária maior que 6°C) e pouca disponibilidade de água (precipitação menor que 1800 mm ao ano e menor que 350 mm no trimestre mais seco). Tais limites exigentes para estas variáveis podem indicar que a espécie é delimitada por um microclima. Espécies

com tais características podem ser indicadoras de ecossistemas (Thomas 2007); no caso de *Anomochloa marantoidea*, este ecossistema único também abriga outras gramíneas também endêmicas e ameaçadas, como *Olyra bahiensis* R.P. Oliveira & Longhi-Wagner (Oliveira e Longhi-Wagner 2005), *Ichnanthus longhi-wagnerae* A.C. Mota & R.P. Oliveira (Mota e Oliveira 2012), além de *Parianella carvalhoi* (R.P. Oliveira & Longhi-Wagner) F.M. Ferreira & R.P. Oliveira (Ferreira et al. 2013). Um fato que corrobora isto é que, próxima a duas das populações de *A. marantoidea* encontradas (SP e km15), foi também localizada uma população de *O. bahiensis* (HUEFS 226931).

Adicionar variáveis vegetacionais é uma forma de inserir informações sobre características de nicho Eltoniano (em larga escala) à construção do ENM (McCormack et al. 2010). A variável “porcentagem de cobertura arbórea” (tree) se mostrou como o principal fator estruturando o NF da espécie; quanto maior a cobertura, maior a adequabilidade de habitat. Neste contexto, as folhas largas e longas que os indivíduos de *Anomochloa marantoidea* e demais gramíneas de floresta possuem (Figura 1 C), representam uma adaptação à captação de luz para fotossíntese, devido à suas ocorrências em áreas densas e muito sombreadas (Judziewicz e Soderstrom 1989; Judziewicz et al. 1999; Cayssials e Rodríguez 2013). Tais espécies não resistem em habitats abertos devido aos altos níveis de radiação que tais ambientes apresentam, uma vez que não apresentam mecanismos para reduzir os efeitos do aumento de temperatura e danos ao DNA causados pela radiação ultravioleta (Stapleton 1992; Cayssials e Rodríguez 2013).

O estudo de Bouchenak-Khelladi et al. (2010) propôs que os ancestrais de *Anomochloa marantoidea*, bem como da família das gramíneas, se diversificaram em florestas de dossel fechado. Há outros trabalhos que defendem a origem de Poaceae em florestas tropicais (Clark et al. 1995 e suas referências; Kellogg 2001; Bremer e Baum 2002). Esta teoria supõe a coexistência destas gramíneas ancestrais com famílias de eudicotiledôneas que

compõem a fitofisionomia das florestas tropicais. Como atualmente é considerado, a divergência de *Anomochloa* é data de 69-70 ma e a origem de Poaceae está datada entre 107-129 Ma, no Cretáceo Inferior (Prasad et al. 2011; Burke et al. 2016), enquanto os registros palinológicos de florestas tropicais na América do Sul começam a aparecer de forma ainda limitada durante o Paleoceno (65-55 ma) e de forma mais consistente durante o Eoceno (55-36 ma) (Burnham e Johnson 2004; Maslin et al. 2005); os fósseis mais antigos para Poaceae na América do Sul também datam do Paleoceno (Muller 1981). Nota-se que a origem do gênero *Anomochloa* tem idade mais comparável aos registros de florestas tropicais que a origem da família Poaceae; se as primeiras gramíneas surgiram num ambiente em que não havia ainda densas florestas, não poderiam ser adaptados a ambientes sombreados como *Anomochloa marantoidea*. No entanto, com descobertas recentes de registros fósseis na Índia e em Myanmar (Prasad et al. 2011; Poinar et al. 2015), sendo este último o mais antigo para a família até o momento (97 ma), Burke et al. (2016) voltaram a indicar a antiga teoria de origem no Velho Mundo para as gramíneas (ex. Raven e Axelrod 1974), com subsequente dispersão para outras regiões.

A variável precipitação anual (bio12) aproxima-se dos valores totais de entrada de água no ecossistema, que aparentemente é fator limitante para a distribuição de *Anomochloa marantoidea*. Embora não haja estação seca na região onde a espécie ocorre, nos meses mais quentes (Dezembro a Março) podem ocorrer períodos de 1-3 meses sem chuva (Mori et al. 1983; Thomas et al. 1998). A quantidade de precipitação nesse período (bio18) também foi uma variável que contribuiu significativamente para o modelo, mostrando que a disponibilidade de água no trimestre mais seco afeta a adequabilidade de sítios para a espécie na região. A quantidade de chuva nos sítios adequados nestes meses (~116 mm em cada mês) não deve ser muito inferior a média mensal (150 mm) e reforçando a grande dependência de água durante todo o ano.

Flutuações de temperatura podem estar relacionadas a padrões de germinação em espécies e, as diferenças no tipo de resposta a estas flutuações podem ser responsáveis por diferenciação de nicho em plantas (Perez 2004). Há também evidências de que temperatura e umidade moldem o sucesso na polinização, alterando a receptividade do estigma ao pólen. (Lora et al. 2011). A flutuação máxima de temperatura ideal para a espécie (bio2) corresponde à média de flutuação anual para a região, que é de 7-8°C (Mori et al. 1983). O fato de a espécie ocorrer em áreas que variam pouco a temperatura ao longo do dia pode indicar um padrão específico de germinação e requisito para fecundação, porém estudos específicos de germinação e polinização são necessários para se afirmar com maior propriedade.

Apesar de todos os pontos de ocorrência se encontrarem entre 120-164 m de altura e a literatura reportar a ocorrência da espécie em altitudes até 200 m (Judziewicz et al. 1999), as variáveis topográficas foram pouco informativas na predição de habitat favorável (~1% de contribuição).

1.4.3 Área de distribuição de habitat potencial e Nível de conservação

Do mesmo modo que a estreita faixa de variação encontrada para as variáveis citadas no item anterior, o alcance espacial do modelo climático também sugere um nicho restrito para espécie, e uma vez que apenas dados ambientais foram utilizados na construção do ENM, este resultado indica que a espécie é restringida por fatores desta natureza. O limite espacial do nicho indica que este é conservado, uma vez que este limite não diverge do esperado para uma espécie considerada microendêmica (Wiens et al. 2010), reafirmando a sua raridade e nível de ameaça.

A IUCN *Red List of Threatened Species* recomenda que a *EOO* de espécies seja quantificada por meio de mínimo polígono convexo (MPC) em volta das localidades de presença (IUCN 2016). Porém, Syfert et al. (2014) e Pena et al. 2014 encontraram que,

quando se dispõe de poucos registros de ocorrência, *EOO* derivados de modelagem de nicho são mais representativos que aqueles desenhados apenas com os pontos de ocorrência, e portanto, são mais indicados para tal propósito (Figura 7). Apesar do fato de que as populações naturais conhecidas de *Anomochloa marantoidea* ocorrerem muito próximas a áreas de proteção, principalmente Parque Nacional da Serra das Lontras e Refúgio da Vida Silvestre de Una, nenhuma delas se encontra dentro destas áreas protegidas.

Não obstante, menos de metade do NF da espécie encontra-se em áreas protegidas (~34%). Porém, três das quatro populações agora conhecidas (SP; km5 e SR), bem como uma área de 67 km² compreendida dentro no NF da espécie, correspondendo a 18% deste, faz parte de uma área de reserva proposta, a Terra Indígena Tupinambá de Olivença (TI Tupinambá). A TI Tupinambá teve sua delimitação aprovada no ano de 2009 (Brasil 2009) e aguarda criação oficial por meio de declaração do Ministro de Estado da Justiça, o que deveria ter ocorrido dentro do prazo de seis meses após a publicação no Diário Oficial, de acordo com o Decreto 1.775/1996 (Brasil 1996). No entanto, até a publicação deste trabalho, a Portaria de Declaração para a reserva ainda não foi publicada devido a oposição de fazendeiros da região. Como forma de pressionar o Ministro da Justiça, os indígenas da região iniciaram as “retomadas”: ocupação das fazendas que se encontram nos limites da reserva proposta (Zoettl 2016). Em uma destas fazendas foi localizada uma população de *Anomochloa marantoidea* (SR).

Se a reserva proposta for legalmente reconhecida, mais da metade do nicho de *Anomochloa marantoidea* (52%) e três das quatro populações se tornarão protegidos. Porém, o reconhecimento da reserva parece cada vez mais distante e improvável. Recentemente, foi realizada uma Comissão Parlamentar de Inquérito (CPI) para investigar ações da FUNAI (Fundação Nacional do Índio) e do INCRA (Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária), em seu relatório final concluiu que a demarcação da TI Tupinambá teria se dado de

forma fraudulenta e indica a possibilidade de mudanças no procedimento de demarcação de terras indígenas e reestruturação da FUNAI, além de indiciar vários indígenas, antropólogos, procuradores e servidores ligados às demarcações indígenas no Brasil (Brasil 2017).

Baseando-se em observações em campo, todas as populações naturais conhecidas ocorrem bem próximas a plantações de cacau, e por mais que seja difícil o acesso até elas, todas sofrem efeitos negativos de ação antrópica, principalmente no período de colheita. A não ser que existam populações ainda não descobertas em áreas protegidas, a espécie necessita de medidas imediatas de conservação, como já sugerido por outros autores (Filgueiras e Gonçalves 2004). A técnica de reintrodução de espécies é um passo chave para evitar extinções e reconstruir comunidades perturbadas por ação humana (Martínez-Meyer et al. 2006). A modelagem de nicho climático também pode ser utilizada como uma ferramenta espacialmente explícita para determinar sítios para a reintrodução de espécies (Martínez-Meyer et al. 2006; Nazeri et al. 2010; Adhikari et al. 2012). As áreas com maior adequabilidade de habitat foram as porções norte das reservas Refúgio da Vida Silvestre de Una e Reserva Biológica de Una, áreas de densa cobertura arbórea e de mata pouco fragmentada. Estas regiões, além de representarem sítios prováveis de ocorrência de outras populações da espécie, podem ser indicadas para reintroduções da espécie em área protegida. Uma vez que está relatado na literatura que a espécie é sujeita a cultivo (Judziewicz e Soderstrom 1989; Judziewicz et al. 1999), conservação *ex situ* também pode ser uma alternativa viável para *Anomochloa marantoidea*.

1.5 Conclusões

Os resultados deste estudo confirmaram a conservação de nicho em *Anomochloa marantoidea*, reafirmando seu estado de raridade e indicando que o microendemismo é devido a uma especificidade ambiental, sendo limitada principalmente por densa cobertura arbórea,

altos níveis de precipitação e baixa variação de temperatura. Duas novas populações da espécie foram encontradas recentemente, uma delas como parte do presente estudo. Porém, seu status de conservação ainda é preocupante, uma vez que as populações conhecidas, bem como a maior parte dos sítios que apresentam condições climáticas adequadas se encontram em terras ocupadas por indígenas que ainda não foram oficialmente reconhecidas pelo governo, e onde a pressão devido ao agronegócio representa outro grande obstáculo ao reconhecimento desta reserva na Mata Atlântica do sul da Bahia.

REFERÊNCIAS

- Adhikari D, Barik S, Upadhaya K (2012) Habitat distribution modelling for reintroduction of *Ilex khasiana* Purk., a critically endangered tree species of northeastern India. *Ecol. Eng.* 40:37–43.
- Allendorf FW, Luikart G (2009) Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom.
- Amaral S, Costa CB, Arasato LS, et al. (2013) AMBDATA: Variáveis ambientais para Modelos de Distribuição de Espécies (MDEs). Anais XVI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 13 a 18 de abril de 2013, INPE.
- Andelman SJ, Willig MR (2002) Alternative configurations of conservation reserves for Paraguayan bats: considerations of spacial scale. *Conserv. Biol.* 16:1352–1363.
- Batalha-Filho H, Miyaki CY (2016) Late Pleistocene divergence and postglacial expansion in the Brazilian Atlantic Forest: multilocus phylogeography of *Rhopias gularis* (Aves: Passeriformes). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 54:137–147. doi: 10.1111/jzs.12118.
- Bean WT, Stafford R, Brashares JS (2012) The effects of small sample size and sample bias on threshold selection and accuracy assessment of species distribution models. *Ecography* 35:250–258. doi: 10.1111/j.1600-0587.2011.06545.x.
- Bouchenak-Khelladi Y, Verboom GA, Savolainen V, Hodkinson TR (2010) Biogeography of the grasses (Poaceae): a phylogenetic approach to reveal evolutionary history in geographical space and geological time. *Bot. J. Linn. Soc.* 162:543–557.
- Bourg NA, McShea WJ, Gill DE (2005) Putting a CART before the search: successful habitat prediction for a rare forest herb. *Ecology* 86:2793–2804.
- Brasil (1996) Decreto nº 1.775 de 1996. Dispõe sobre o procedimento administrativo de demarcação das terras indígenas e dá outras providências. Diário Oficial [da República

- Federativa do Brasil] de 09/01/1996 265.
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/D1775.htm
- Brasil (2009) Fundação Nacional do Índio. Diretoria de Assuntos Fundiários. Despacho do Presidente. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil] de 20/04/2009. Seção 1: 52-57. <https://www.jusbrasil.com.br/diarios/612703/pg-52-secao-1-diario-oficial-da-uniao-dou-de-20-04-2009>
- Brasil (2017) Câmara dos Deputados. Relatório final da Comissão Parlamentar de Inquérito destinada a investigar fatos relativos à Fundação Nacional Do Índio (FUNAI) e ao Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA) nos termos que especifica. <http://www.camara.leg.br/internet/comissoes/comissoes-especiais/CPI/RELAT%C3%93RIO%20CPI%20FUNAI-INCRA%202.pdf>.
- Bremer K, Baum D (2002) Gondwanan evolution of the grass alliance of families (Poales). *Evolution* 56:1374–1387. doi: 10.1554/0014-3820(2002)056[1374:GEOTGA]2.0.CO;2
- Brongniart A (1851) Description d'un nouveau genre de Graminées du Brésil. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique (Paris)* 16:368–372.
- Burke SV, Lin C-S, Wysocki WP, et al. (2016) Phylogenomics and Plastome Evolution of Tropical Forest Grasses (*Leptaspis*, *Streptochaeta*: Poaceae). *Front. Plant Sci.* 7:1993. doi: 10.3389/fpls.2016.01993
- Burnham RJ, Johnson KR (2004) South American palaeobotany and the origins of neotropical rainforests. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* 359:1595–610. doi: 10.1098/rstb.2004.1531
- Cayssials V, Rodríguez C (2013) Functional traits of grasses growing in open and shaded habitats. *Evol Ecol* 27:393–407. doi: 10.1007/s10682-012-9601-3
- Clark LG (1990) Diversity and biogeography of neotropical bamboos (Poaceae: Bambusoideae). *Acta Bot. Bras.* 4:125–132.
- Clark LG, Zhang W, Wendel JF (1995) A phylogeny of the grass family (Poaceae) based on *ndhF* sequence data. *Syst. Bot.* 436–460.
- Duvall MR, Morton BR (1996) Molecular Phylogenetics of Poaceae: An Expanded Analysis of *rbcL* Sequence Data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5:352–358. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/mpev.1996.0030>
- Elith J, Graham CH, Anderson RP, et al. (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29:129–151. doi: 10.1111/j.2006.0906-7590.04596.x
- Elith J, Leathwick J (2009) The contribution of species distribution modelling to conservation prioritization. In: A. Moilanen, K.A. Wilson and H.P. Possingham (ed) *Spatial Conservation Prioritization: Quantitative Methods & Computational Tools*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp 70–93

- Elith J, Phillips SJ, Hastie T, et al. (2011) A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Divers. Distrib.* 17:43–57. doi: 10.1111/j.1472-4642.2010.00725.x
- Engler R, Guisan A, Rechsteiner L (2004) An improved approach for predicting the distribution of rare and endangered species from occurrence and pseudo-absence data. *J. Appl. Ecol.* 41:263–274.
- Ferreira FM, van den Berg C, Hollowell VC, Oliveira RP (2013) *Parianella* (Poaceae, Bambusoideae): morphological and biogeographical information reveals a new genus of herbaceous bamboos from Brazil. *Phytotaxa* 77: 27–32.
- Filgueiras TS, Gonçalves AS (2004) A checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). *The Journal of the American Bamboo Society* 18:7–18.
- Filgueiras TS, Oliveira RP, Sfair JC, et al. (2013) Poaceae. In: Gustavo Martinelli and Miguel Avila Moraes (orgs) *Livro Vermelho da Flora do Brasil*. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, p 858-881.
- Fundação SOS Mata Atlântica e INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais) (2016) *Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2014–2015*. São Paulo.
- Galindo-Leal C, Câmara IG (2003) Atlantic Forest hotspot status: an overview. *The Atlantic Forest of South América: biodiversity status, threats, and outlook* 3–11.
- Gaut BS, Peek AS, Morton BR, Clegg MT (1999) Patterns of genetic diversification within the *Adh* gene family in the grasses (Poaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 16:1086–1097.
- GPWG (Grass Phylogeny Working Group) (2001) Phylogeny and Subfamilial Classification of the Grasses (Poaceae). *Ann. Mo. Bot. Gard.* 88: 373–457.
- Guisan A, Broennimann O, Engler R, et al. (2006) Using niche-based models to improve the sampling of rare species. *Conserv. Biol.* 20: 501–11.
- Guisan A, Thuiller W (2005) Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecol. Lett.* 8:993–1009. doi: 10.1111/j.1461-0248.2005.00792.x
- Guisan A, Zimmermann NE (2000) Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecol. Modell.* 135:147–186. doi: 10.1016/S0304-3800(00)00354-9
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, et al. (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 25: 1965–1978.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2006) Mapa da Área de Aplicação da Lei no 11.428, de 2006. http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/mapas_doc6.shtm.
- IUCN (2016) *Guidelines for using the IUCN Red List categories and criteria*, 12th ed.
- Jaynes ET (1957) Information theory and statistical mechanics. *Phys. Rev.* 106: 620.

