

WÉNITA DE SOUZA JUSTINO

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *Barbacenia pabstiana* L.B.SM. &
AYENSU (VELLOZIACEAE J. AGARDH) NOS INSELBERGS DA MATA
ATLÂNTICA DO SUDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Jéferson Nunes Fregonezi

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

J96d
2021 Justino, Wénita de Souza, 1993-
Diversidade e estrutura genética de *Barbacenia pabstiana*
L.B.SM. & Ayensu (Velloziaceae J. Agardh) nos inselbergs da Mata
Atlântica do Sudeste brasileiro / Wénita de Souza Justino. - Viçosa,
MG, 2021.
1 dissertação eletrônica (60 f.): il. (algumas color.).

Incluí anexos

Orientador: Jeferson Nunes Fregonezi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Vegetal, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.103>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Monocotiledônea. 2. Genética de populações. 3. Marcadores
moleculares. 4. Diversidade genética. 5. Mata Atlântica. I. Fregonezi,
Jeferson Nunes, 1978-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em
Botânica. III. Título.

CDD 22. ed. 584.66

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578


WÊNITA DE SOUZA JUSTINO

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *Barbacenia pabstiana* L.B.SM. &
AYENSU (VELLOZIACEAE J. AGARDH) NOS INSELBERGS DO SUDESTE
BRASILEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 07 de dezembro de 2021.

Assentimento:



Wênita de Souza Justino
Autora



Jéferson Nunes Fregonezi
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao departamento de Biologia Vegetal e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica pelo suporte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

À Neotropical Grassland Conservancy (NGC) pelo financiamento, crucial para realização das coletas dos dados de campo.

Ao meu orientador Jéferson por aderir à ideia de estudar uma parte dos afloramentos rochosos presentes nos *inselbergs* do meu amado estado do Espírito Santo.

Ao corpo docente do programa de pós-graduação em Botânica, em especial aos professores Andreza Neri, Aristéa Azevedo, João Meira, Luzimar Campos, Pedro Schwartsburd e Marcelo Rogalski, por toda assistência nos esclarecimentos de terminologias, usos de programas e advertências.

Aos amigos Camila David, Nathalia Silva e Gabriel Rodrigues pela ajuda primordial em campo, além das boas conversas e risadas que partilhamos nas viagens.

Aos amigos Isaque Coimbra e Lucas Dias por nos acolherem em seus lares, mesmo nos horários mais inoportunos!

Aos Ferreiras (Águia Branca); aos moradores da comunidade do Caparaó, a Carlos Sarnágli, Irene Sarnágli *in memoria*, José A. Binda e Julia Mageski (Itaguaçu); Alexandre Fortunato Ribeiro (Colatina); Francisco A. Fiorotti e William (Itarana); Renato C. Armini (Fundão); Tânia Bragatto, Dinah Lopes e José L. C. Vieira (Afonso Cláudio), pela assistência nas minhas coletas.

A todos os integrantes da UCP por me auxiliarem no uso dos equipamentos e por me receberem com bom humor, mesmo sendo às 6h50min da manhã!

A Maria Carolina Silva pela companhia, amizade e por todas as dicas desde a parte escrita até no incentivo para conhecer o movimento Negritude.

Ao Miguelito (Miguel Medeiros) por me ajudar na confecção da matriz de presença e ausência e na companhia durante os dias de trabalho árduo no herbário.

Aos alunos da Anatomia, em especial Clara Mouzella, José Danizete Miranda e Miller Sanches, por me auxiliar nos testes histoquímicos, na confecção de lâminas em resina, a solucionar as intempéries de laboratório e pela ótima companhia durante os cafezinhos.

Aos colegas do LEEP, em especial Neil Oliveira e Wendelo Costa, pelos papos cabeça nos rolês da ‘terça concreta’ e por me apresentar o carnaval de BH.

A Aurora Sato, Vanessa Miranda e Kéllen pelo suporte com os materiais de campo e laboratório. Ao incorruptível Celso Antônio e ao Marcus Araújo por alegrarem os meus dias durante a correria entre um experimento e outro.

Aos meus colegas de república, Herval e Larissa, por me socorrerem desde a ida para Viçosa, até com os imprevistos com meu notebook. E claro, por trazerem o nosso mascotinho Manchinha, que foi um ótimo companheiro nos momentos de solidão durante a quarentena.

Aos amigos Ronaldo Silva, Genilson Alves, João Victor Santos, Helenice Alves, Fabíola Ferreira, André Ricardo Rocha, Fernanda Lobão, Márcio Vêna e Adelson Gotti, por se tornarem minha família de Viçosa.

Aos meus pais, Adriana e Elifas, a minha mãe acadêmica Miriam Cristina A. Pereira, por me apoiar, incentivar e pelos puxões de orelha durante essa trajetória. E aos meus irmãos Brenno e Matheus, e de coração Juliana Krüger, em ouvir todos os meus desabafos, pelo carinho e companheirismo mesmo à distância.

Ao Rei eterno e imortal por sempre ser paráclito em minha vida, e por cumprir “pois d’Ele e por ELE e para ELE são todas as coisas”.

A todos, mesmo que indiretamente, me auxiliaram na realização deste trabalho. Deixo aqui a minha gratidão!

“O medo sempre me guiou para o que eu quero. E porque eu quero, temo. Muitas vezes foi o medo que me tomou pela mão e me levou.”

(Clarice Lispector)

RESUMO

JUSTINO, Wénita de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2021. **Diversidade e estrutura genética de *Barbacenia pabstiana* L.B.SM. & Ayensu (Velloziaceae J. Agardh) nos inselbergs do sudeste brasileiro.** Orientador: Jéferson Nunes Fregonezi.