- Judziewicz EJ, Clark LG, Londono X, Stern MJ (1999) *American Bamboos*. Smithsonian Institution Press.
- Judziewicz EJ, Soderstrom TR (1989) Morphological, anatomical, and taxonomic studies in *Anomochloa* and *Streptochaeta* (Poaceae: Bambusoideae). *Smithsonian Contributions to Botany* 1–52.
- Kellogg EA (2000) The grasses: a case study in macroevolution. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 31:217–238.
- Kellogg EA (2001) Evolutionary History of the Grasses. *Plant Physiol.* 125:1198–1205. doi: 10.1104/pp.125.3.1198
- Krajewski C (1991) Phylogeny and Diversity. *Science* 254:918–918. doi: 10.1126/science.254.5034.918-a
- Liu C, Berry PM, Dawson TP, Pearson RG (2005) Selecting thresholds of occurrence in the prediction of species distributions. *Ecography* 28: 385–393.
- Liu C, White M, Newell G (2013) Selecting thresholds for the prediction of species occurrence with presence-only data. *J. Biogeogr.* 40: 778–789. doi: 10.1111/jbi.12058
- Lora J, Herrero M, Hormaza JI (2011) Stigmatic receptivity in a dichogamous early-divergent angiosperm species, *Annona cherimola* (Annonaceae): Influence of temperature and humidity. *Am. J. Bot.* 98:265–274. doi: 10.3732/ajb.1000185
- Martínez-Meyer E, Peterson AT, Servín JI, Kiff LF (2006) Ecological niche modelling and prioritizing areas for species reintroductions. *Oryx* 40: 411–418.
- Maslin M, Malhi Y, Phillips O, Cowling S (2005) New views on an old forest: assessing the longevity, resilience and future of the Amazon rainforest. *T. I. Brit. Geogr.* 30: 477–499.
- Mason-Gamer RJ, Weil CF, Kellogg EA (1998) Granule-bound starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility. *Mol. Biol. Evol.* 15:1658–1673.
- McCormack JE, Zellmer AJ, Knowles LL (2010) Does niche divergence accompany allopatric divergence in *Aphelocoma* jays as predicted under ecological speciation? Insights from tests with niche models. *Evolution* 64: 1231–44. doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00900.x
- McNyset K (2005) Use of ecological niche modelling to predict distributions of freshwater fish species in Kansas. *Ecol. Freshw. Fish* 14: 243–255.
- Merow C, Smith MJ, Silander JA (2013) A practical guide to MaxEnt for modeling species' distributions: what it does, and why inputs and settings matter. *Ecography* 36:1058–1069. doi: 10.1111/j.1600-0587.2013.07872.x
- MMA (Ministério do Meio Ambiente) (2008) Instrução Normativa n. 6, de 23 de setembro de 2008. Espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção e com deficiência de dados. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil* 75–83.

- Mota ACD, Oliveira RP (2012) *Ichnanthus longhi-wagnerii* (Panicoideae): New Grass from the Atlantic Moist Forest of Bahia, Brazil. *Syst. Bot.* 37:117–121.
- Muller J (1981) Fossil pollen records of extant angiosperms. *Bot. Rev.* 47: 1.
- Nazeri M, Jusoff K, Bahaman AR, Madani N (2010) Modeling the potential distribution of wildlife species in the tropics. *World Journal of Zoology* 5: 225–231.
- Nix HA (1986) A biogeographic analysis of Australian elapid snakes. In: Richard Longmore (ed) *Atlas of elapid snakes of Australia*. pp. 4–15.
- Oliveira RP, Longhi-Wagner HM (2005) *Olyra bahiensis* (Poaceae Olyreae): uma nova espécie para a Mata Atlântica do Estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 28:835–839.
- Oliveira RP Longhi-Wagner HM, Jardim JG (2011) Diversidade e conservação de bambus herbáceos (Poaceae: Bambusoideae: Olyreae) da Mata Atlântica, Brasil. In: Jaime Gonçalves de Almeida and Anelizabeth Alves Teixeira (orgs) *Anais do I Seminário Nacional do Bambu*. pp 62–68
- Papeş M, Gaubert P (2007) Modelling ecological niches from low numbers of occurrences: assessment of the conservation status of poorly known viverrids (Mammalia, Carnivora) across two continents. *Divers. Distrib.* 13: 890–902.
- Pearson RG, Raxworthy CJ, Nakamura M, Peterson AT (2007) Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. *J. Biogeogr.* 34: 102–117.
- Pena JC de C, Kamino LHY, Rodrigues M, et al. (2014) Assessing the conservation status of species with limited available data and disjunct distribution. *Biol. Conserv.* 170:130 – 136. doi: <http://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.12.015>.
- Perez SCJGA (2004) *Envoltórios*. In: Ferreira AG.e Borguetti F (eds) *Germinação: do básico ao aplicado*. Artmed Editora, Porto Alegre, Brasil.
- Peterson AT, Papeş M (2006) Potential geographic distribution of the Bugun *Liocichla Liocichla bugunorum*, a poorly-known species from north-eastern India. *Indian Birds* 2: 146–149.
- Peterson AT, Vieglais DA (2001) Predicting Species Invasions Using Ecological Niche Modeling: New Approaches from Bioinformatics Attack a Pressing Problem. *BioScience* 51: 363. doi: 10.1641/0006-3568(2001)051[0363:PSIUEN]2.0.CO;2
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol. Modell.* 190: 231–259.
- Phillips SJ, Dudík M (2008) Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31: 161–175.

- Poinar G, Alderman S, Wunderlich J (2015) One hundred million year old ergot: psychotropic compounds in the Cretaceous? *Palaeodiversity* 8: 13–19.
- Prasad V, Strömberg C, Leaché A, et al. (2011) Late Cretaceous origin of the rice tribe provides evidence for early diversification in Poaceae. *Nat. Commun.* 2: 480.
- Raven PH, Axelrod DI (1974) Angiosperm Biogeography and Past Continental Movements. *Ann Mo Bot Gard* 61: 539–673.
- Reese GC, Wilson KR, Hoeting JA, Flather CH (2005) Factors affecting species distribution predictions: a simulation modeling experiment. *Ecol. Appl.* 15: 554–564.
- Sajo MG, Longhi-Wagner HM, Rudall PJ (2008) Reproductive morphology of the early-divergent grass *Streptochaeta* and its bearing on the homologies of the grass spikelet. *Plant Syst. Evol.* 275:245. doi: 10.1007/s00606-008-0080-5
- Sajo MG, Pabón-Mora N, Jardim J, et al. (2012) Homologies of the flower and inflorescence in the early-divergent grass *Anomochloa* (Poaceae). *Am. J. Bot.* 99:614–628.
- Silva JMC, Casteleti CHM (2005) Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. In: Carlos Galindo-Leal and Ibsen de Gusmão Câmara (eds) *Mata Atlântica: Biodiversidade, ameaças e perspectivas*. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo, pp. 43–59.
- Siqueira MF de, Durigan G, Marco Júnior P de, Peterson AT (2009) Something from nothing: using landscape similarity and ecological niche modeling to find rare plant species. *J. Nat. Conserv.* 17: 25–32.
- Soberón J (2007) Grinnellian and Eltonian niches and geographic distributions of species. *Ecol. Lett.* 10: 1115–23.
- Soderstrom TR (1984) In quest of the pygmy bamboos. *Fairchild Tropical Garden Bulletin* 39: 6–15.
- Soderstrom TR, Judziewicz EJ, Clark LG (1988) Distribution patterns of neotropical bamboos. In: Paulo E. Vanzolini e W. Ronald Heyer (ed) *Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp. 121–157.
- Stapleton AE (1992) Ultraviolet Radiation and Plants: Burning Questions. *The Plant Cell* 4:1353–1358.
- Swets JA (1988) Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 240: 1285.
- Syfert MM, Joppa L, Smith MJ, et al. (2014) Using species distribution models to inform IUCN Red List assessments. *Biol. Conserv.* 177: 174 – 184. doi: <http://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.06.012>
- Tabarelli M, Pinto L, Silva J da, et al. (2005) Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. In: Carlos Galindo-Leal and Ibsen de Gusmão

- Câmara (eds) *Mata Atlântica: Biodiversidade, ameaças e perspectivas*. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo, pp. 86–94.
- Thiers B (2017) [continuamente atualizado] *Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff*. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Natural History. Disponível em: <http://sweetgum.nybg.org/ih/>. Acesso em 04 abr. 2017.
- Thomas WW (2007) Survival of the rarest. *Natural History* 116: 24–27.
- Thomas WW, Carvalho AM, Amorim AM, et al. (1998) Plant endemism in two forests in southern Bahia, Brazil. *Biodivers. conserv.* 7: 311–322.
- UNEP-WCMC (United Nations Environment Programme-World Conservation Monitoring Centre) (2017) Protected Area Profile for Brazil from the World Database of Protected Areas, May 2017. www.protectedplanet.net.
- Vézquez DP, Gittleman JL (1998) Biodiversity conservation: does phylogeny matter? *Curr. Biol.* 8:379–381.
- Warren DL, Glor RE, Turelli M (2010) ENMTools: a toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography* 1: 607–611. doi: 10.1111/j.1600-0587.2009.06142.x
- Wiens JJ, Ackerly DD, Allen AP, et al. (2010) Niche conservatism as an emerging principle in ecology and conservation biology. *Ecol. Lett.* 13: 1310–1324. doi: 10.1111/j.1461-0248.2010.01515.x
- Williams JN, Seo C, Thorne J, et al. (2009) Using species distribution models to predict new occurrences for rare plants. *Divers. Distrib.* 15: 565–576. doi: 10.1111/j.1472-4642.2009.00567.x
- Wisz MS, Hijmans RJ, Li J, et al. (2008) Effects of sample size on the performance of species distribution models. *Divers. Distrib.* 14: 763–773. doi: 10.1111/j.1472-4642.2008.00482.x
- Zoetl PA (2016) The (Il)legal Indian: The Tupinambá and the Juridification of Indigenous Rights and Lives in North-Eastern Brazil. *Soc. Leg. Stud.* 25: 3–21.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig. 1 *Anomochloa marantoidea* População (a); Hábito (b); Lâminas foliares (c) Inflorescência (d) Fotos: J. Lima (a); J. Jardim (b e d) e C. Silva (c).

Fig. 2 Florestas de encostas de morro, habitat de *Anomochloa marantoidea* no sul da Bahia. Serra do Padeiro (a); Serra próxima à Fazenda Santa Rosa (b); Fragmento de floresta ombrófila densa (c); Plantação de cacau (*Theobroma cacao*) próxima à uma das populações de *A. marantoidea* (d). Fotos: J Jardim (a) e I Oliveira (d).

Fig. 3 Mapa da área de estudo. Área de abrangência da Floresta Ombrófila Densa no Brasil (a) Detalhe da área em que ocorrem as populações de *Anomochloa marantoidea* (b). Códigos das populações na tabela 1.

Fig. 4 Modelo de adequabilidade de nicho ecológico para *Anomochloa marantoidea* construído em algoritmo Maxent, com base em quatro registros de ocorrência e oito variáveis preditoras ambientais. Códigos das populações na tabela 1.

Fig. 5 Teste de jackknife mostrando as variáveis que mais contribuíram na construção do modelo de adequabilidade de nicho ecológico para *Anomochloa marantoidea* construído em algoritmo Maxent com quatro pontos de ocorrência, utilizando como background a Floresta Ombrófila Densa. Códigos das variáveis na tabela 2.

Fig. 6 Curvas de nível das variáveis que apresentaram informações mais úteis para a construção do modelo de nicho climático de *Anomochloa marantoidea* construído em algoritmo Maxent com quatro pontos de ocorrência, utilizando como background a Floresta Ombrófila Densa. Os gráficos mostram como a probabilidade de presença da espécie muda com a variação de cada uma das quatro variáveis. Área em azul representa a variância. Veja códigos na tabela 2.

Fig. 7 Localização dos sítios adequados para *Anomochloa marantoidea*; a linha vermelha representa o Mínimo Polígono Convexo em volta dos sítios (*threshold* baseado em *SSS*) (a) Enfoque nas áreas protegidas que englobam sítios favoráveis para a espécie (b) Área de ocupação (vermelho) e de extensão de ocorrência (cinza), calculados conforme recomendações da IUCN (c).



Figura 1



Figura 2

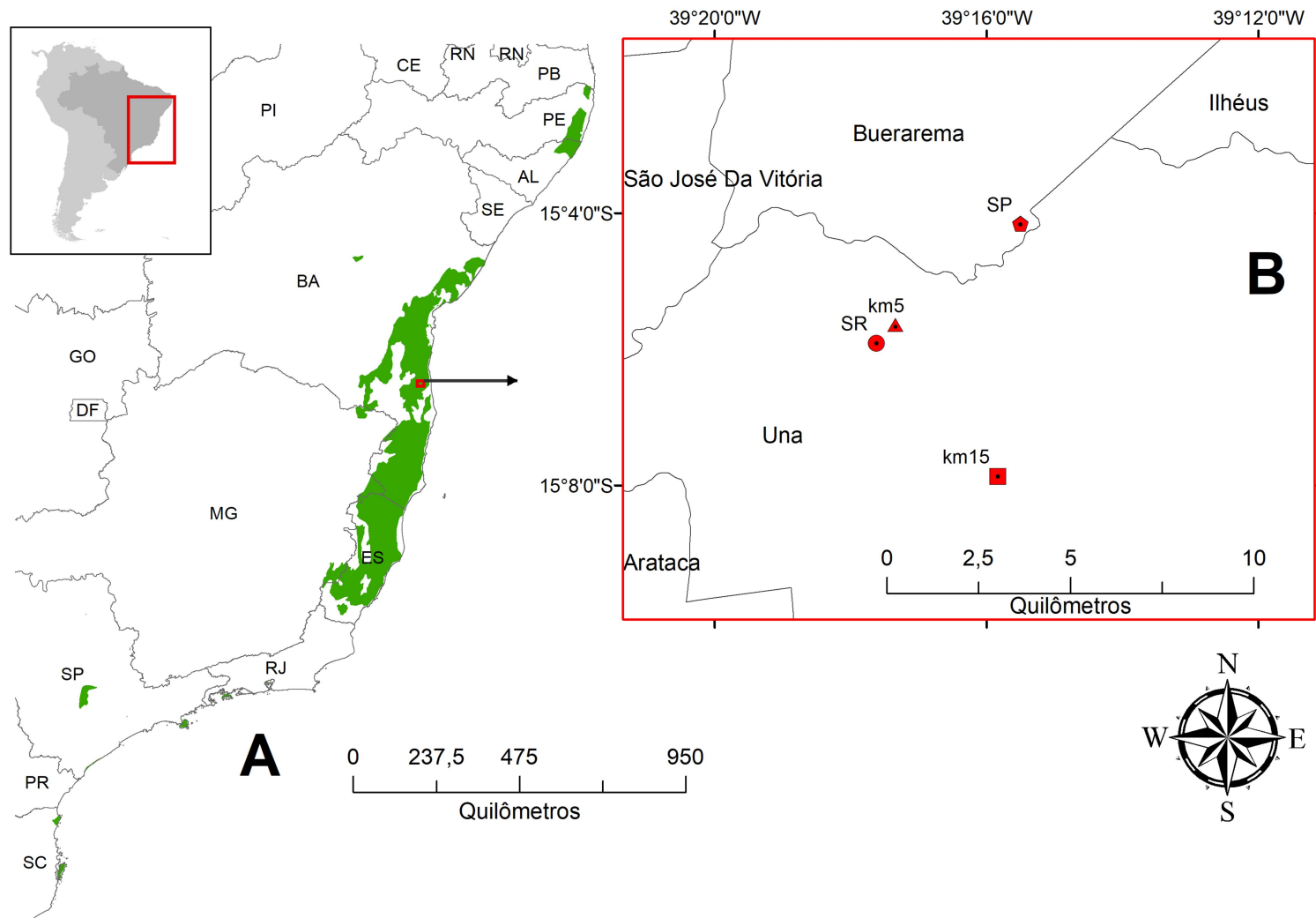


Figura 3.