Inselbergues são rochas monolíticas, de matriz granítica e/ou gnáissica, formadas a partir de escudos continentais cristalinos que detém alta diversidade de espécies. Muitas espécies pertencentes a família Velloziaceae que ocorrem formando tapetes nestes afloramentos rochosos estão bem adaptadas a condições ambientais adversas impostas por esses inselbergues, sendo restritas a essas comunidades rupícolas. *Barbacenia pabstiana* L.B.Sm. & Ayensu é uma espécie formadora de tapetes com distribuição restrita, tolerante à dessecação, em inselbergues do estado do Espírito Santo no sudeste do Brasil, com populações naturalmente fragmentadas. Neste trabalho utilizamos 12 fragmentos do marcador ISSR, utilizados em outras espécies pertencentes as famílias botânicas Velloziaceae, Orchidaceae e Bromeliaceae, ocorrentes nestes afloramentos rochosos, para avaliar a diversidade e estruturação genética de *B. pabstiana*. O número de locos polimórficos variou de 70,86–82,29%, a heterozigosidade esperada e o índice de Shannon não apresentaram diferenças significativas entre as populações, variando de 0,161–0,192 e 0,262–0,311, respectivamente. A população de Pedra da Lajinha apresentou os maiores valores de diversidade genética, e a análise de estruturação demonstra que esta população abriga diversidade de toda a variação genética encontrada na espécie. Assim sugerimos que esta população mereça especial atenção em futuras estratégias de conservação. Nossos resultados mostram alta similaridade gênica entre as populações distantes geograficamente sugerindo que o isolamento geográfico atual ainda não influenciou na estruturação genética das populações analisadas, e que estas populações estariam conectadas em períodos recentes. Este trabalho serve como auxílio em novos estudos sobre genética de populações em espécies pertencentes a família Velloziaceae, quanto a espécies de outras famílias botânicas presentes em afloramentos rochosos de inselbergues, a fim de nortear ações de conservação no futuro e promover novas investigações sobre processos de isolamento de populações.

Palavras-chave: Inselbergues. Mata Atlântica. Tapetes de monocotiledôneas. Genética de populações. ISSR. Diversidade genética

ABSTRACT

JUSTINO, Wénita de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2021. **Diversity and genetic structure of *Barbacenia pabstiana* L.B.SM. & Ayensu (Velloziaceae J. Agardh) in the inselbergs of southeastern Brazil.** Adviser: Jéferson Nunes Fregonezi.

Inselbergs are monolithic rocks, of granitic and/or gneissic matrix, formed from continental crystalline shields that hold a high diversity of species. Many species belonging to the Velloziaceae family that occur forming mats on these rocky outcrops are well adapted to the adverse environmental conditions imposed by these inselbergs, being restricted to these rupicolous communities. *Barbacenia pabstiana* L.B.Sm. & Ayensu is a mat-forming species with restricted distribution, tolerant to desiccation, in inselbergs of the state of Espírito Santo in southeastern Brazil, with naturally fragmented populations. In this work we used 12 fragments of the ISSR marker, used in other species belonging to botanical families Velloziaceae, Orchidaceae and Bromeliaceae, occurring in these rocky outcrops, to evaluate the genetic diversity and structure of *B. pabstiana*. The number of polymorphic loci ranged from 70.86-82.29%, the expected heterozygosity and Shannon index showed no significant differences among populations, ranging from 0.161-0.192 and 0.262-0.311, respectively. The Pedra da Lajinha population showed the highest genetic diversity values, and the structure analysis demonstrates that this population harbors diversity of all the genetic variation found in the species. Thus we suggest that this population deserves special attention in future conservation strategies. Our results show high genetic similarity among geographically distant populations, suggesting that the current geographic isolation has not yet influenced the genetic structure of the populations analyzed, and that these populations would be connected in recent periods. This work will help in new studies on population genetics of species belonging to the family Velloziaceae, as well as species of other botanical families present on rocky outcrops of inselbergs, in order to guide future conservation actions and to promote new investigations on processes of population isolation.

Keywords: Inselbergs. Atlantic Forest. Monocot mats. Population genetics. ISSR. Genetic diversity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	9
2. OBJETIVOS	19
3. ORIGINAL ARTICLE.....	20
RESUMO	21
ABSTRACT.....	22
INTRODUCTION.....	23
MATERIALS AND METHODS.....	25
RESULTS	30
DISCUSSION	35
CONCLUSION	41
ACKNOWLEDGMENTS.....	42
REFERENCES.....	43
SUPPLEMENTARY MATERIAL	47
4. CONCLUSÃO GERAL	53
5. REFERÊNCIAS GERAIS.....	54

1. INTRODUÇÃO GERAL

O continente sul-americano abriga uma das regiões de maior diversidade do planeta: a Floresta Atlântica. Este domínio originalmente cobria uma área de 1.315.460 km² e atualmente apresenta aproximadamente 12,4% de sua área original (SOS Mata Atlântica, 2019; Honnèf *et al.*, 2019). É composto por diferentes fitofisionomias com significativa diversidade de espécies, e tem prioridade em termos de conservação, dada a grande fragmentação a que está submetida, sendo assim incluída na lista de *hotspots* mundiais de biodiversidade (Batalha Filho & Miyaki, 2011; Mittermeier *et al.*, 2011; Neves *et al.*, 2017; Esser *et al.*, 2019).