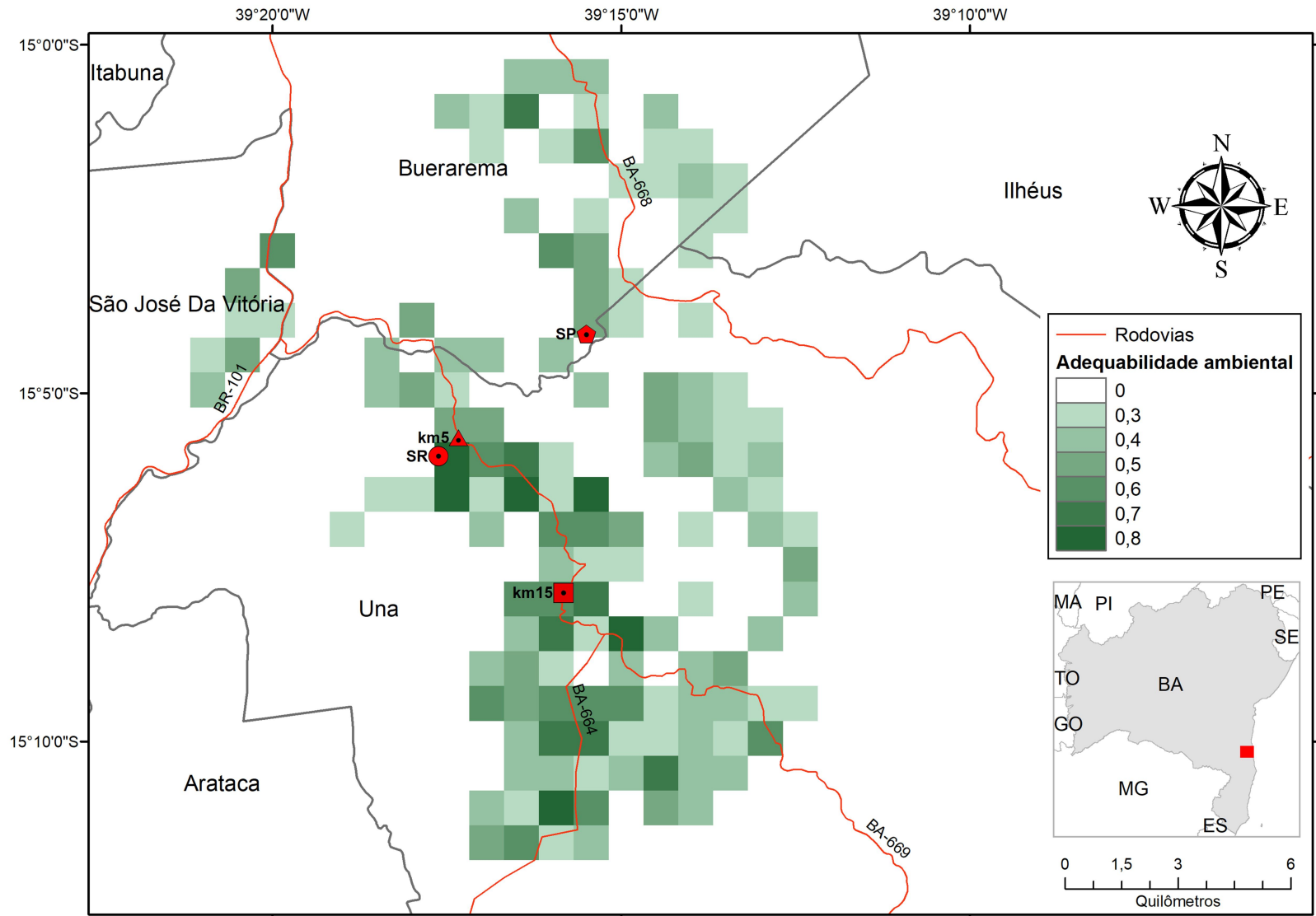


Figura 4

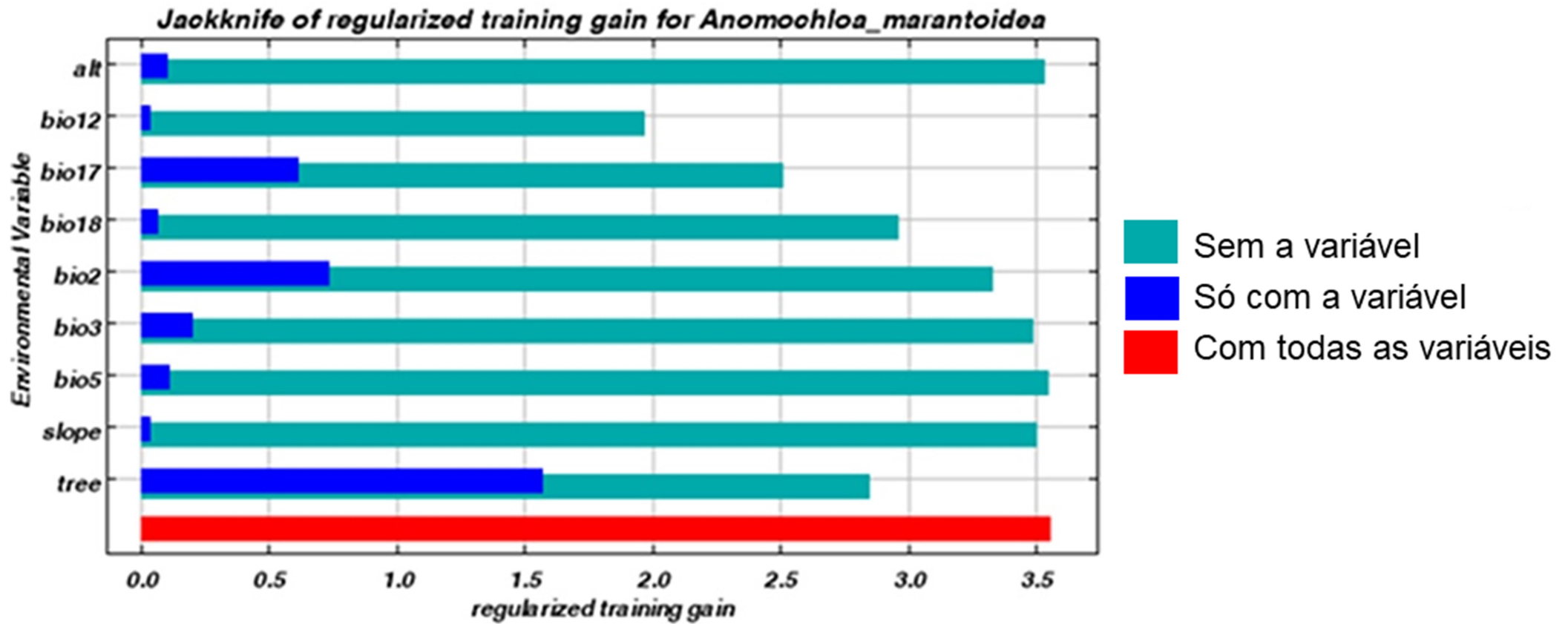


Figura 5

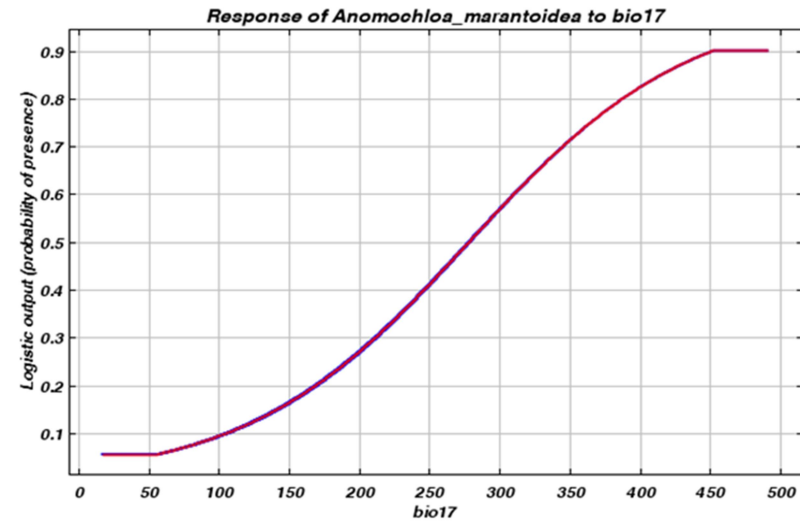
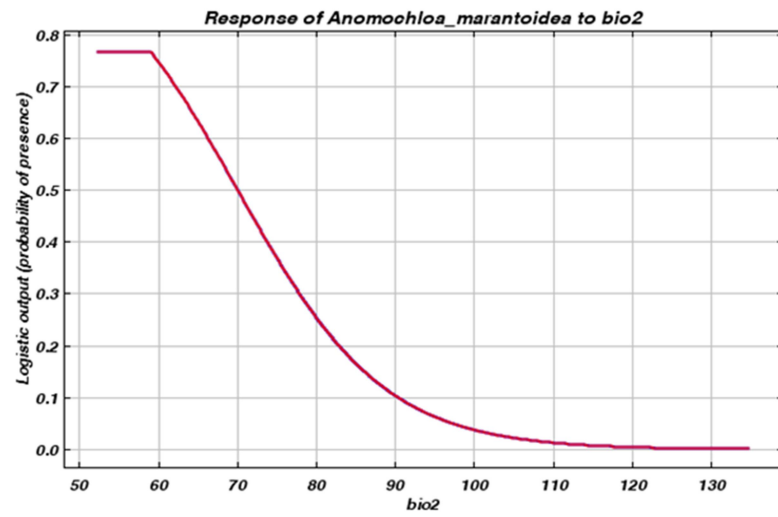
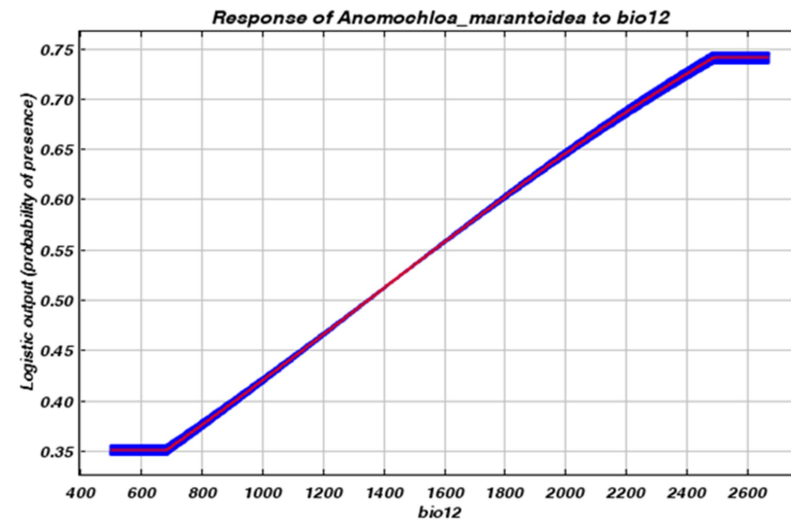
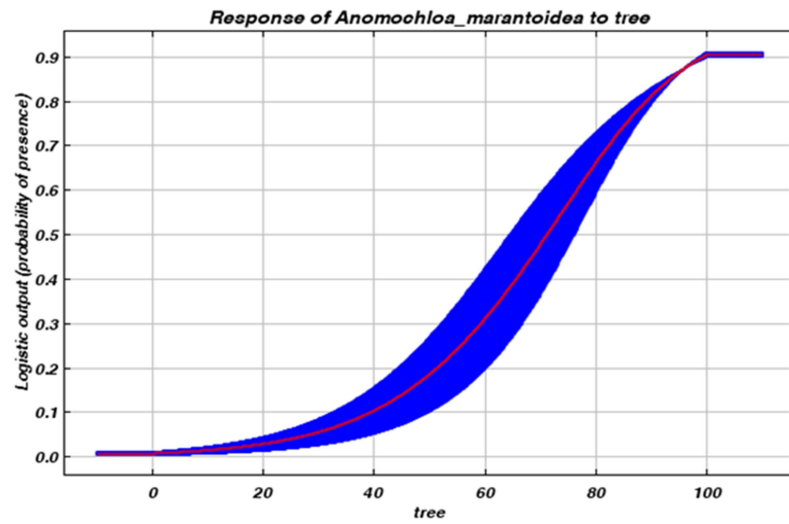


Figura 6

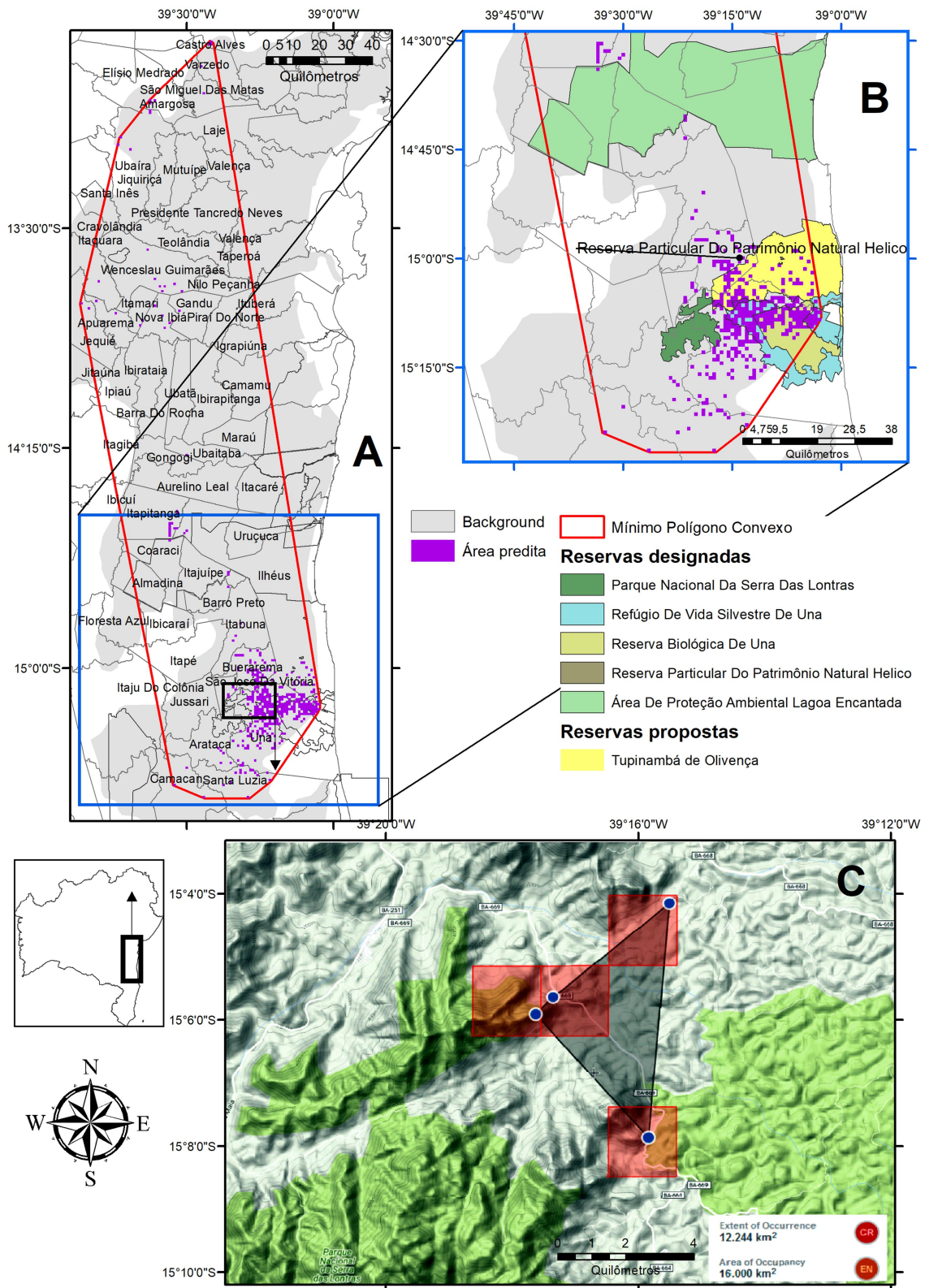


Figura 7.

Tabela 1. Localização das populações de *Anomochloa marantoidea* coletadas no município de Una, no Sul da Bahia e utilizadas na construção do modelo. *N* = número de indivíduos. Acrônimos dos herbários de acordo com Thiers (2017).

Código	Localização	<i>N</i>	Coordenadas	<i>Voucher</i>
km15	Estrada para São José*, km 15 a partir da BR 101	19	15° 07'S, 39°15W	<i>R.P.Oliveira et al. 2233</i> (HUEFS)
km5	km 5 BA- 669	5	15° 05'S, 39°17' W	--
	BA-669, estrada São José da Vitória- Una*, Fazenda Santa Rosa (Reserva indígena).	>100	15° 05'S, 39°17' W	<i>J.P.S.Vieira et al. 1</i> (HUEFS)
SR				
SP	Una, Serra do Padeiro	11	15° 04' S, 39° 15' W	<i>J.G.Jardim &</i> <i>J.P.S.Vieira 6786</i> (CEPEC)

*Rodovia BA 669

Tabela 2. Variáveis ambientais selecionadas do banco de dados WorldClim e NASA-MODIS (apenas para *tree*) usadas nos modelos de adequação ambiental para a espécie *Anomochloa marantoidea*.

Categoria	Variável	Código	Unidade de medida
Topográfica	Altitude ^{a, b}	alt	m
	Declividade ^{a, b}	slope	°
Vegetacional	Cobertura arbórea ^{a, b}	tree	%
	Temperatura anual (média*10) ^a	bio1	°C
Bioclimática	Média de variação diurna ($t_{\max}-t_{\min}$, média mensal) (*10) ^b	bio2	°C
	Isotermalidade ^{a, b}	bio3	%
	Temperatura máxima no mês mais quente (*10) ^b	bio5	°C
	Precipitação anual (total) ^{a, b}	bio12	mm
	Precipitação no mês mais chuvoso ^a	bio13	mm
	Precipitação no trimestre mais seco ^b	bio17	mm
	Precipitação no trimestre mais quente ^b	bio18	mm
	Precipitação no trimestre mais frio ^a	bio19	mm

a = utilizada no modelo preditivo; b = utilizada no modelo descritivo

Tabela 3. Valores das variáveis ambientais utilizadas no modelo descritivo para cada ponto de ocorrência *Anomochloa marantoidea*. Veja Tabela 1 para os códigos das populações e Tabela 2 para códigos das variáveis.