Segundo a lei federal 11.428/2006 o domínio da Mata Atlântica *sensu lato* é constituído pelas seguintes formações nativas: Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista (mata de araucárias), Floresta Ombrófila aberta, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual, manguezais, vegetações de restinga, campos de altitude e brejos interioranos (encraves florestais nordestinos) (Tonhasca, 2005; Coutinho, 2006). Dentre os componentes de heterogeneidade vegetal e estrutural do domínio da Floresta Atlântica destacam-se os inselbergues (Schaefer, 2012; De Paula *et al.*, 2016).

Estas formações apresentam maior concentração na região Nordeste do Brasil, mas também estão incluídas na região Sudeste, englobando os estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, sul da Bahia e partes adjacentes de Minas Gerais. Os inselbergues da região sudeste possuem maior riqueza, diversidade e endemismos de plantas no mundo, seguidos de Madagascar e Sudoeste da Austrália (Porembski, 2007; Mello-Silva *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2015; De Paula *et al.*, 2016).

Segundo Porembski & Barthlott (2000), os inselbergues ("*insel*" = ilha e "*berg*" = montanha) são montanhas monolíticas do tipo graníticas ou gnáissicas, formadas a partir de escudos continentais cristalinos. Sua altura absoluta é bem variável, e sua área de superfície apresenta desde pequenos afloramentos cobrindo metros quadrados até grandes cúpulas estendendo-se por quilômetros (Figure 1) (Rodrigues *et al.*, 2019). O grau de isolamento geográfico também é variável, podendo ocorrer como montes isolados ao longo de centenas de quilômetros ou formando agrupamentos densos com afloramentos ímpares ocorrentes a distâncias de apenas alguns quilômetros (Bremer & Sander, 2000; Porembski, 2007; Maia & Bezerra, 2019).



Figura 1. Montanhas monolíticas abruptamente isoladas a partir da paisagem plana circundante. *Inselbergs* ocorrentes em Pancas, Espírito Santo. **Fonte imagem:** <https://altamontanha.com/as-montanhas-do-sertao/>

Os inselbergues apresentam condições ambientais extremas, como altas temperaturas, solo com substrato fino ou ausente e baixa retenção de água. Em termos florísticos, abrigam tipicamente vegetação rupícola exibindo muitas espécies endêmicas (Zappi et al., 2003; Conceição et al., 2005; Conceição & Pirani, 2007). Já em termos ecológicos, a composição e organização florística, varia de acordo com as regiões geográficas (De Paula et al., 2017; Gouvêa et al., 2020).

Dado aos fatores microclimáticos, como altas temperaturas, solo com substrato fino ou ausente e baixa retenção de água, os afloramentos rochosos presentes nos *inselbergs* apresentam adaptações específicas da vegetação, como por exemplo: folhas organizadas em roseta (Bromeliaceae), bulbos (Orchidaceae), cladódios (Cactaceae), e raízes adventícias (Velloziaceae) para retenção de água (Figura 2). E, pré-adaptações, como a homeohidria (plantas revivescentes, ou também chamadas de plantas ressurreição), que no início da estação chuvosa, reidratam suas folhas dessecadas (Cyperaceae, Velloziaceae e Musgos) (Conceição & Pirani, 2007; Porembski, 2007; Alcantara *et al.*, 2018) (Figura 3). Outra estratégia observada é a formação de aglomerados de manchas circulares, denominados tapetes de monocotiledôneas, onde a propagação vegetativa que forma os tapetes sobre a superfície da rocha, é através da agregação de matéria orgânica, o que facilita a chegada de novas espécies nos estágios iniciais da sucessão ecológica (Porembski *et al.*, 1998; Scarano, 2002; Medina *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Caifa & Silva, 2007; de Paula *et al.*, 2017) (Figura 2).

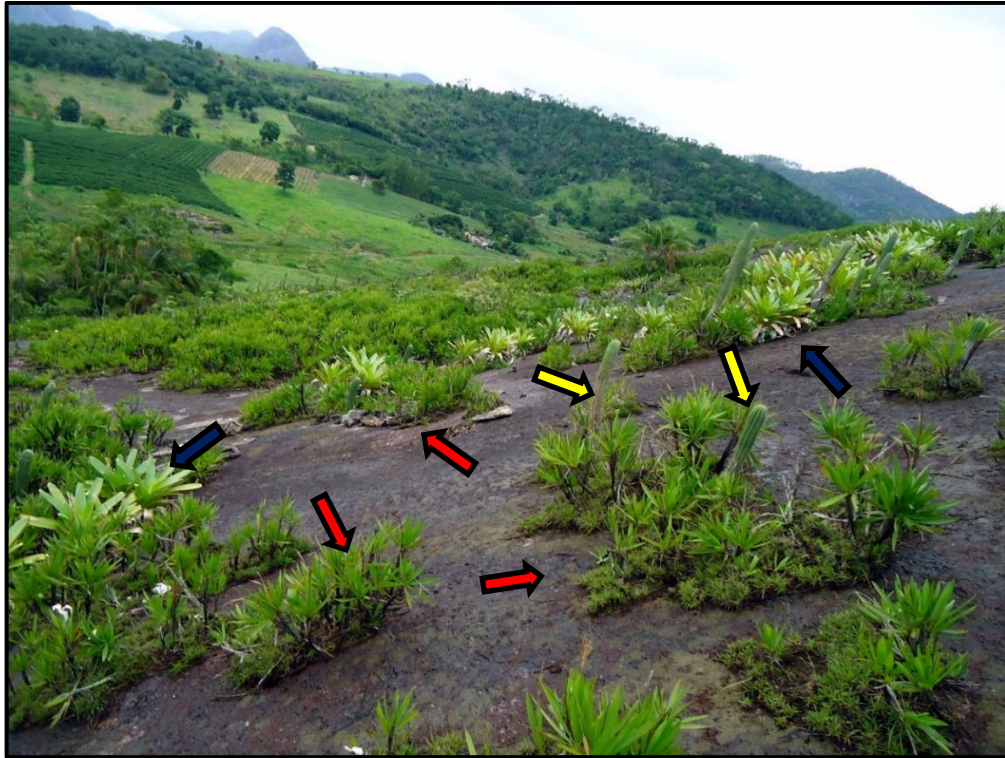


Figura 2. Adaptações da vegetação ocorrentes em *inselbergs*. Seta azul: folhas organizadas em roseta (Bromeliaceae); seta amarela: cladódios (Cactaceae); seta vermelha: tapete de monocotiledônea (Velloziaceae). Águia Branca, ES. **Fonte imagem:** W.S. Justino.



Figura 3. Homeohidria, pré-adaptação de algumas famílias botânicas ocorrentes em *inselbergs*. Em a) estação seca, onde indivíduos da espécie *Vellozia plicata* (Velloziaceae) apresentam suas folhas dessecadas; em b) estação chuvosa, folhas re-hidratadas. Águia Branca, ES. **Fonte imagem:** W.S. Justino.

A família Velloziaceae J.Agardh, endêmica de afloramentos rochosos, pertence à ordem Pandanales possui aproximadamente 260 espécies, das quais são registradas uma espécie na China, uma espécie no Iêmen e uma espécie na Arábia Saudita, cerca de 34 espécies na África e Madagascar, e o restante na América do Sul (cerca de 221 espécies), com apenas uma espécie no Panamá (América Central) (Mello-Silva, 2004, 2015; Mello-Silva *et al.*, 2011; Alcantara *et al.*, 2018; Flora do Brasil, 2020). Apesar da delimitação conflitante, a família conta com duas subfamílias (Vellozioideae e Barbacenioideae) e cinco gêneros (*Barbacenia* Vand., *Barbaceniopsis* L.B.Sm., *Vellozia* Vand., *Xerophyta* Juss. e *Acanthochlamys* P.C.Kao) de acordo com a classificação de Melo-Silva *et al.* (2011).

São ervas heliófilas, arborescentes e robustas, perenes, com caule envolvido por bainhas foliares secas, lenhoso, fibroso, simples ou dicotomicamente ramificado. Apresentam folhas completas alternas trísticas ou espirotrísticas, geralmente agrupadas no ápice dos ramos. Exibem flores solitárias vistosas, bissexuadas, actinonomorfas ou ligeiramente zigomorfas; cálice e corola trímeros unidos entre si, com seis a numerosos estames, e anteras rimosas basifixas ou mesofixas; gineceu gamocarpelar, ovário ínfero com lóculos plurióvulados; fruto do tipo cápsula (Smith, 1962; Smith & Ayensu, 1976; Mello-Silva 2005; MOBOT, 2020) (Figure 4).

Através de análises filogenéticas e fitogeográficas as velosiáceas têm sua origem estimada nos afloramentos rochosos desde o colapso da Gondwana com a idade do grupo coroa datado em no mínimo 75 milhões de anos (Mello-Silva *et al.*, 2011; Alcantara *et al.* 2018). Espécies encontradas nas Guianas são historicamente ligadas aos *inselbergs* africanos e a Madagascar. A família tem seu centro de diversidade em locais azonais no sudeste do Brasil, diminuindo o número de espécies em relação a outras regiões subjacentes. Um segundo centro de diversidade é o leste da África (Porembski *et al.*, 1998; Mello-Silva 1995, 2005, 2009; Mello-Silva *et al.*, 2011).

No Brasil são encontrados dois gêneros, *Vellozia* e *Barbacenia*, com cerca 120 e 101 espécies, respectivamente, com destaque para 48 espécies apontadas como raras (Mello-Silva, 2009; Mello-Silva, 2011). O gênero *Barbacenia* Vand. apresenta distribuição nos domínios da Mata Atlântica e do Cerrado (campos rupestres), compreendendo os substratos de granito e gnaisse distribuídos na Serra do Mar e da Mantiqueira, e nos substratos de arenito e ferro da Serra do Espinhaço (Vasconcelos, 2001; Cabral *et al.*, 2021). Apresenta flores com seis estames, com coroa e estigmas lineares ou elípticos em tons claros, como branco, amarelo e lilás, e em tons mais fortes como rosa, violeta e vermelho (Mello-Silva, 2004; Mello-Silva, 2009; Sajo *et al.*, 2010). O gênero compreende plantas heliófitas; associadas a extensas

estações secas e substratos específicos (Smith & Ayensu 1976; Behnke *et al.*, 2013; Porembski, 2007; Mello-Silva *et al.*, 2011).