População	alt	slope	tree	bio2	bio3	bio5	bio12	bio17	bio18
km5	161	6	61	70	63	291	1349	277	379
km15	120	4	76	70	63	289	1355	280	378
SR	164	1	82	70	63	290	1341	277	375
SP	141	5	85	69	63	289	1378	286	384

CAPÍTULO 2

**Variabilidade genética e estrutura populacional
da mais antiga linhagem de gramíneas,
Anomochloa marantoidea Brongn. (Poaceae),
como subsídio a sua conservação**

**Variabilidade genética e estrutura populacional da mais antiga
linhagem de gramíneas, *Anomochloa marantoidea* Brongn. (Poaceae),
como subsídio a sua conservação**

João Paulo Silva Vieira^{1*}, Reyjane Patrícia de Oliveira¹, Alessandra S. Schnadelbach¹

¹Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de
Feira de Santana, Avenida Transnordestina, Feira de Santana, Bahia, 44031-460, Brasil

*Autor para correspondência. E-mail: jpsilva@uefs.br

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – processos 484381/2010-5, 562349/2010-3, 563558/2010-5 e 401526/2014-3) e FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – processo PNX0014/2009) pelo apoio financeiro para viagens de coleta em campo e para trabalhos laboratoriais. Também agradecemos Iasmin Oliveira, Marcos Dórea, José Lima Paixão, Jamile Lima, Maria LS Carvalho e ao povo da aldeia indígena Tupinambá de Olivença pelo auxílio nas coletas e a Dalila Ferreira, Maria CL Roberts, Cássio van den Berg e Eddy de Oliveira por seus comentários e suporte geral para a conclusão deste trabalho. RPO também agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (PQ1D)

Esse manuscrito será submetido à Revista “Biodiversity and Conservation”

RESUMO

Anomochloa marantoidea Brongn. é uma espécie de gramínea (Poaceae) criticamente ameaçada de extinção endêmica da Mata Atlântica do sul do estado da Bahia, no Brasil, onde apresenta distribuição restrita com poucas populações e com poucos indivíduos em cada uma destas. Esta espécie, única representante do gênero *Anomochloa*, representa a mais antiga linhagem de Poaceae existente, e assim apresenta elevada importância científica para estudos micro e macroevolutivos dentro desta importante família de angiosperma. A distribuição restrita de *A. marantoidea*, juntamente com perturbações antrópicas devido ao cultivo de cacau, podem rapidamente levá-la à completa extinção, uma vez que esta não está representada em áreas protegidas. Ameaças genéticas como depressão endogâmica, deriva genética e baixa diversidade genética são comuns em populações pequenas e podem também contribuir para acelerar o processo de extinção. Marcadores moleculares foram aqui utilizados para avaliar os níveis de diversidade genética e estruturação genética de *A. marantoidea* e verificar a ocorrência de tais ameaças genéticas. A heterozigosidade esperada foi semelhante nas populações, independente do número de indivíduos em cada uma; no entanto a proporção de *loci* polimórficos foi maior nas maiores populações, indicando uma relação entre tamanho populacional e diversidade genética. Testes de correlação entre distâncias genética e geográfica sugerem que a deriva genética é a principal força causando diferença entre as populações. Análises de estruturação indicam fragmentação recente e baixo fluxo gênico entre as populações remanescentes da espécie, com consequentes altos níveis de endogamia. Com base nestes resultados são feitas recomendações de estratégias para a conservação da espécie.

Palavras-chave: espécie ameaçada, ISSR, Mata Atlântica, espécie rara, genética de populações

2.1 Introdução

O gênero *Anomochloa* Brongn. constitui a mais antiga linhagem existente da importante família das gramíneas (Clark et al. 1995; Duvall e Morton 1996; Mason-Gamer et al. 1998; Gaut et al. 1999; Kellogg 2000; Bremer e Baum 2002; Bouchenak-Khelladi et al. 2010; Prasad et al. 2011; Burke et al. 2016). Este é um gênero monotípico, que inclui apenas *A. marantoidea* Brongn., uma espécie de aspecto morfológico diferente das gramíneas em alguns caracteres, o que é refletido no nome do gênero que significa “gramínea anômala”. O principal destes caracteres é a sua inflorescência com brácteas conspícuas e estruturas apenas equivalentes às espiguetas características da família (GPWG 2001; Kellogg 2001; Sajo et al., 2012). Além disso, suas folhas longas e largas lembram as de representantes da família Marantaceae (daí seu epíteto específico) (Judziewicz et al., 1999).

Apresenta distribuição extremamente restrita a fragmentos de Mata Atlântica na região de Una, no sul do estado da Bahia, onde a atividade cacauzeira tem causado redução no habitat da espécie (Soderstrom 1984; Thomas 2007). Além disso, são conhecidas poucas populações da espécie, com poucos indivíduos cada, nenhuma em área protegida, sendo considerada estritamente ameaçada de extinção (MMA 2008; Filgueiras et al. 2013). A conservação desta espécie é de grande importância, uma vez que estudos de táxons de linhagens ancestrais são de extrema importância para o entendimento dos processos evolutivos do grupo ao qual pertencem, além de conter uma importante proporção da diversidade genética do mesmo (Krajewski 1991; Vézquez e Gittleman 1998; Allendorf e Luikart 2009).

A diversidade genética é imprescindível para a evolução e adaptação das populações às mudanças ambientais, sejam estas associadas à ação humana ou estocásticas (Frankham et al. 2002). Há evidências de que o sucesso reprodutivo de uma população (ou *fitness*) está relacionado à sua variabilidade genética (Keller e Waller 2002). Geralmente espécies

ameaçadas têm variabilidade genética reduzida, quando comparadas a espécies taxonomicamente próximas não ameaçadas (Spielman et al. 2004). Isto leva à conclusão de que a perda desta variabilidade aumenta o risco de extinção (Frankham 2005).

O conhecimento dos níveis de diversidade genética e de como esta se encontra estruturada entre as populações de uma espécie são essenciais para a elaboração de planos de conservação de espécies ameaçadas, pois ajudam a entender a extensão da ameaça à variabilidade e norteia as medidas que podem ser tomadas para mitigar seus efeitos deletérios (DeSalle e Amato 2004). A partir disso, é possível, por exemplo, selecionar populações com maior diversidade como fonte de propágulos para reintroduções (Hamrick e Godt 1996).

A diversidade genética de um grupo biológico pode ser acessada por marcadores moleculares neutros (Charlesworth 2003). Este método de avaliação baseia-se na hipótese de que a variabilidade acessada através de marcadores de evolução neutra geralmente reflete a variabilidade de todo o genoma, diferente dos marcadores de *loci* sujeitos a seleção natural (Hedrick 2001). Marcadores microssatélites são indicados para estudos de genética da conservação por apresentarem alto grau de polimorfismo e herança codominante tornando possível distinguir heterozigotos de homozigotos (Powell et al. 1996). Apesar de muito utilizados na atualidade, marcadores microssatélites apresentam uso limitado em espécies poliploides, pela dificuldade de estimar o número exato de cópias alélicas (Silva et al. 2005; Obbard et al. 2006; Clark e Jasieniuk 2011). Nesse caso, os dados muitas vezes são tratados como binários, semelhante àqueles oriundos de marcadores dominantes (ex. Mengoni et al. 2000; Lian et al. 2003; Robertson et al. 2010).

Hunziker et al. (1989) realizaram a contagem cromossômica para *Anomochloa marantoidea*, sugerindo que o número cromossômico $n=18$ teria sido originado através de poliploidização. Em um estudo sobre evolução cromossômica em Poaceae, Hilu (2004) propôs um número cromossômico ancestral para Poaceae $x=11$, que por aneuploidia teria

gerado $x=9$ com posterior duplicação para $x=18$ em *A. marantoidea*. Assim, com base na indicação de poliploidia nessa espécie, e para evitar o custo do desenvolvimento de bibliotecas de *primers* e a respectiva genotipagem dos microssatélites, em uma espécie potencialmente poliploide, optou-se por utilizar os ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*), marcadores que flanqueiam os microssatélites e estão amplamente distribuídos no genoma, apresentando herança dominante e segregação mendeliana simples (Gupta et al. 1994; Zietkiewicz et al. 1994; Sankar e Moore 2001).

ISSRs são marcadores altamente polimórficos, de baixo custo e com alta reprodutibilidade (Fang et al. 1997; Fang e Roose 1997; Reddy et al. 2002; Hausdorf e Hennig 2010; Nybom et al. 2014; Costa et al. 2016). Por estes motivos, estão entre os marcadores moleculares mais utilizados em estudos de diversidade genética em plantas (Nybom et al. 2014), sendo também largamente utilizados em estudos com táxons ameaçados, onde as informações geradas são utilizadas para auxiliar na tomada de decisões voltadas a conservação (Huang et al. 2009; Narzary et al. 2010; González-López et al. 2014; Jiménez et al. 2015; Knox et al. 2016; Lu et al. 2016; Nunes et al. 2016; Fajardo et al. 2017). Ressalta-se ainda o custo reduzido da técnica, principalmente por dispensar a utilização de sequenciadores de DNA (Zietkiewicz et al. 1994; Hausdorf e Hennig 2010).

Neste estudo foram utilizados marcadores ISSR em populações remanescentes de *Anomochloa marantoidea* para verificar quais fatores podem estar moldando os níveis de diversidade genética e de como esta se encontra estruturada na espécie e suas populações; avaliar possíveis ameaças genéticas à sua conservação, como efeitos-gargalo, deriva e endogamia. A partir destas informações busca-se responder as perguntas: (1) As maiores populações são geneticamente mais diversas? (2) As populações são geneticamente isoladas e qual o nível de fluxo gênico entre elas? (3) A distância genética é proporcional à distância geográfica (há equilíbrio regional)? (4) Quais os principais fatores responsáveis pelos padrões

observados? Com base nestes resultados são feitas recomendações de como pode ser realizado o plano de manejo.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Amostragem, extração e quantificação do DNA

Até recentemente, apenas duas populações naturais eram conhecidas para a espécie, com poucos indivíduos em ambas. Duas novas populações foram localizadas como resultado de um trabalho de modelagem de nicho climático (Vieira et al. Cap. 1). Foram amostrados todos os indivíduos encontrados em todas as quatro populações, exceto em uma das novas populações que apresentou mais de 100 indivíduos, na qual 30 foram amostrados. A amostragem total consistiu em 65 indivíduos, sendo 11 da população da Serra do Padeiro (SP), 19 da população do km 15 da BA-669 (km15), e cinco da população do km 5 da BA-669 (km5), além dos 30 indivíduos da população próxima a Fazenda Santa Rosa (SR) (Tabela 1; Figura 1). Foi retirada uma folha jovem por indivíduo, que foi acondicionada em sílica gel para posterior extração do DNA total.

A extração do DNA foi realizada a partir de 50 µg de folhas desidratadas utilizando o método descrito por Doyle e Doyle (1987), adaptado para microtubos, e areia autoclavada para auxiliar na maceração mecânica dos tecidos vegetais em almofariz de porcelana. O DNA foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão SB (Brody e Kern 2004), na presença de marcador Lambda Hind III (200ng). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 mg/L), visualizados em transiluminador com luz ultravioleta e fotodocumentados com o auxílio do sistema L-PIX (Loccus Biotecnologia).

2.2.2 Amplificação ISSR-PCR e teste de polimorfismo

Foram testados os 20 *primers* do ISSR Resources web site (<http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>), além de dois *primers* (GA)₈-YC e (AG)₈-YT do *UBC primer kit #9* (Biotechnology Laboratory, University of British Columbia, Canada). As amplificações foram realizadas utilizando 1x TopTaq™ Master Mix Kit (QIAGEN Inc., Hilden, Germany); 5 pmol de *primer* e 10 ng de DNA molde em um volume final de 8 µL. Os ciclos de amplificação consistiram em um ciclo inicial de 94 °C por 1 min; 35 ciclos de 40 s a 94 °C, 45 s a 45 °C e 1,5 min. a 72 °C, com dois passos adicionais de 45 s a 94 °C e 45 s a 44 °C; e uma extensão final de 7 min. a 72 °C.

Para as análises foram selecionados os *primers* que apresentaram padrão de bandas com resolução satisfatória e polimorfismo, identificados a partir de testes realizados com cinco indivíduos escolhidos aleatoriamente em cada população (Tabela 2). Uma vez que estes *primers* podem potencialmente amplificar DNA de qualquer organismo eucarioto (Zietkiewicz et al. 1994), em todas as PCR foram conduzidas com ao menos uma amostra como controle negativo (sem adição de DNA molde) para verificar contaminação externa. E ainda, a fim de verificar a reprodutibilidade dos padrões obtidos foram realizadas repetições das amplificações em 25% das amostras escolhidas aleatoriamente.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão SB na presença de marcador 100 bp DNA Ladder, a 100 V e 80 mA, por cerca de 70 min. Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 mg/L), visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados. As imagens dos géis foram editadas e analisadas utilizando-se o *software* GelCompar II versão 5.1 (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium), no qual o padrão de bandas dos indivíduos foi convertido em uma matriz binária de dados. Atribuiu-se o valor 0 (zero) à ausência de determinada banda (*locus*), e à presença da mesma foi atribuído o valor 1 (um). Os dados faltantes foram codificados como -1 (menos

um). O *software* FAMD 1.31 (Schlüter e Harris 2006) foi utilizado para converter e exportar a matriz binária para os diferentes formatos requeridos em cada um dos programas utilizados nas análises.

Para identificação de *loci* com valores *outliers* de F_{ST} , que poderiam potencialmente estar ligados a genes, foram usados métodos bayesianos e baseados em frequências através dos *softwares* BayeScan 2.1 (Foll e Gaggiotti 2008) e Mcheza (Antao e Beaumont 2011), respectivamente. No BayeScan, foi utilizada razão de chance de três para um ($PO = 3; K = 10^{-1/2}$), valor que segundo a escala de Jeffreys (1961) seria uma evidência substancial de rejeição da hipótese nula de ausência de seleção, considerando taxa de erro do tipo I (*false discovery rate*; FDR) de 0,05. No *software* Mcheza, que utiliza uma modificação do FDIST (Beaumont e Nichols 1996) para dados dominantes, foram realizadas 50.000 simulações para gerar uma distribuição nula de estimativas de F_{ST} sob expectativas neutras, utilizando um intervalo de confiança de 0,95.

2.2.2 Diversidade Genética

Para marcadores dominantes, uma das possibilidades para obtenção das frequências alélicas é assumir equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações (ex. Lynch e Milligan 1994). O método mais comumente utilizado estima a frequência do alelo-nulo tirando a raiz quadrada da fração de indivíduos sem determinada banda (Nybom 2004). No entanto, esta forma de calcular frequências alélicas dá estimativas enviesadas (Lynch e Milligan 1994) e por isto, foi utilizada apenas para propósitos de comparação com outros trabalhos.

O método desenvolvido por Zhivotovsky (1999) que calcula a frequência dos alelos-nulos por inferência bayesiana funciona melhor quando há desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este método foi utilizado com auxílio do *software* FAMD 1.31 (Schlüter e Harris 2006) usando *non-uniform prior distribution* estimando os parâmetros dos dados entre as

populações (*among-population prior*) e a partir destas frequências foi calculada a heterozigosidade média esperada dos *loci*. A heterozigosidade para cada *locus* foi calculada utilizando a fórmula $H_e = 2q_ji (1 - q_ji)$ no Microsoft Excel 2010 (Microsoft; Redmond, Washington); onde q é a frequência do alelo nulo na população j no *locus* i e a heterozigosidade média (H_e) foi calculada retirando a média de todos os *loci*. Também no FAMD foram calculados a proporção de *loci* polimórficos (%P) e o número de bandas exclusivas e fixadas por população (BP e BF, respectivamente).

2.2.3 Estrutura populacional

Há apenas dois *softwares* que permitem realizar estimativas do coeficiente de endogamia $f(F_{IS})$ a partir de dados dominantes. O primeiro método a ser descrito (Holsinger et al. 2002) por vezes mostra estimativas enviesadas, principalmente devido a características intrínsecas dos marcadores dominantes e pelo procedimento de selecionar apenas marcadores polimórficos por parte dos pesquisadores (Foll et al. 2008), o que é uma prática comum na maioria dos trabalhos com marcadores dominantes (Nybom 2004). Foll et al. (2008) desenvolveram o software ABC4F que corrige estes vieses e medidas de F_{ST} e F_{IS} individuais para cada população, como uma forma de levar em conta as diferenças no histórico populacional (Balding 2003), por isto este software foi utilizado para calcular estas estatísticas. O programa foi parametrizado assumindo viés de *loci* oculto (*hidden loci bias*) de 1, e sem viés para *loci* fixados (*fixed loci bias* = 0), uma vez que não foi aplicada nenhum valor de frequência de corte para a escolha dos *loci* ISSR. Demais opções foram mantidas na configuração padrão do programa.

A AMOVA (Excoffier et al. 1992) foi realizada no software GenAlEx 6.5 (Peakall e Smouse 2012), que permite testar a significância estatística do parâmetro, a fim de verificar se o valor obtido é apenas efeito da amostragem (Holsinger e Weir 2009). Para tal, foi

contrastado o valor do parâmetro com uma distribuição de valores calculados com amostragens randômicas do conjunto de dados total, a qual foi construída com 999 replicações (aleatorizações). Também foram conduzidas análises de divergência tomando as diferentes populações par-a-par e o fluxo gênico entre os pares de populações foram calculados a partir destes valores ϕ_{ST} (ver Schmidt e Jensen 2000).