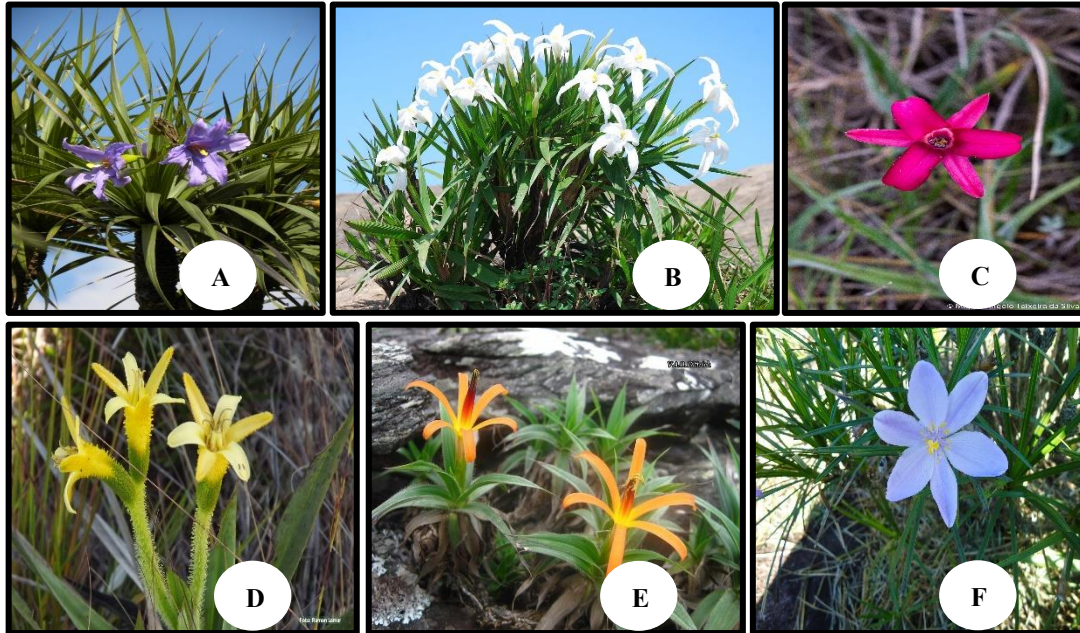


Figura 4. Diversidade florística da família Velloziaceae. Em a) *Vellozia gigantea*, por G.H. Shimizu; b) *Vellozia plicata*, por L.A.F De Paula; c) *Barbacenia irwiniana*, por M.A.T. Silva; d) *Barbacenia flava*, por R. Lamar; e) *Barbacenia gentianoides*, por V.A.O. Dittrich; f) *Vellozia variegata*, por W.S. Justino.

Segundo Cabral *et al.*, (2021) a diversificação do gênero *Barbacenia* ocorreu do Mioceno Médio ao Pleistoceno. Essa datação coincide com a possível exposição da superfície de muitos inselbergues e com a expansão de ambientes secos durante um resfriamento global do Mioceno (Varajão e Alkmim, 2015; Vieira & Gramani, 2015; Herbert *et al.*, 2016). Estas condições ambientais podem ter facilitado a expansão de ocorrência de *Barbacenia*, através da colonização de habitats isolados e posterior isolamento geográfico, e subsequente, origem dos clados da Mata Atlântica e do Cerrado (Stein *et al.*, 2014; Alcantara *et al.*, 2018; Cabral *et al.*, 2021).

A espécie *Barbacenia pabstiana* L.B.Sm. & Ayensu inserida no segundo grupo do clado inselbergues da Mata Atlântica (Cabral *et al.*, 2021) é endêmica do estado do Espírito Santo. Descrita por Smith & Ayensu (1976) na localidade de Aracê, município de Domingos Martins, surgiu cerca de 4 milhões de anos atrás (Cabral *et al.*, 2021). Ocorre em afloramentos rochosos apresentando hábito rupícola e terrícola. Possui flores tubulosas com coloração violeta ou azul, com 30 mm de comprimento, e normalmente se estabelecem em planos côncavos ou convexos formando tapetes (Figura 5) (Smith & Ayensu, 1976).

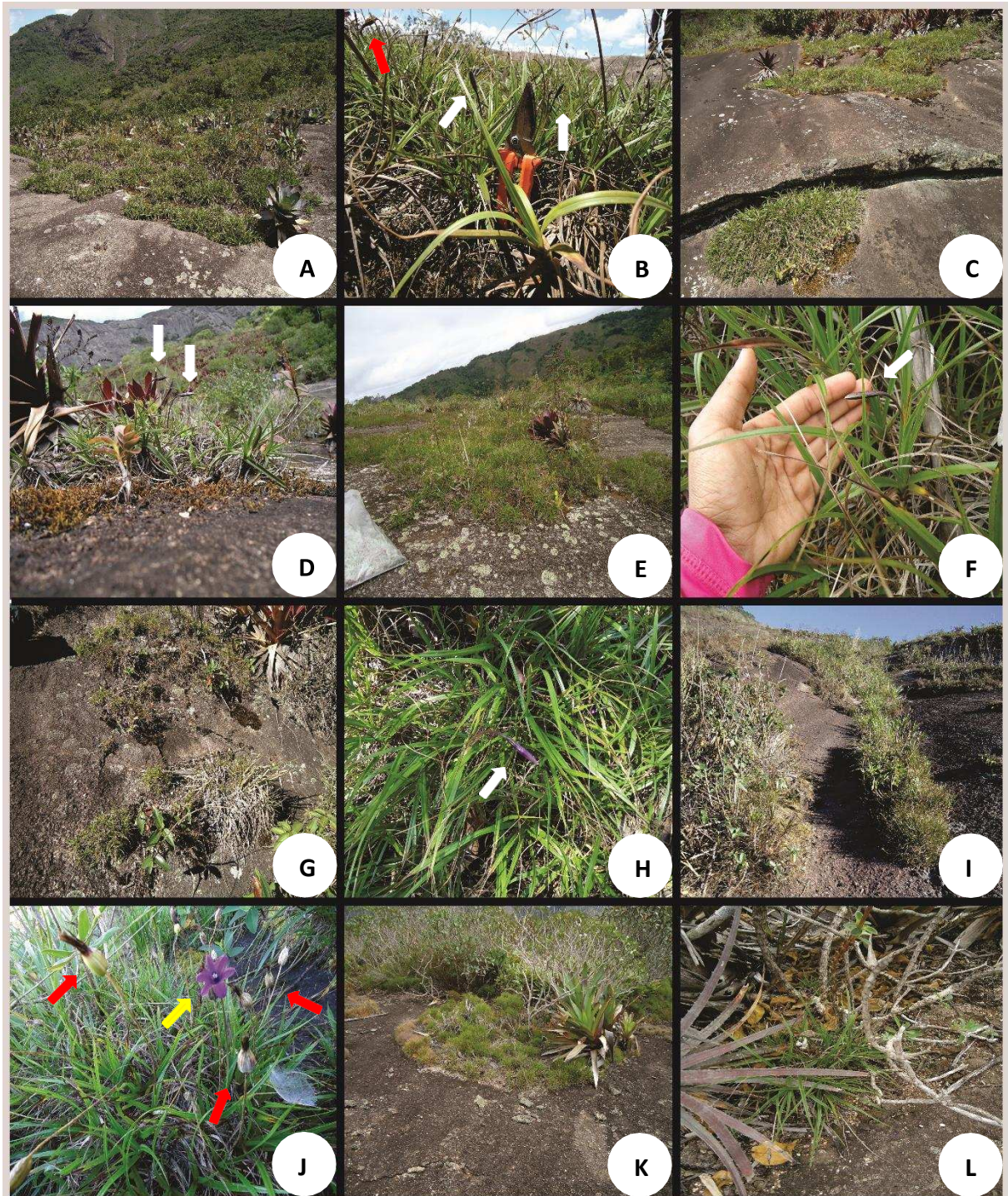


Figura 5. Habitat da *Barbacenia pabstiana* e a formação de tapetes nos inselbergues de: a-b) Forno Grande; c-d) Pedra Azul; e-f) Pedra do Caparaó; g-h) Pedra do Garrafão; i-j) Pedra da Lajinha; k-l) Pedra da Onça. Seta branca evidenciando os botões florais, setas amarelas evidenciando a flor, e seta vermelha evidenciando os frutos. **Fonte imagem:** W.S. Justino

Apesar da escassez de trabalhos sobre a polinização e dispersão dentro do gênero e da família, as flores são polinizadas principalmente por besouros, formigas e abelhas, algumas espécies por beija-flores e morcegos, e a dispersão é quase predominantemente anemocórica ou autocórica (Sazima, 1978; Porembski *et al.*, 1988; Conceição *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2007; 2009; Luz, 2014).

Em razão à sua natureza disjunta em relictos, os afloramentos rochosos de inselbergues são frequentemente comparados às ilhas oceânicas, por exibirem um grau de isolamento espacial e ecológico marcado pela área circundante na barreira contra a dispersão e migração (Porembski *et al.*, 2000; Burke, 2003). Essas ilhas de habitat terrestres são exemplos de atributos ecológicos particulares, possuem pouca idade e um menor grau de isolamento quando comparados às ilhas oceânicas, servindo como um sistema-modelo adequado, devido a esse isolamento desempenhar um papel crucial nos processos de especiação (Porembski *et al.*, 1998; Porembski, 2007; Lousada *et al.*, 2011, 2013; Barbosa *et al.*, 2012; De Paula *et al.*, 2016; Corlett & Tomlinson, 2020).

Pesquisas realizadas com genética de populações em afloramentos rochosos do Cerrado indicaram alta variabilidade genética para diversos grupos de plantas, devido principalmente à distribuição geográfica disjunta, mesmo quando analisadas com diferentes marcadores moleculares (Borba *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2011). Estudos sobre variabilidade genética foram realizados em Velloziaceae. Estes apontaram de moderada a alta diversidade genética para as espécies *Vellozia compacta* Mart. ex Schult. & Schult.f., *V. epidendroides* Mart. ex Schult. & Schult.f., *V. gigantea* N.L.Menezes & Mello-Silva, complexo *V. hirsuta* Goethart & Henrard. e baixa diversidade para *V. leptopetala* Goethart & Henrard (Franceschinelli *et al.*, 2006; Lousada *et al.*, 2011; 2013; Barbosa *et al.*, 2012). Sugerindo que a distribuição geográfica restrita e/ou ampla tem relação com o nível alto ou baixo de variabilidade genética dentro das populações de plantas (Franceschinelli *et al.*, 2006; Lousada *et al.*, 2011; 2013; Barbosa *et al.*, 2012; Luz, 2014).

Dentre os marcadores moleculares utilizados encontram-se o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), que estão presentes ao longo do genoma, e detectam variações genéticas entre indivíduos e entre populações. No caso do RAPD, os fragmentos de DNA utilizados como iniciadores são constituídos por 10 pares de nucleotídeos, de sequências inespecíficas, com mais de 60% do seu conteúdo rico em guanina/citosina. Nos marcadores de ISSR os fragmentos iniciadores são sequências repetitivas constituídas geralmente de 15 a 20 pares de bases. Esses iniciadores de fita simples são utilizados na replicação de DNA (*primers* de oligonucleotídeos sintéticos) e geram fragmentos a partir da amplificação de regiões entre sequências complementares via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sem a necessidade do conhecimento prévio da sequência alvo do DNA, podendo assim, ser empregado em espécies não-modelo (Mattioni *et al.*, 2002; Hilsdorf, 2011; Turchetto *et al.* 2017).