Para obter-se uma representação estrutural da diversidade genética das populações amostradas, foi utilizado o *software* STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003, 2007). Foi selecionado o modelo de mistura (*admixture model*, indivíduos podem ter ancestralidade derivada de mais de uma população), com frequências alélicas correlacionadas e utilizando o parâmetro *a priori* LOCPRIOR. Foram estimados os valores de α (Hubisz et al 2009) para cada população, uma vez que estas não foram igualmente representadas na amostra, e de λ (Evanno et al. 2005) e r (índice de informação do local de coleta; Hubisz et al. 2009). Foram realizadas 20 corridas independentes para um conjunto de valores para K (número de clusters) variando de um até número de populações iniciais mais três (K 1-7), como recomendado por Evanno et al. (2005). Todas as corridas foram baseadas em 500.000 repetições MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) após 200.000 de período de *burn-in*.

Os resultados das análises do STRUCTURE foram analisados na interface web do programa Structure Harvester (Earl e vonHoldt 2012), onde é possível observar gráficos para decisão do valor mais apropriado para K com base no ΔK , conforme Evanno et al. (2005). Subsequentemente, foi usado o programa CLUMPP v 1.1.2 (Jakobsson e Rosenberg 2007) para agrupar as 20 réplicas em apenas uma matriz; para tal foi utilizado o método *fullsearch* com estatística G' para a matriz de similaridade par-a-par. O programa Distruct 1.1 (Rosenberg 2004) gerou os gráficos para as matrizes produzidas no CLUMPP.

Foi realizada análise de agrupamento para os dados moleculares, utilizando o método de duas etapas (Liu e Zhao 2006), uma primeira visando reduzir as dimensões dos dados,

realizada por meio de análise de coordenadas principais, seguida de análise de agrupamento gaussiano (Reeves et al. 2007; Reeves e Richards 2009). Agrupamento gaussiano é o mais indicado para inferir grupos de espécies quando se utiliza dados dominantes (Hausdorf e Hennig 2010). Inicialmente foi realizada a análise de coordenadas principais (Gower 1966) no software PAST 3.15 (Hammer et al 2001) utilizando o índice de similaridade de Jaccard (1901) como recomendado para dados dominantes por Link et al (1995), com expoente de transformação = 6. Para análise de agrupamento foram usados os dez primeiros eixos de coordenadas principais, realizado com auxílio do pacote mclust 5.3 (Scrucca et al. 2016) do software R (R Core Team 2017). Foi selecionado o modelo que melhor se ajusta aos dados com base em BIC (*Bayesian Information Criterion*), sendo registrado o número ideal de grupos inferidos e a classificação de cada um dos indivíduos nestes grupos. O teste de razão de verossimilhança foi realizado para avaliar o número de componentes com significância estatística aproximada por meio de *bootstrap* paramétrico com 999 replicações. Também foi utilizado o software Distruct 1.1 pra gerar os gráficos para os agrupamentos.

Para avaliar a existência de associação entre as distâncias genética e geográfica foi utilizado o Teste de Mantel (1967) de correspondência entre as matrizes de distância genética não enviesada de Nei (1978) e de distância geográfica (km) entre as populações, gerada a partir de coordenadas geográficas (X, Y). Este teste foi realizado no software GenAlEx 6.5, onde as matrizes também foram produzidas. Para testar a significância da associação R_{xy} encontrada, foram executadas 999 permutações da coordenada Y e mantendo a coordenada X inalterada a fim de obter uma estimativa do R_{xy} esperada numa hipótese nula onde não há correlação entre as matrizes. A hipótese nula é rejeitada quando o valor observado é maior que os valores das permutações ao menos em 95% dos casos.

A influência de prováveis barreiras ao fluxo gênico entre as populações foi analisada no software Barrier v2.2 (Manni et al. 2004). Foi utilizada a matriz de distância genética de

Nei (1971) e apenas a primeira barreira mais provável foi inferida, uma vez que esta é a mais importante. O nível de significância das barreiras inferidas foi avaliado a partir de 1000 replicações de *bootstrap* da matriz de dados original produzidas. As matrizes foram calculadas no software AFLP-SURV 1.0 (Vekemans 2002), com frequências alélicas obtidas utilizando o método de Zhivotovsky (1999) com *uniform prior*.

2.3 Resultados

Seis *primers* dos 22 testados foram selecionados para verificar a diversidade e estruturação genética nas populações de *Anomochloa marantoidea*, todos ancorados na porção 3' (CHRIS, 899, 843; JOHN; MANNY e ISSR-4). Através destes, 60 *loci* foram obtidos, que variaram entre 200 e 1500 pb, dos quais 59 se mostraram polimórficos e foram analisados (Tabela 2). As amostras que foram amplificadas duas vezes apresentaram perfil eletroforético idêntico, demonstrando a reprodutibilidade dos padrões gerados pela presente análise.

Na detecção de *loci outliers*, tanto o método bayesiano (BayeScan) quanto o baseado em frequência (Mcheza) não detectaram nenhum *loci* como candidato a estar sob algum tipo de seleção, portanto todos os 59 *loci* polimórficos foram utilizados nas análises posteriores. Dados faltantes corresponderam a 1,8% da matriz final.

A heterozigosidade média esperada utilizando o método da raiz quadrada em nível de espécie foi $\bar{H}_e = 0,22$, enquanto o método bayesiano estimou $\bar{H}_e = 0,27$. Os níveis de diversidade encontrados foram muito similares nas quatro populações analisadas, sendo encontrados os seguintes valores: na população da Serra do Padeiro (SP), $H_e = 0,28$; Fazenda Santa Rosa (SR), $H_e = 0,25$; km5, $H_e = 0,27$ e km15, $H_e = 0,27$ (Tabela 1). Um teste de Kruskal-Wallis que não detectou diferença significativa nos valores de heterozigosidade (H_e) das diferentes populações ($\chi^2 = 1,42$; g.l. = 3; $p = 0,7$). Tais valores também não foram correlacionados aos tamanhos populacionais [$F(3, 232) = 0,37242$, $p = 0,7$] (Figura 2). Quanto

ao percentual de *loci* polimórficos, foram encontrados os seguintes valores: na população SR, P= 86%, P=78% na população km15; P= 59% em SR e P= 46% na população km5. O número de bandas fixadas foi 3 na população SR (5%), 4 na km15 (6%), 10 na SP (17%) e 12 (20%) na km5. As populações km15 e SR apresentaram duas e oito bandas exclusivas, respectivamente (Tabela 1).

Os valores de F_{ST} estimados para cada localidade variaram entre 0,248 e 0,488 e os valores para F_{IS} entre 0,567 e 0,729 (Tabela 1). A AMOVA estimou a divergência entre as populações $\phi_{ST} = 0,18$ ($p=0,01$) (18%), e 82% da variação total dentro das populações (Tabela 3). Os valores ϕ_{ST} das populações par-a-par variaram entre 0,12-0,21 e foram significantes em todas as comparações ($p<0,05$), sendo as maiores distâncias inferidas entre a população SR e as demais, e a menor entre as populações km5 e km15. O fluxo gênico estimado (N_{em}) entre os pares de populações variou entre 0,92-1,87 (Tabela 4).

As análises de estruturação e a de agrupamento indicaram o mais provável número de grupos $K=2$ ($\Delta K = 2$), significando dois grupos genéticos, ou dois *pools* gênicos. Todas as populações contêm os dois grupos em diferentes proporções. Os resultados do STRUCTURE para o parâmetro r foi 2,2 [corrida com maior $\ln P(D)$]. As representações gráficas de ambos os métodos de agrupamento, incluindo as classificações de cada indivíduo nos dois grupos inferidos, podem ser vistas na Figura 3.

O teste de Mantel não mostrou associação significativa entre distância genética de Nei e distância geográfica tomando as populações par-a-par ($R_{xy}= 0,309$; $p= 0,430$). A análise de barreiras ao fluxo gênico inferiu a primeira barreira genética em torno da população SR, separando-as das demais, com alta significância inferida pelas 1000 matrizes, dado que esta barreira se posiciona de forma a criar um isolamento desta população (Figura 1).

2.4 Discussão

2.4.1 A raridade de *Anomochloa marantoidea* e suas consequências

Anomochloa marantoidea foi incluída entre as plantas raras do Brasil (Oliveira et al. 2009; Thomas 2007) e o conhecimento sobre a mesma durante muitas décadas foi baseado apenas em duas pequenas populações, sendo que mais duas foram recentemente registradas durante nossos estudos com modelagem de nicho ecológico (Vieira et al. Cap. 1). Mesmo que tenham sido realizados esforços para amostrar o maior número possível de indivíduos nas quatro populações conhecidas, infelizmente poucos foram encontrados na maioria delas, o que reforça o nível de ameaça de extinção que a espécie enfrenta. Como em muitos estudos de diversidade genética de espécies ameaçadas (ex. Fischer e Matthies 1998; Schmidt e Jensen 2000; González-López et al. 2014), uma das populações de *Anomochloa marantoidea* (km15) apresenta tamanho amostral que pode ser considerado pequeno para estudos genéticos em populações naturais, mas como há poucas populações remanescentes, resolvemos incluir todas no estudo.

2.4.2 Diversidade genética

Os dados aqui apresentados sobre a diversidade genética de *Anomochloa marantoidea* estão baseados em 59 *loci* polimórficos. A decisão de incluir ou não dados de *loci* monomórficos pode interferir substancialmente nos parâmetros de diversidade genética calculados (Nybom e Bartish 2000). No entanto, como verificado por Nybom (2004) em sua compilação de parâmetros de genética de populações inferidos para diversos grupos de plantas com base em marcadores dominantes (AFLP, RAPD e ISSR), valores de H_e obtidos nos diferentes estudos não foram afetados pela escolha do marcador nem pelo número de indivíduos amostrados por população. Desta forma, resultados de diferentes estudos podem ser comparados, desde que tenham sido utilizados os mesmo critérios para seleção de *loci*.

Ainda segundo a autora, a maioria dos trabalhos utiliza apenas marcadores polimórficos para calcular a diversidade genética intraespecífica. Assim, a fim de garantir que os dados deste trabalho pudessem ser comparados com outros da literatura, este critério também foi aqui adotado.

A diversidade genética de uma espécie é fortemente correlacionada a aspectos intrínsecos, como ciclo de vida, tipo de sucessão ecológica e comportamento reprodutivo (Hamrick e Godt 1996, 1996b; Charlesworth 2003, Ourborg et al. 1999). A estimativa de heterozigosidade média esperada para *Anomochloa marantoidea* ($\bar{H}_e = 0,22$) é comparável ao encontrado em plantas que apresentaram os maiores níveis diversidade genética por Nybom (2004), que foram encontrados em espécies perenes, tardias no processo de sucessão ecológica e que apresentam reprodução exclusivamente por cruzamento. A partir do que se conhece de tais características ecológicas para *A. marantoidea*, pode concluir-se que estas estão de acordo com o H_e encontrado. A espécie é perene e, a partir de informações de habitat e modelagem de nicho ecológico, concluiu-se que a mesma seja tardia no processo de sucessão ecológica, uma vez que é adaptada a ambientes sombreados e depende da existência de árvores altas, não suportando altos níveis de radiação solar (Pohl 1977; Judziewicz et al. 1999, Vieira et al. Cap. 1).

Entretanto, pouco se sabe sobre o comportamento reprodutivo dessa espécie até o momento. As gramíneas são tradicionalmente citadas como exemplo de plantas polinizadas pelo vento (Connor, 1987), especialmente as espécies ocorrentes em ambientes abertos, campestres. O vento é conhecidamente um facilitador da autopolinização (Culley et al. 2002), o que levaria a uma diminuição na H_e nas espécies que possuem esse tipo de polinização. No entanto, vários trabalhos com gramíneas ocorrentes no interior de florestas tropicais indicam a possibilidade de outro tipo de polinização, principalmente devido ao baixo fluxo de correntes de ar no sub-bosque de florestas, enquanto é descrita ampla visitação de insetos às flores de

bambus e outras Poaceae florestais (Soderstrom e Calderón 1971; Dórea 2011; Sajo 2008). Sajo et al. (2012) estudaram aspectos morfológicos e ontogenéticos das inflorescências de *Anomochloa marantoidea* e sugeriram que polinização anemófila é realmente pouco provável nessa espécie, uma vez que a estrutura de suas anteras se assemelha à de plantas que apresentam *buzz pollination*. Porém, nenhum estudo mais detalhado ligado à sua polinização nem potenciais polinizadores foram indicados por esses autores.

A espécie apresenta flores hermafroditas e é dicogâmica, mais precisamente protogínica, pois o gineceu amadurece antes do androceu (Judziewicz e Soderstrom 1989; Judziewicz et al. 1999). Este mecanismo está presente em muitas outras linhagens antigas de angiospermas, sendo indicado como condição ancestral nesse grupo (Lora et al. 2011). A dicogamia pode ser interpretada como uma forma de dificultar a autogamia e promover a reprodução cruzada (Dai e Galloway 2011) e ainda que em espécies dicogâmicas também possa ocorrer autopolinização (ex. dicogamia incompleta), ela ocorre em menor proporção (Lloyd e Webb 1986; Lora et al. 2011). A heterozigosidade média indicada por Nybom (2004) para espécies de reprodução cruzada é de 0,27, e para plantas com sistema reprodutivo misto 0,18. Assim, a heterozigosidade encontrada em *A. marantoidea* (0,22), pode ser considerada intermediária entre estes dois sistemas de reprodução.

Além de ter relação com aspectos da biologia das espécies, a diversidade genética pode ser depauperada em espécies ameaçadas de extinção, que comumente apresentam menor diversidade genética que espécies taxonomicamente próximas não ameaçadas (Spielman et al. 2004). Como *A. marantoidea* é uma espécie evolutivamente isolada, os únicos estudos de diversidade genética em espécies relacionadas foram realizados com bambus (subfamília Bambusoideae). Quando comparada a outras Poaceae que também ocorrem nas florestas do Leste do Brasil, a heterozigosidade média esperada para *A. marantoidea* foi mais baixa que aquela encontrada para *Raddia portoi* Kuhl. (0,27), uma espécie provavelmente alógama

que ocorre em florestas associadas ao bioma Caatinga e em áreas adjacentes à Mata Atlântica (Braz et al. 2012), e superior à encontrada em *Eremits* spp. (0,156) (Ferreira et al. 2012), um gênero de espécies ameaçadas, endêmico da Mata Atlântica, mas no qual a autogamia é o modo de reprodução mais provável.

Os resultados de H_e encontrados para *Anomochloa marantoidea* se mostram elevados também quando comparados com aqueles de outras gramíneas de regiões diferentes, como para espécies do gênero eurasiático de bambus *Dendrocalamus* Nees. Para *D. giganteus* Munro foi encontrada baixa diversidade genética (0,0418), a qual os autores atribuíram à propagação clonal da espécie (Tian et al. 2011). Por outro lado, *D. membranaceus* Munro apresentou alta diversidade genética (0,219), sendo esta relacionada ao longo ciclo de vida, reprodução cruzada e poliploidia (Yang et al. 2012). Na espécie do velho mundo *Elymus sibiricus* L. (Pooideae), foi encontrada heterozigosidade média esperada de 0,18, sendo esta uma espécie perene com sistema reprodutivo misto (Ma et al. 2012).

Estes resultados revelaram que espécies de gramíneas nas quais ocorre autopolinização em algum grau apresentam menor diversidade genética e sugerem que os valores relativamente altos de H_e de *A. marantoidea* podem ser consequência de um sistema de reprodução cruzada e esta espécie, ou teve parte de sua diversidade reduzida devido às consequências do pequeno número de indivíduos nas populações, ou ainda ocorre autopolinização em baixas proporções.

Espera-se associação entre tamanho populacional e diversidade em nível intraespecífico, mas muitas vezes essa correlação é menor para H_e que para número de alelos e *loci* polimórficos (Frankham 1996; Fischer e Matthies 1998; Allendorf et al. 2013, Ellstrand e Elam 1993). Quando isso ocorre, pode ser interpretado como uma evidência de deriva genética, e não endogamia, está causando variação genética em populações pequenas (Ellstrand e Elam 1993; Leimu et al. 2006). Outra explicação pra tal falta de relação pode

ocorrer devido a características do histórico populacional, por exemplo, quando há diferença entre o tamanho populacional atual e o histórico (ex. Ouborg e van Treuren, 1995; Schmidt & Jensen 2000). Ademais, uma vez que a heterozigosidade é perdida lentamente ao longo das gerações [$\Delta h = -1/(2N)$ por geração], um efeito gargalo recente ou do qual a população se recuperou rapidamente pode não ser detectável através de diversidade genética quando esta é medida utilizando H_e (Allendorf 1986; Hedrick et al., 1986; Barret e Kohn 1991; Luikart et al. 1998).

Este pode ser o caso das populações de *Anomochloa marantoidea*. Para a população km15, por exemplo, registros em herbários (*TS dos Santos e EJ Judziwicz 4266 CEPEC*) indicam que esta contava com mais de oitenta indivíduos no ano de 1986, e já no ano de 2015, apesar do grande esforço para encontrar o maior número de indivíduos possível, foram localizados menos de 20. Uma vez que a espécie é perene e pode potencialmente apresentar sobreposição de gerações, pode-se concluir que sua heterozigosidade diminuiu pouco desde o efeito gargalo que ocorreu em algum momento nestes 29 anos que separam as duas observações à população.

Efeitos-gargalo apresentam maior impacto na variabilidade populacional quando esta é medida como diversidade de alelos e *loci* polimórficos (Leberg 1992; Barret e Kohn 1991; Luikart et al., 1998; Leimu et al. 2006). A proporção de *loci* polimórficos (P) foi maior nas maiores populações, confirmando esta teoria e indicando que as três populações menores sofreram (e talvez ainda sofram) efeito gargalo. Marcadores dominantes têm natureza bialélica (Wolfe e Liston 1998), de modo que não é possível fazer profundas discussões sobre a diversidade de alelos nas populações. Entretanto, um indicativo de existência de alelos exclusivos pode ser notado pelo fato de que bandas exclusivas foram encontradas nas populações com o maior número de indivíduos (SR e km15), e não foram encontradas nas populações menores (km5 e SP); indicando uma relação entre número de alelos por *locus* e

tamanho populacional. Ao contrário de H_e , que possui valores para cada *loci*, não foi possível testar tal correlação, uma vez que não há observações suficientes para realização dos testes estatísticos.

2.4.3 Estruturação populacional

Os valores de endogamia intrapopulacional (F_{IS}) encontrados para *Anomochloa marantoidea* foram altos. É mais provável que este resultado esteja correlacionado com cruzamento entre indivíduos aparentados, já que a espécie apresenta mecanismos que conhecidamente reduzem a autopolinização. Assim como a heterozigosidade média esperada, os índices de endogamia encontrados aqui também não se mostraram correlacionados com o tamanho das populações. Leimu et al. (2006) verificaram que em vários estudos o nível de endogamia é independente do tamanho populacional. Os índices F_{IS} e H_e encontrados aqui estão correlacionados com a presença de estrutura genética intrapopulacional (tal qual em Gaudeul et al. 2000 e Palacios et al. 2009) como inferida pelo STRUCTURE e pela análise de agrupamento. Todas as populações apresentam os dois *pools* gênicos, e aquelas que os apresentam em proporções semelhantes são aquelas com os menores índices de endogamia. O índice de informação do local de coleta $r > 1$ indica que os grupos genéticos não refletem a subdivisão inicial de quatro populações e que não há correlação da localidade das populações com a ancestralidade dos indivíduos (Hubisz et al. 2009).

O valor de diferenciação populacional inferido utilizando o análogo ao F_{ST} , $\phi_{ST} = 0,18$ bem como a significância estatística encontrada no teste de permutação da AMOVA indica que as populações de *Anomochloa marantoidea* não são pan-míticas e revela uma diferenciação moderada entre estas, como geralmente é considerado para valores $F_{ST} > 0,15$ (Wright 1978, Hartl e Clark 1997, Frankham et al. 2002; 2010); um valor acima de 0,2 é interpretado como suficiente para causar fixação de diferentes alelos nas populações (fluxo

gênico < 1 migrante por população) (Wright 1931; Frankham et al. 2002; Waples 2010). Ainda que Hedrick (1999) tenha demonstrado que o valor de estruturação populacional pode ser por vezes enviesado, suas observações se aplicam a marcadores com mais de dois alelos (como microssatélites), o que não é o caso dos ISSR.

Como a deriva genética geralmente não é a mesma em todas as populações como é considerado em um cálculo de estatísticas-F-global, é de grande utilidade calcular também valores F_{ST} específicos para cada uma destas populações. Nesta análise de estruturação, a população SR apresentou o menor F_{ST} (0,248) e conteve a maior parte do *pool* gênico que não está presente nas outras populações. Num modelo de fissão populacional (Balding 2003), menores valores de F_{ST} indicam menor diferenciação em relação à população original (anterior à fragmentação) (Foll et al. 2008). Isso pode estar relacionado com o fato de que a população SR é a mais preservada em número de indivíduos, possivelmente sofrendo menos os efeitos da deriva em relação às demais, e conseqüentemente sofrendo menos alterações alélicas que as outras quando comparadas à população original.

O fluxo gênico calculado entre as populações de *Anomochloa marantoidea* indica que migrantes entre as populações encontra-se bem próximo ao número de um por geração, suficiente para prevenir a diferenciação total entre estas em determinado *loci* (Wright 1931). Apesar de diversas críticas, o critério de “um migrante por geração” é largamente utilizado para definir ESUs (*Evolutionarily Significant Unit*) em manejos de espécies ameaçadas, uma vez que o método de transplantação recíproca proposto por Crandall et al. (2000) é impraticável para a maioria das espécies ameaçadas. No entanto, um migrante é considerado o número mínimo desejável para manter a coesão entre populações em equilíbrio; pequenas populações podem necessitar entre um e dez migrantes por geração para compensar os efeitos da deriva (Mills e Allendorf 1996; Lopez et al. 2009).

O fluxo gênico está diretamente relacionado à capacidade de dispersão dos indivíduos de uma espécie. Em Poaceae, a seleção de mecanismos especializados para dispersão do fruto evoluiu diversas vezes em muitos grupos, e assim a família apresenta as mais diversas formas de dispersão animal, pelo vento e pela água (Davidse 1986). Os dispersores de *Anomochloa marantoidea* ainda são desconhecidos, mas Judziewicz e Soderstrom (1989) tentaram identificar mecanismos de dispersão em seus diásporos. Ao contrário das plantas dos gêneros relacionados *Streptochoeta* Schrad. ex Nees e *Pharus* P. Browne, que apresentam ganchos para dispersão epizoocórica, nenhum mecanismo foi encontrado em *A. marantoidea*. Os autores sugeriram que esta poderia ser a causa da ocorrência restrita da espécie, ao contrário dos membros dos outros gêneros, e que os diásporos de *A. marantoidea* poderiam conter óleos que atraem formigas. A presença de óleos foi posteriormente comprovada por Judziewicz et al. (1999). A presença de elaiosomos é geralmente interpretada como um indicativo de mirmecocoria, sendo este um tipo de dispersão que surgiu independentemente em várias famílias de monocotiledôneas, incluindo Poaceae (Dunn et al. 2007; Lengyel et al. 2010). No entanto, este método de dispersão ainda é subestimado nos estudos da família e carece de investigações mais aprofundadas. Se realmente for o caso para *A. marantoidea*, mirmecocoria é um dos modos mais limitados de dispersão conhecido, raramente excedendo os 10 m (Vittoz e Engler 2007), o que reforça a ideia de fluxo gênico restrito entre populações.

No modelo assumido no cálculo de estatísticas-F, a diferenciação entre as populações pode ser causada pelo balanço entre fluxo gênico e deriva ou apenas pelos efeitos aleatórios da deriva sobre a frequência dos alelos, sendo a mutação considerada insignificante. Tais estatísticas e seus análogos podem confundir o evento que causa esta diferenciação, principalmente na ausência de equilíbrio regional (Hutchison e Templeton 1999; Landguth et al. 2010), como foi verificado em *Anomochloa marantoidea* pelo teste de Mantel. Em populações recentemente fragmentadas, o fluxo gênico calculado pode estar recuperando

processos históricos ao invés do atual (ex. Zawko et al. 2001), uma vez que podem ser necessárias centenas de gerações para que o F_{ST} atinja o equilíbrio quando o fluxo gênico cessa (Slatkin e Barton 1989; Landguth et al. 2010).

Em populações em equilíbrio os efeitos da deriva são pequenos (Frankham et al. 2002), mas quando as populações são pequenas (<100 indivíduos), as frequências alélicas podem apresentar flutuações imprevisíveis podendo sobrepor o efeito da seleção natural, mesmo em *loci* sujeitos a seleção (Rich et al. 1979; Barrett e Kohn 1991; Ellstrand e Elam 1993). Quando a deriva genética é o principal fator causando estruturação populacional numa espécie, é esperado que valores de diversidade tais como número de alelos por *loci* (N) e proporção de *loci* polimórficos (P), menos comumente H_e , devem ser maiores em populações com maior número de indivíduos (Ellstrand e Elam 1993), como foi verificado para as populações de *Anomochloa marantoidea*. Se a diferença encontrada entre as populações é primariamente causada por deriva, estas estão mais isoladas que aparentam e esta diferenciação tende a aumentar com o tempo de isolamento (Hedrick 2005). Desta forma, o número de migrantes por geração entre as populações da espécie podem ser muito menores que os calculados.

Outros resultados encontrados indicam que apesar de próximas, as populações provavelmente estão isoladas geneticamente uma das outras. Todas as populações deste estudo apresentaram bandas fixadas, com uma quantidade considerável de alelos com frequência 1 na população (dados não mostrados). A proporção de bandas fixadas foi bem maior nas menores populações, km5 e SP apresentaram 20% e 17% dos *loci* com bandas fixadas, respectivamente, enquanto as populações maiores (SR e km15) as apresentaram na proporção de apenas 5-6% . Isto pode ser interpretado como uma evidência da ação da deriva genética e do baixo fluxo gênico na fixação de alelos. A análise de barreiras indicou o isolamento genético da maior população (SR), inclusive com distância genética considerável

da população geograficamente mais próxima (km5), que está a apenas 600m de distância, corroborando a ausência de equilíbrio regional indicada pelo teste de Mantel.

2.5 Considerações finais e estratégias para conservação de *Anomochloa marantoidea*

As populações analisadas dessa espécie encontram-se exatamente entre duas áreas de proteção ambiental, mas não estão compreendidas nos limites destas, então muito provavelmente a primeira medida a ser tomada deve ser preservar as áreas onde atualmente a espécie ocorre. Três das quatro populações ocorrem na Terra Indígena Tupinambá de Olivença, uma área de proteção proposta que ainda não foi legalmente reconhecida pelo governo do Brasil. Com as populações protegidas é possível partir para medidas de conservação da sua diversidade genética.

Genótipos heterozigotos apresentam vantagem sobre homozigotos, e assim a heterozigosidade média esperada geralmente é uma boa medida da resposta imediata à seleção natural esperada em populações, por exemplo, logo após um efeito-gargalo (Allendorf 1986; Lesica e Allendorf 1992). De acordo com Lesica e Allendorf (1992), populações remanescentes e pequenas de plantas que passam por *stress* moderado podem reter mais heterozigosidade que o que se espera intuitivamente, apresentando alta capacidade para planos de conservação. Os valores de heterozigosidade média esperada para *Anomochloa marantoidea* sugerem que a fragmentação no habitat da espécie é recente e que a espécie tem capacidade para responder imediatamente bem em curto prazo a este rápido declínio que vem passando relacionados à evidente perda de habitat decorrentes de atividade humana, indicando que um plano de conservação pode ser eficiente em manter a atual diversidade específica. As populações apresentam altos níveis de endogamia e a diminuição da diversidade ainda não é detectável com base em heterozigosidade, mas os efeitos em longo prazo decorrentes da perda de alelos e depressão endogâmica são esperados se um manejo adequado da espécie não for

realizado, visando à restauração genética e o aumento do tamanho efetivo das populações, preservando a heterozigosidade e a diversidade de alelos presentes (Allendorf e Luikart 2009; Lopez et al. 2009).

Os altos níveis de endogamia detectados provavelmente estão correlacionados a cruzamentos entre indivíduos aparentados que ocorrem agrupados, dado o pequeno tamanho da maioria das populações e a provável baixa capacidade de dispersão de propágulos da espécie. A depressão endogâmica é um dos principais problemas que plantas raras e em populações fragmentadas enfrentam. Endogamia é o fator genético que mais limita a capacidade de reintrodução, principalmente por aumentar a homozigose recessiva para alelos deletérios, que normalmente são mantidos em baixas frequências em populações grandes e em equilíbrio (Heschel e Paige 1995; Vilas et al. 2006). Se a espécie for realmente poliploide, os efeitos danosos da depressão endogâmica levarão mais tempo para serem notados, uma vez que espécies deste tipo tem sua heterozigosidade diminuída mais lentamente que espécies diploides (Bever e Felber 1992), já que alelos deletérios precisariam estar presentes em mais de duas cópias do mesmo *locus* para que um homozigoto recessivo seja formado. Porém, é recomendado monitorar os componentes de *fitness*, como número de flores e sementes por população, taxa de sobrevivência, etc., para uma predição mais confiável do nível de endogamia nas populações. É possível que o tamanho das plantas também seja um bom indicador, já que em habitat natural as plantas são mais altas que em cultivo (Judziewicz e Soderstrom 1989).

A translocação de mais de um migrante por geração seria indicada nestes casos, pois há riscos de depressão endogâmica e os fatores demográficos indicam alto risco de extinção local (Mills e Allendorf 1996). Se por um lado, translocação de indivíduos entre populações aumenta a persistência de pequenas populações (“efeito resgate”) (Brown e Kodric-Brown 1977; Richards 2000; Hedrick e Kalinowski 2009; Tallmon et al. 2004) e é desejada para

reduzir risco de endogamia, deve-se também avaliar os riscos de depressão exogâmica, que geralmente ocorre quando as populações são muito diferenciadas geneticamente por adaptação ambiental (Frankham et al. 2011). Porém, em pequenas escalas geográficas e com populações pequenas o risco de depressão exogâmica é mínimo, pois o material a ser introduzido na população não é advindo de uma distância suficiente para que adaptação local tenha ocorrido (Ellstrand e Elam 1993; Lopez et al. 2009; Frankham et al. 2011).

A maior variância na espécie encontra-se dentro das populações e todas compartilham os dois *pools* gênicos, sugerindo que podem ser consideradas apenas uma unidade de manejo, não sendo necessária uma gestão específica para cada população. Propágulos ou transplantes para suplementação das populações que apresentam poucos indivíduos devem ser obtidos da maior população (SR), pois esta apresenta maior diversidade genética potencial para sobrevivência em longo prazo, bem como a maior proporção de um dos *pools* gênicos. O estabelecimento de novas populações é também uma alternativa quando os atuais sítios apresentam mudanças com as quais a espécie não pode se adaptar (Smith et al. 2014), estas podem ser fundadas em áreas já preservadas próximas às populações originais que contém nicho adequado já inferido por modelagem ecológica (Vieira et al. Cap. 1), com propágulos obtidos das populações km15 e SR, como forma de manter os dois *pools* gênicos nas populações, uma vez que populações miscigenadas apresentam maior vigor (Weeks et al. 2011). Baseando-se na população de maior polimorfismo, novas populações devem conter por volta de 100 indivíduos para manter os níveis de variação genética.

REFERÊNCIAS

- Allendorf FW (1986) Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo Biol* 5:181–190.
- Allendorf FW, Luikart G (2009) Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom.

- Allendorf FW, Luikart G, Aitken SN (2013) Conservation and the genetics of populations, 2nd ed. John Wiley & Sons.
- Antao T, Beaumont MA (2011) Mcheza: a workbench to detect selection using dominant markers. *Bioinformatics* 27:1717. doi: 10.1093/bioinformatics/btr253
- Balding DJ (2003) Likelihood-based inference for genetic correlation coefficients. *Theor Popul Biol* 63:221–30.
- Barrett S, Kohn J (1991) Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: Donald A. Falk and Kent E. Holsinger (eds) *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, pp 3–30.
- Beaumont MA, Nichols RA (1996) Evaluating Loci for Use in the Genetic Analysis of Population Structure. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* 263:1619–1626. doi: 10.1098/rspb.1996.0237
- Bever JD, Felber F (1992) The theoretical population genetics of autopolyploidy. In: Douglas Futuyma and Janis Antonovics (eds) *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. Oxford University Press, pp 185–217
- Bouchenak-Khelladi Y, Verboom GA, Savolainen V, Hodkinson TR (2010) Biogeography of the grasses (Poaceae): a phylogenetic approach to reveal evolutionary history in geographical space and geological time. *Bot. J. Linn. Soc.* 162:543–557.
- Braz M (2012) Variabilidade genética em populações de *Raddia* Bertol. (Poaceae, Bambusoideae) inferida por marcadores moleculares ISSR. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Bremer K, Baum D (2002) Gondwanan evolution of the grass alliance of families (Poales). *Evolution* 56:1374–1387. doi: 10.1554/0014-3820(2002)056[1374:GEOTGA]2.0.CO;2
- Brody JR, Kern SE (2004) Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36:214–217.
- Brown JH, Kodric-Brown A (1977) Turnover Rates in Insular Biogeography: Effect of Immigration on Extinction. *Ecology* 58:445–449. doi: 10.2307/1935620
- Burke SV, Lin C-S, Wysocki WP, et al. (2016) Phylogenomics and plastome evolution of tropical forest grasses (*Leptaspis*, *Streptochoeta*: Poaceae). *Front. Plant Sci.* 7:1–12
- Charlesworth D (2003) Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* 358:1051–70.
- Clark LG, Zhang W, Wendel JF (1995) A Phylogeny of the Grass Family (Poaceae) Based on *ndhF* Sequence Data. *Syst Bot* 20:436–460.
- Clark LV, Jasieniuk M (2011) polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Mol. Ecol. Resour.* 11:562–566. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.02985.x

- Connor HE (1987) Reproductive Biology in the Grasses. In Soderstrom TR, Hilu KW, Campbell CS, Barkworth ME (eds) Grass Systematics & Evolution, pp. 118-131.
- Costa R, Pereira G, Garrido I, et al. (2016) Comparison of RAPD, ISSR, and AFLP Molecular Markers to Reveal and Classify Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) Germplasm Variations. PloS One 11:1-15.
- Crandall KA, Bininda-Emonds OR, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. Trends Ecol. Evol. 15: 290-295.
- Culley TM, Weller SG, Sakai AK (2002) The evolution of wind pollination in angiosperms. Trends Ecol. Evol. 17:361–369.
- Dai C, Galloway LF (2011) Do dichogamy and herkogamy reduce sexual interference in a self-incompatible species? Funct. Ecol. 25:271–278. doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01795.x
- Davidse G (1987) Fruit dispersal in the Poaceae. Grass systematics and evolution: an International Symposium held at the Smithsonian Institution, Washington, DC, 27-31 July 1986. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, pp 143–155
- DeSalle R, Amato G (2004) The expansion of conservation genetics. Nat. Rev. Genet. 5:702. doi 10.1038/nrg1425
- Dórea MC (2011) Morfologia polínica fenologia reprodutiva e biologia floral de espécies florestais de Poaceae. Tese, Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19:11–15.
- Dunn RR, Gove AD, Barraclough TG, et al. (2007) Convergent evolution of an ant–plant mutualism across plant. Evol. Ecol. Res. 9:1349–1362.
- Duvall MR, Morton BR (1996) Molecular Phylogenetics of Poaceae: An Expanded Analysis of *rbcL* Sequence Data. Mol. Phylogenet. Evol. 5:352 – 358. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/mpev.1996.0030>
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conserv. Genet. Resour. 4:359–361.
- Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 24:217–242.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol. Ecol. 14:2611–2620.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131:479–91.