Os marcadores ISSR se destacam dos demais (ex.: SSR, RFPL, AFLP e RAPD) devido ao seu baixo custo, fácil utilização, especificidade e grande reprodutibilidade (Goulão & Oliveira, 2001; Turchetto *et al.* 2017). Embora sejam marcadores dominantes, apresentam a vantagem de analisar múltiplos *loci* em uma única reação (Goulão & Oliveira, 2001). Este marcador é considerado uma importante ferramenta para as ampliações de DNA, pois não requer etapa demorada e cara. Sendo utilizado em inúmeros estudos para: caracterização genética (Bornet *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2020), análises de similaridade intrapopulacional e interpopulacional (Biabani *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015), estimativas de fluxo gênico (Li *et al.*, 2014; Nazneen *et al.*, 2019) e diversidade genética de populações (Frankham *et al.*, 2002; Turchetto *et al.* 2017).

Estudos sobre a variabilidade genética são importantes fontes de informação sobre a adaptação das populações frente a um ambiente em transformação; afinidades e limites entre espécies; origem de bioinvasores; detecção de modos de reprodução e estruturação familiar; estimativa de níveis de migração e dispersão das populações (Primack & Rodrigues, 2001; Matioli & Fernandes, 2012). O estudo de do fluxo gênico em espécies encontradas em ilhas terrestres auxilia na sua conservação, uma vez que são mais vulneráveis à extinção, porque muitas delas são endêmicas a uma ou poucas populações locais (Primack & Rodrigues, 2001; Lousada *et al.*, 2011; Luz, 2014).

Os inselbergues não eram atrativos para atividades agrícolas devido ao relevo típico e às características ambientais (Yates *et al.*, 2003; Conceição & Orr, 2012). Entretanto, o que se observa em campo é o avanço da agricultura nestes ecossistemas em diferentes regiões (Jacobi & Carmo 2008; Silva 2016) (Figure 5). Somando-se a isso, os distúrbios climáticos e o caráter aberto da vegetação também têm favorecido o estabelecimento de espécies exóticas (como *Melinis repens* (Willd.) Zizka e *M. minutiflora* P.Beauv., Poaceae) e esta invasão parece ser proporcional ao efeito antrópico, como pastagens e extrativismo de rochas ornamentais (De Paula *et al.*, 2015; Gouvêa *et al.*, 2020; Pinto Júnior *et al.*, 2021).

O estado do Espírito Santo (ES) está localizado na região sudeste do Brasil, apresenta área territorial de 46.074,447 km² dividida em 78 municípios, com a população estimada para 4.064.052 pessoas e com PIB conjecturado no primeiro trimestre de 2020 em valores correntes a R\$ 29,9 bilhões (IBGE, 2020; IJSN, 2020). A economia do estado é movida principalmente pela exportação de petróleo, rochas ornamentais e do agronegócio, como café, celulose e pimenta do reino (IJSN, 2020).

O estado é o maior exportador de rochas ornamentais do país, com um faturamento de US\$ 827,7 milhões e volume físico de 1,66 milhões de toneladas em 2019, o que corresponde

a 82% do faturamento e 77% do volume físico das exportações brasileiras desse setor (ABIROCHAS, 2020). O ranking dos países que mais importam rochas ornamentais brasileiras são: EUA (62% do total do faturamento), China (12,1%), Itália (6,3%), México (3%), Reino Unido (1,7%), Canadá (1,5%) e Espanha (1%) (ABIROCHAS, 2020).

Além disso, o efeito da urbanização, como construção de prédios e instalações com objetivos turísticos e religiosos, tem influenciado o aumento da frequência de incêndios causando danos consideráveis à vegetação (Figure 6). Mesmo a maioria das plantas sendo tolerante aos incêndios o aumento na frequência com que esse distúrbio ocorre altera o hábito de indivíduos mais velhos e inibe o estabelecimento de mudas (Yates *et al.*, 2003; Conceição & Orr, 2012; Porembski *et al.*, 2016).

Por todos esses aspectos, o presente trabalho tem como principal contribuição o fornecimento de dados mais precisos sobre o status atual da distribuição geográfica e a diversidade e estruturação genéticas da espécie *Barbacenia pabstiana*, alvo deste estudo, com base em marcadores ISSR. Os resultados poderão auxiliar no planejamento no uso dos recursos naturais, junto a estratégias de conservação do seu hábitat e da biodiversidade associada (Mendes & Padovan, 2000; Assis *et al.*, 2004; Novelli, 2010; Christ *et al.*, 2016).