- Fajardo CG, de Almeida Vieira F, Felix LP, Molina WF (2017) Negligence in the Atlantic forest, northern Brazil: a case study of an endangered orchid. *Biodivers. Conserv.* 26:1047–1063. doi: 10.1007/s10531-016-1285-5
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567–1587. doi:10.3410/f.1015548.197423
- Falush D, Stephens M, Pritchard, JK. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol. Notes* 7: 574–578. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x
- Fang D, Roose M (1997) Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95:408–417.
- Fang D, Roose M, Krueger R, Federici C (1997) Fingerprinting trifoliate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95:211–219.
- Ferreira FM (2012). Filogenia da subtribo Parianinae e sistemática de *Eremitis* Döll (Poaceae: Bambusoideae: Olyreae). Tese, Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Fischer M, Matthies D (1998) RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *Am J Bot* 85:811–811.
- Foll M, Beaumont MA, Gaggiotti O (2008) An approximate Bayesian computation approach to overcome biases that arise when using amplified fragment length polymorphism markers to study population structure. *Genetics* 179:927–939.
- Foll M, Gaggiotti O (2008) A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective. *Genetics* 180:977–93. doi: 10.1534/genetics.108.092221
- Frankham R (1995) Conservation genetics. *Annu Rev Genet* 29:305–327.
- Frankham R (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conserv. Biol.* 10:1500–1508.
- Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biol. Conserv.* 126:131–140. doi: 10.1016/j.biocon.2005.05.002
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2010) Introduction to conservation genetics, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Frankham R, Ballou JD, Eldridge MDB, et al. (2011) Predicting the probability of outbreeding depression. *Conserv Biol* 25:465–75. doi: 10.1111/j.1523-1739.2011.01662.x
- Frankham R, Briscoe DA, Ballou JD (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

- Gaudeul M, Taberlet P, Till-Bottraud I (2000) Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Mol. Ecol.* 9:1625–1637.
- Gaut BS, Peek AS, Morton BR, Clegg MT (1999) Patterns of genetic diversification within the *Adh* gene family in the grasses (Poaceae). *Mol. Biol. Evol.* 16:1086–1097.
- González-López O, Polanco C, György Z, et al. (2014) Genetic variation of the endangered *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca* (Gentianaceae) in populations from the Northwest Iberian Peninsula. *Int. J. Mol. Sci.* 15:10052–10066. doi: 10.3390/ijms150610052
- Gower JC (1966) Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53:325–338. doi: 10.1093/biomet/53.3-4.325
- Gupta M, Chyi YS, Romero-Severson J, Owen JL (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89:998–1006. doi: 10.1007/BF00224530
- Hammer Ø, Harper D, Ryan P (2001) Paleontological statistics software: Package for education and data analysis. *Palaeontol. Electronica* 4:1-9
- Hamrick JL, Godt MJW (1996a) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* 351:1291-1298. doi: 10.1098/rstb.1996.0112
- Hamrick JL, Godt MJW (1996b) Conservation Genetics of Endemic Plant Species. In: John C. Avise and James L. Hamrick (ed) *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Springer US, pp 281–304
- Hartl DL, Andrew GC (1997) *Principles of population genetics*, 4th ed. Sinauer associates, Sunderland, United States.
- Hausdorf B, Hennig C (2010) Species Delimitation Using Dominant and Codominant Multilocus Markers. *Syst. Biol.* 59:491. doi: 10.1093/sysbio/syq039
- Hedrick PW (1999) Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53:313–318.
- Hedrick PW (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59:1633–1638. doi: <http://dx.doi.org/10.1554/05-076.1>
- Hedrick PW, Kalinowski ST (2000) Inbreeding depression in conservation biology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst* 31:139–162.
- Heschel MS, Paige KN (1995) Inbreeding depression, environmental stress, and population size variation in scarlet gilia (*Ipomopsis aggregata*). *Conserv. Biol.* 9:126–133.
- Hilu KW (2004) Phylogenetics and chromosomal evolution in the Poaceae (grasses). *Aust. J. Bot.* 52:13–22.

- Hunziker JH, Wulff AF, WULF A, SODERSTROM TR (1989) Chromosome studies on *Anomochloa* and other Bambusoideae (Gramineae). *Darwiniana* 41–45.
- Holsinger KE, Lewis PO, Dey DK (2002) A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Mol. Ecol.* 11:1157–64.
- Holsinger KE, Weir BS (2009) Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nat. Rev. Genet.* 10:639–650.
- Huang Y, Zhang C-Q, Li D-Z (2009) Low genetic diversity and high genetic differentiation in the critically endangered *Omphalogramma souliei* (Primulaceae): implications for its conservation. *J. Syst. Evol.* 47:103–109.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol. Ecol. Resour.* 9:1322–32. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x
- Hutchison DW, Templeton AR (1999) Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53:1898–1914.
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44:223–270.
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801–1806.
- Jeffreys H (1961) *Theory of Probability*, 3rd ed. Oxford University Press, London.
- Jiménez JF, López-Romero C, Rosselló J, Sánchez-Gómez P (2017) Genetic diversity of *Narcissus tortifolius*, an endangered endemic species from Southeastern Spain. *Plant Biosyst.* 151:117–125. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/11263504.2015.1108937>
- Judziewicz EJ, Soderstrom TR (1989) Morphological, anatomical, and taxonomic studies in *Anomochloa* and *Streptochaeta* (Poaceae: Bambusoideae). *Smithsonian Contributions to Botany* 68:1–52.
- Keller LF, Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol. Evol.* 17:230–241.
- Kellogg EA (2000) The grasses: a case study in macroevolution. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 31:217–238.
- Knox JS, Bezold K, Cabe PR, et al. (2016) Genetic Diversity and Population Structure of the Endemic Disjunct Species, *Helenium virginicum* (Asteraceae). *The American Midland Naturalist* 175:242–260. doi: <https://doi.org/10.1674/0003-0031-175.2.242>

- Krajewski C (1991) Phylogeny and Diversity. *Science* 254:918–918. doi: 10.1126/science.254.5034.918-a
- Kronholm I, Loudet O, de Meaux J (2010) Influence of mutation rate on estimators of genetic differentiation - lessons from *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genet.* 11:33. doi: 10.1186/1471-2156-11-33
- Landguth EL, Cushman SA, Schwartz MK, et al. (2010) Quantifying the lag time to detect barriers in landscape genetics. *Mol Ecol* 19:4179–91. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04808.x
- Leberg PL (1992) Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution* 46:477–494. doi: 10.1111/j.1558-5646.1992.tb02053.x
- Leimu R, Mutikainen P, Koricheva J, Fischer M (2006) How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? *J. Ecol.* 94:942–952.
- Lengyel S, Gove AD, Latimer AM, et al. (2010) Convergent evolution of seed dispersal by ants, and phylogeny and biogeography in flowering plants: a global survey. *Perspect. Plant Ecol.* 12:43–55.
- Lesica P, Allendorf FW (1992) Are small populations of plants worth preserving? *Conserv. Biol.* 6:135–139. doi: 10.1046/j.1523-1739.1992.610135.x
- Lian C, Oishi R, Miyashita N, et al. (2003) Genetic structure and reproduction dynamics of *Salix reinii* during primary succession on Mount Fuji, as revealed by nuclear and chloroplast microsatellite analysis. *Mol. Ecol.* 12:609–618. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01756.x
- Link W, Dixkens C, Singh M, et al. (1995) Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 90:27–32.
- Liu N, Zhao H (2006) A non-parametric approach to population structure inference using multilocus genotypes. *Hum. Genomics* 2:353. doi: 10.1186/1479-7364-2-6-353
- Lloyd DG, Webb C (1986) The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms I. *Dichogamy.* *N. Z. J. Botan.* 24:135–162.
- Lopez S, Rousset F, Shaw FH, et al. (2009) Joint effects of inbreeding and local adaptation on the evolution of genetic load after fragmentation. *Conserv. Biol.* 23:1618–27. doi: 10.1111/j.1523-1739.2009.01326.x
- Lora J, Herrero M, Hormaza JI (2011) Stigmatic receptivity in a dichogamous early-divergent angiosperm species, *Annona cherimola* (Annonaceae): Influence of temperature and humidity. *Am. J. Bot.* 98:265–274. doi: 10.3732/ajb.1000185
- Lu P-L, Yorkson M, Morden CW (2016) Population Genetics of the Endemic Hawaiian Species *Chrysodracon hawaiiensis* and *Chrysodracon auwahiensis* (Asparagaceae):

- Insights from RAPD and ISSR Variation. *Int. J. Mol. Sci.* 17:1341. doi: 10.3390/ijms17081341
- Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3:91–9.
- Ma X, Chen S, Bai S, et al. (2012) RAPD analysis of genetic diversity and population structure of *Elymus sibiricus* (Poaceae) native to the southeastern Qinghai-Tibet Plateau, China. *Genet. Mol. Res.* 11:2708–2718.
- Manni F, Guerard E, Heyer E (2004) Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Hum. Bio.* 76:173–190.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27:209–220.
- Mason-Gamer RJ, Weil CF, Kellogg EA (1998) Granule-bound starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility. *Mol. Biol. Evol.* 15:1658–1673.
- Meirmans PG, Hedrick PW (2011) Assessing population structure: FST and related measures. *Mol. Ecol. Resour.* 11:5–18. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02927.x
- Mengoni A, Gori A, Bazzicalupo M (2000) Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breeding* 119:311–317. doi: 10.1046/j.1439-0523.2000.00501.x
- Michalakis Y, Excoffier L (1996) A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* 142:1061–1064.
- Mills LS, Allendorf FW (1996) The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conserv. Biol.* 10:1509–1518.
- MMA (Ministério do Meio Ambiente) (2008) Instrução Normativa n. 6, de 23 de setembro de 2008. Espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção e com deficiência de dados. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil* 75–83.
- Narzary D, Rana TS, Ranade SA (2010) Genetic diversity in inter-simple sequence repeat profiles across natural populations of Indian pomegranate (*Punica granatum* L.). *Plant Biol. (Stuttg)* 12:806–13. doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00273.x
- Nei M (1977) F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41:225–233.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583–90.

- Nunes C, Setotaw T, Pasqual M, et al. (2017) *Myrciaria dubia*, an Amazonian fruit: population structure and its implications for germplasm conservation and genetic improvement. *Genet. Mol. Res.* doi: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16019409>
- Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* 13:1143–55.
- Nybom H, Bartish IV (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspect. Plant. Ecol.* 3:93–114.
- Nybom H, Weising K, Rotter B (2014) DNA fingerprinting in botany: past, present, future. *Investig. Genet.* 5:1. doi: 10.1186/2041-2223-5-1
- Obbard DJ, Harris SA, Pannell JR (2006) Simple allelic-phenotype diversity and differentiation statistics for allopolyploids. *Heredity* 97:296–303.
- Oliveira RP, Longhi-Wagner HM, Filgueiras TS, Mota AC, Viana PL (2009) Poaceae. *Plantas Raras do Brasil. Conservação Internacional and Universidade Estadual de Feira de Santana*, p 326-340.
- Ouborg NJ, Piquot Y, Van Groenendael J (1999) Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *J. Ecol.* 87:551–568.
- Ouborg NJ, Van Treuren R (1995) Variation in fitness-related characters among small and large populations of *Salvia pratensis*. *J. Ecol.* 83:369–380.
- Palacios C, Kresovich S, González-Candelas F (1999) A population genetic study of the endangered plant species *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Mol. Ecol.* 8:645–657.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460
- Pohl RW (1977) Cultivation of Tropical Rain Forest Grasses. *Ann. Bot.* 41:665–666.
- Powell W, Machray GC, Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1:215–222.
- Prasad V, Strömberg C, Leaché A, et al. (2011) Late Cretaceous origin of the rice tribe provides evidence for early diversification in Poaceae. *Nat. Commun.* 2:1-10.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- R Core Team (2017) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Reddy PM, Sarla N, Siddiq E (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9–17.

- Reeves PA, Richards CM (2009) Accurate Inference of Subtle Population Structure (and Other Genetic Discontinuities) Using Principal Coordinates. *PLoS One* 4:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0004269
- Reeves PA, Richards CM, Paterson A (2007) Distinguishing Terminal Monophyletic Groups from Reticulate Taxa: Performance of Phenetic, Tree-Based, and Network Procedures. *Syst. Biol.* 56:302. doi: 10.1080/10635150701324225
- Rich S, Bell A, Wilson S (1979) Genetic drift in small populations of *Tribolium*. *Evolution* 33:579–584.
- Richards CM (2000) Inbreeding depression and genetic rescue in a plant metapopulation. *Am. Nat.* 155:383–394.
- Robertson A, Rich TCG, Allen AM, et al. (2010) Hybridization and polyploidy as drivers of continuing evolution and speciation in *Sorbus*. *Mol. Ecol.* 19:1675–1690. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04585.x
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Mol. Ecol. Resour.* 4:137–138.
- Sajo MG, Longhi-Wagner HM, Rudall PJ (2008) Reproductive morphology of the early-divergent grass *Streptochaeta* and its bearing on the homologies of the grass spikelet. *Plant Syst. Evol.* 275:245. doi: 10.1007/s00606-008-0080-5
- Sajo MG, Pabón-Mora N, Jardim J, et al. (2012) Homologies of the flower and inflorescence in the early-divergent grass *Anomochloa* (Poaceae). *Am. J. Bot.* 99:614–628.
- Sankar AA, Moore GA (2001) Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 102:206–214. doi: 10.1007/s001220051637
- Schlüter PM, Harris SA (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Notes* 6:569–572. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01225.x
- Schmidt K, Jensen K (2000) Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components. *Am. J. Bot.* 87:678–689.
- Scrucca L, Fop M, Murphy TB, Raftery AE (2016) mclust 5: Clustering, classification and density estimation using gaussian finite mixture models. *The R Journal* 8: 289.
- Silva HN, Hall AJ, Rikkerink E, et al. (2005) Estimation of allele frequencies in polyploids under certain patterns of inheritance. *Heredity* 95:327–334.
- Slatkin M, Barton NH (1989) A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43:1349–1368.

- Smith TB, Kinnison MT, Strauss SY, et al. (2014) Prescriptive Evolution to Conserve and Manage Biodiversity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 45:1–22.
- Soderstrom TR (1984) In quest of the pygmy bamboos. *Fairchild Tropical Garden Bulletin* 39:6-15.
- Soderstrom TR, Calderón CE (1971) Insect Pollination in Tropical Rain Forest Grasses. *Biotropica* 3:1–16.
- Spielman D, Brook BW, Frankham R (2004) Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *PNAS* 101:15261–15264. doi: 10.1073/pnas.0403809101
- Squirrell J, Hollingsworth P, Woodhead M, et al. (2003) How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Mol. Ecol.* 12:1339–1348.
- Tallmon DA, Luikart G, Waples RS (2004) The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends Ecol. Evol. (Amst.)* 19:489–96.
- Tero N, Aspi J, Siikamäki P, et al. (2003) Genetic structure and gene flow in a metapopulation of an endangered plant species, *Silene tatarica*. *Mol. Ecol.* 12:2073–2085.
- Thomas WW (2007) Survival of the rarest. *Natural History* 116:24–27.
- Tian B, Yang H-Q, Wong K-M, et al. (2012) ISSR analysis shows low genetic diversity versus high genetic differentiation for giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* (Poaceae: Bambusoideae), in China populations. *Genet. Resour. Crop. Ev.* 59:901–908.
- Vekemans X (2002) AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- Vézquez DP, Gittleman JL (1998) Biodiversity conservation: does phylogeny matter? *Curr. Biol.* 8:379–381.
- Vilas C, San Miguel E, Amaro R, Garcia C (2006) Relative contribution of inbreeding depression and eroded adaptive diversity to extinction risk in small populations of shore campion. *Conserv. Biol.* 20:229–238.
- Vittoz P, Engler R (2007) Seed dispersal distances: a typology based on dispersal modes and plant traits. *Bot. Helv.* 117:109–124.
- Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol. Ecol.* 15:1419–1439. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.02890.x
- Weeks AR, Sgro CM, Young AG, et al. (2011) Assessing the benefits and risks of translocations in changing environments: a genetic perspective. *Evol. Appl.* 4:709–725. doi: 10.1111/j.1752-4571.2011.00192.x
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.

- Whitlock MC (2011) G'_{ST} and D do not replace F_{ST} . *Mol. Ecol.* 20:1083–91. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04996.x
- Wolfe AD, Liston A (1998) Contributions of PCR-Based Methods to Plant Systematic Biology. In: Soltis, Douglas E. and Soltis, Pamela S. and Doyle, Jeff J. (eds) *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*. Springer US, Boston, MA, pp 43–86.
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16:97-159.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28:114.
- Wright S (1949) The genetical structure of populations. *Ann. Eugenetic.* 15:323–354. doi: 10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395–420.
- Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 4: Variability Within and Among Natural Populations*. The University of Chicago Press, Chicago, IL:
- Yang H-Q, An M-Y, Gu Z-J, Tian B (2012) Genetic diversity and differentiation of *Dendrocalamus membranaceus* (Poaceae: Bambusoideae), a declining bamboo species in Yunnan, China, as based on inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 13:4446–4457.
- Zawko G, Krauss SL, Dixon KW, Sivasithamparam K (2001) Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae). *Mol. Ecol.* 10:2389–96.
- Zhivotovsky LA (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Mol. Ecol.* 8:907–13.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176–183.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig. 1 Localidades das populações e barreiras genéticas inferidas. A barreira em laranja representa aquela inferida a partir dos dados reais e as azuis bem como os valores sobre estas representam a medida de suporte via 1000 replicações *bootstrap*. A espessura das barreiras é proporcional ao suporte.

Fig. 2 Relação entre censo das populações (N) e diversidade genética (H_e). Barras verticais denotam intervalos de confiança de 95%.

Fig. 3 Representação gráfica da estrutura de quatro populações de *Anomochloa marantoidea*. Resultado do STRUCTURE para $k=2$, onde cada barra vertical representa um indivíduo (a). Resultado da análise de agrupamento gaussiano mostrado a proporção de cada um dos *pools* gênicos nas populações. Cores diferentes representam diferentes *pools* gênicos (b). Para código das populações veja a Tabela 1.

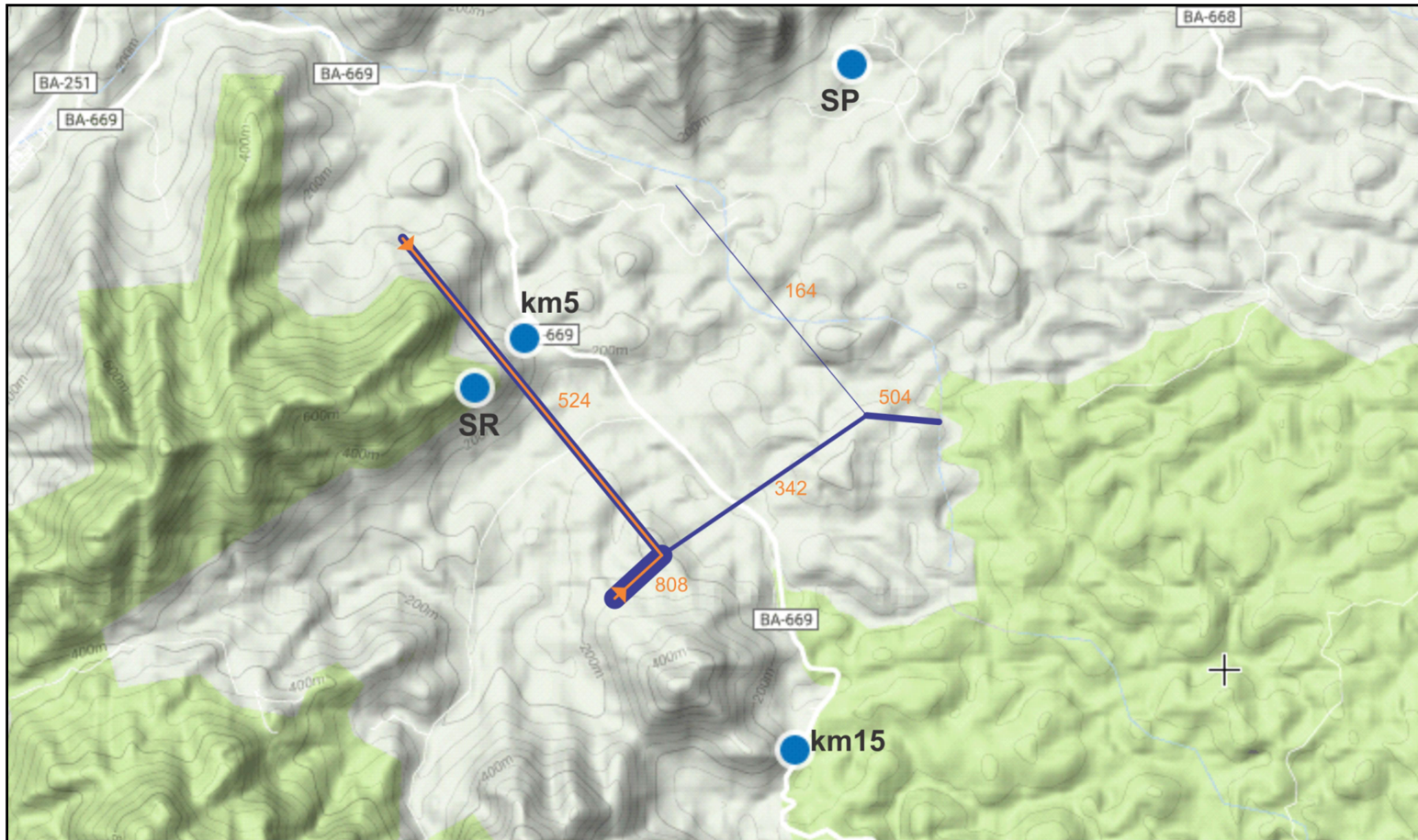


Figura 1

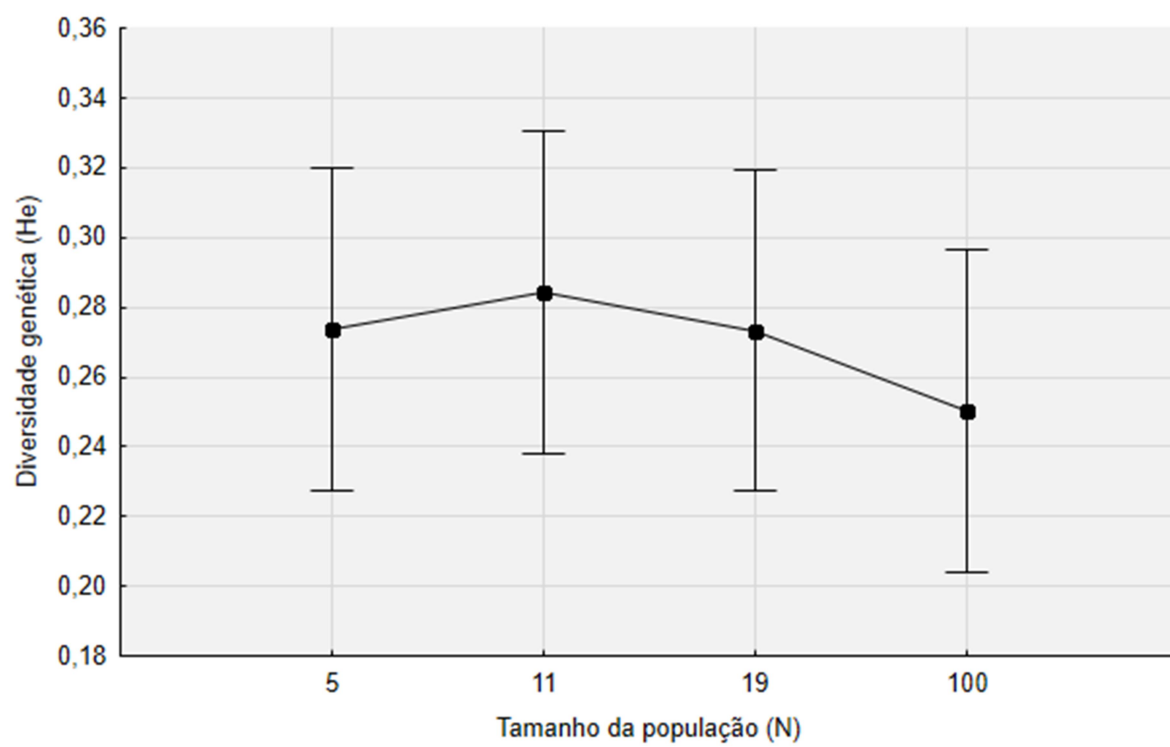


Figura 2

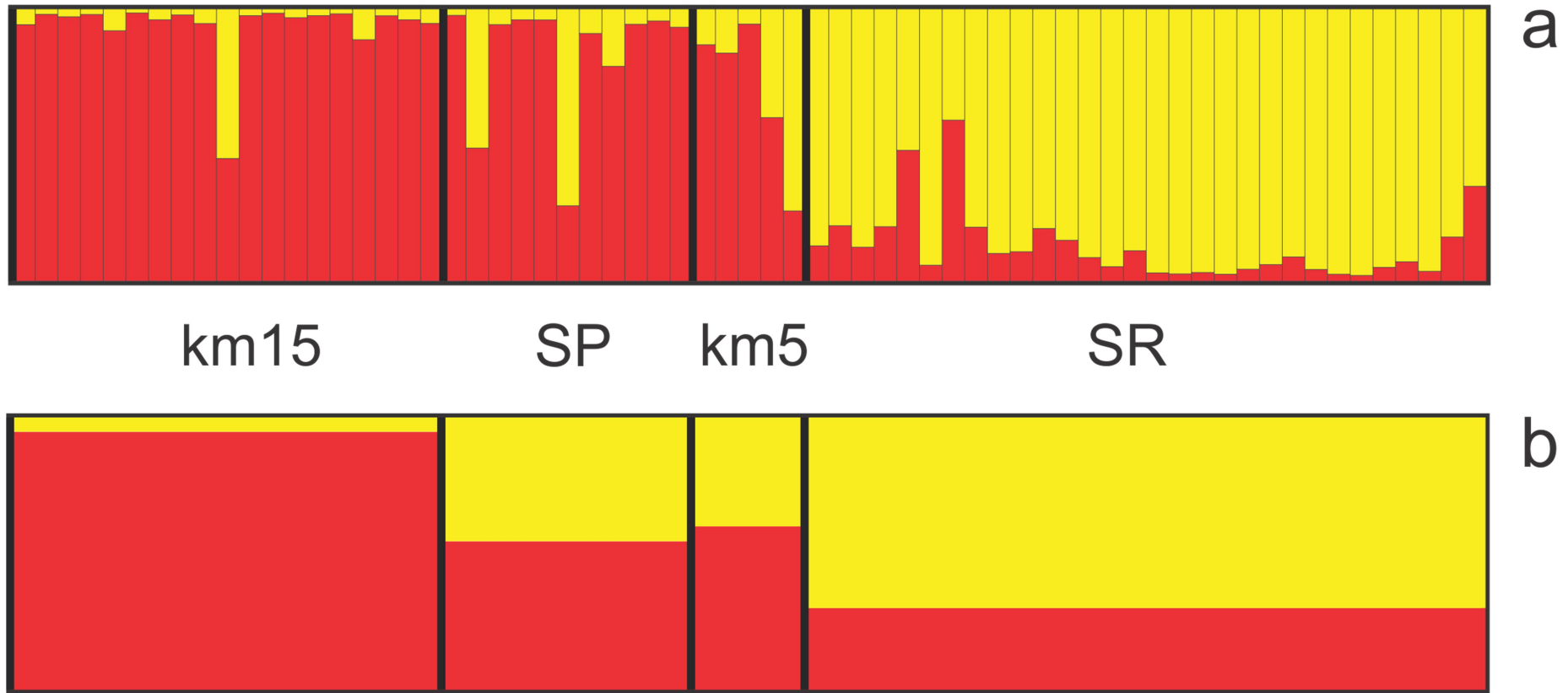


Figura 3

Tabela 1. Códigos e localizações das populações de *Anomochloa marantoidea*. Medidas de diversidade genética para todos os *loci* analisados, em cada população e total. n = tamanho da amostra (n=número total de indivíduos (N) em todas as populações, exceto para SR onde N > 100);%P = porcentagem de *loci* polimórficos; BE= bandas exclusivas; H_e = heterozigosidade média; BF= bandas fixadas; %BF = porcentagem de bandas fixadas; F_{IS} = coeficiente de endogamia; F_{ST} = diferença em relação à população ancestral

Localização	Código	n	Voucher	%P	BE	BF	%BF	H_e	F_{IS}	F_{ST}
km 5 BA-669	km5	5	--	46	0	12	20	0,27	0,634	0,488
km 15 BA-669	km15	19	R.P.Oliveira et al. 2233	78	2	4	6	0,27	0,729	0,308
(HUEFS)										
Serra do Padeiro	SP	11	J.G.Jardim & J.P.S.Vieira 6786	59	0	10	17	0,28	0,567	0,447
(CEPEC)										
Fazenda Santa Rosa	SR	30	J.P.S.Vieira et al. 1 (HUEFS)	86	8	3	5	0,25	0,621	0,248
Média				67,25				0,27	0,64	0,37

Tabela 2. *Primers* ISSR utilizados para inferir diversidade e estruturação genética de *Anomochloa marantoidea*

<i>Primers</i>	Sequências (5'-3')	Número de <i>loci</i>	Número de <i>loci</i> polimórficos
CHRIS	(CA) ₇ -YG	10	10
899	(CA) ₆ -RG	7	7
843	(CT) ₈ -RA	12	11
JOHN	(AG) ₇ -YC	5	5
MANNY	(CAC) ₄ -RC	10	10
ISSR-4	(GA) ₈ -YC	16	16
Total		60	59

Tabela 3. Análise molecular de variância (AMOVA) para 65 indivíduos de *Anomochloa marantoidea*

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Variância	Porcentagem da variação	p
Entre populações	3	87,948	1,543	18	0,001
Dentro das populações	61	428,114	7,018	82	
Total	64	516,062	8,561		

Tabela 4. Resultados de ϕ_{ST} par-a-par entre as populações de *Anomochloa marantoidea* ($p < 0,05$ para todos os resultados) abaixo da diagonal. Acima da diagonal, valores de fluxo gênico ($N_e m$).

População	km15	SP	km5	SR
km15		1,745	1,881	0,996
SP	0,125		1,868	0,923
km5	0,117	0,118		1,316
SR	0,201	0,213	0,160	

CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho buscou aumentar o conhecimento relacionado à distribuição, habitat e localização de novas populações da espécie mais antiga da família Poaceae, *Anomochloa marantoidea* (Anomochlooideae), além de obter dados sobre os níveis de diversidade genética da mesma. Tais informações são necessárias para o estabelecimento de planos de conservação para essa espécie, considerada criticamente ameaçada pelos critérios da IUCN pela distribuição restrita à região de Una no Sul da Bahia, ao diminuto número de populações e indivíduos conhecidos e principalmente pela perda de habitat relacionada às atividades de agricultura e pecuária do sul da Bahia, como plantio de cacau, banana e pupunha, além da constante ampliação de áreas para pastagem.

Por meio da modelagem de nicho ecológico, pôde-se inferir que o micro endemismo da espécie no sul do estado da Bahia está limitado por rigorosas exigências ambientais. Assim como outras espécies de gramíneas da Mata Atlântica, *A. marantoidea* é altamente sensível à radiação solar e ao estresse hídrico, de modo que a cobertura vegetal e a precipitação são os principais fatores que modelam a extensão de sua distribuição geográfica. Por meio de modelagem preditiva, sítios adequados foram inferidos em áreas próximas às populações já conhecidas. Nenhuma das quatro populações localizadas até o momento, duas delas durante esse estudo, encontram-se em áreas protegidas legalmente. Estas ocorrem na área da Terra Indígena Tupinambá de Olivença, ainda não reconhecida legalmente como reserva ambiental. Cerca 35% dos sítios climaticamente adequados para a espécie estão em áreas legalmente protegidas, para as quais pode ser direcionado esforço de coleta para localizar outras possíveis novas populações e/ou podem ser utilizadas para o estabelecimento de populações por meio de cultivo.

A diversidade genética de *Anomochloa marantoidea* é reduzida nas menores populações, que devem ter sofrido recente efeito de gargalo. Características possivelmente intrínsecas da espécie, como reprodução cruzada, poliploidização e ciclo de vida perene podem ter desacelerado a velocidade dessa perda de diversidade ao longo das gerações, exibindo um quadro otimista para a eficácia de um plano de conservação. Porém, se medidas conservacionistas não forem rapidamente adotadas, os altos níveis de endogamia e a constante perturbação antrópica que acomete as populações podem rapidamente levar à extinção da espécie. Estratégias para conservar a diversidade genética dessa espécie incluem translocação de indivíduos entre as populações, na frequência de pelo menos um por geração, e o estabelecimento de novas populações por meio de propágulos obtidos das duas populações

que apresentam mais indivíduos, que são as que apresentaram maiores níveis de diversidade (km15 e SR). Grande esforço deve ser feito para manter as populações com um número mínimo de 100 indivíduos, de forma a reduzir a perda de alelos raros por deriva genética e diminuir a chance de homozigose para alelos deletérios que ocorrem em baixa frequência. Estudos que revelem componentes do *fitness* nas populações são necessários para complementar os presentes resultados sobre a diversidade genética e inferir qual o impacto desta diversidade sobre o sucesso reprodutivo da espécie. Estudos de variação genética quantitativa para *A. marantioidea* são também recomendados para determinar o potencial evolutivo da espécie de uma forma direta.