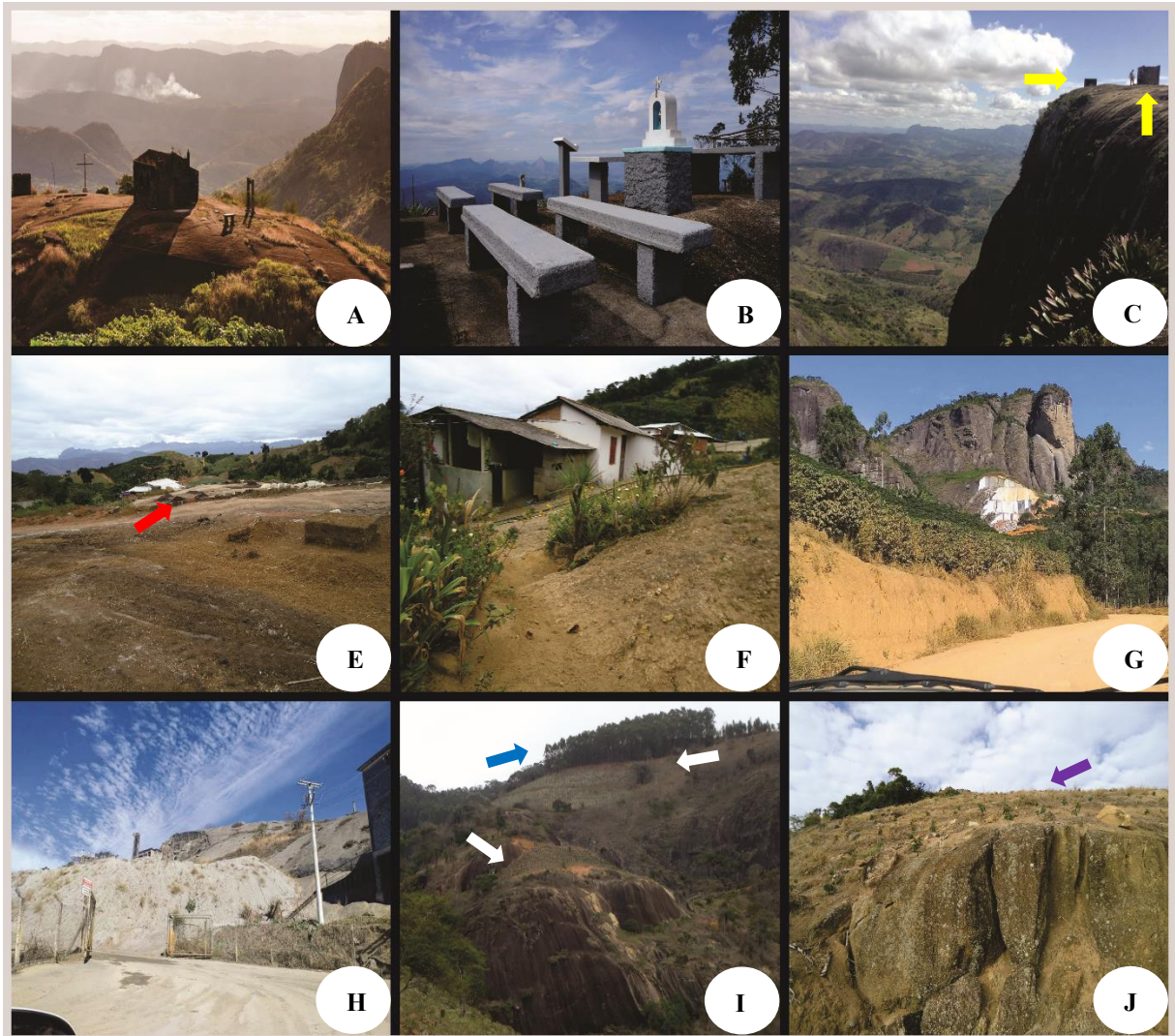


Figura 6. Exemplos de atividades antrópicas comuns nas montanhas espírito-santense. Fins religiosos: a) capela de Santa Luzia, *inselberg* Pedra Toma Vento, Itarana (Foto: www.itarana.es.gov.br); b) Capela de São João Batista, pedra Alto Lage, Itaguaçu (Foto: Rafael Gomes); c) Cenáculo (setas amarelas) para missas, *inselberg* Pedra Paulista, Itaguaçu (Foto: W.S. Justino). Assentamento humano: d) laje para torrar café (seta vermelha); e) residências dos meeiros, ambos localizados no *inselberg* Pedra Alegre, Itarana (Foto: W.S. Justino). Extração de rocha ornamental: f) jazida de Venda Nova do Imigrante; g) jazida de Afonso Cláudio (Foto: W.S. Justino). Agricultura: h) cafezais (seta branca) e eucaliptos (seta azul) Pedra São Sebastião, Itarana; i) cafezal (seta roxa) *inselberg* Pedra da Onça, Santa Tereza (Foto: W.S. Justino).

2. OBJETIVOS

- Verificar a ocorrência atual de populações da espécie *Barbacenia pabstiana* em inselbergues no estado do Espírito Santo, baseado em registros anteriores da espécie e em locais com potencial de ocorrência;
- Avaliar a diversidade e estruturação genética em diferentes *inselbergs* ao longo da distribuição da espécie *Barbacenia pabstiana* presente no Estado do Espírito Santo;
- Correlacionar diferenças genéticas e de estruturação com níveis de perturbação presentes nas regiões dos afloramentos rochosos.

A presente dissertação apresenta a seguir um capítulo correspondente ao manuscrito que será submetido ao periódico *Acta Botanica Brasilica*.

3. ORIGINAL ARTICLE

High genetic variability and low genetic divergence in disjunct populations of the endemic *Barbacenia pabstiana* L.B.SM. & Ayensu (Velloziaceae J. Agardh) occurring in the inselbergs of Espírito Santo

Wénita de Souza Justino¹, Jéferson Nunes Fregonezi^{2*}

¹Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

^{2*}Departamento de Biologia Vegetal, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n - Campus Universitário, Viçosa - MG, 36570-900, Brazil. E-mail: fregonezi@ufv.br

RESUMO

A região sudeste da Mata Atlântica Brasileira abriga uma das maiores reservas de granito ou gnaisse monolíticos do Brasil. Dado a abundância desses inselbergues, o Espírito Santo é o estado brasileiro que mais exporta rochas ornamentais no país. Por apresentar vegetação disjunta em relictos os inselbergues são frequentemente comparados às ilhas oceânicas. Estudos sobre genética de populações tem sido realizado em espécies endêmicas destes afloramentos rochosos para entender a influência da barreira espacial contra a dispersão e migração, bem como na especiação. Este é o caso da monocotiledônea formadora de tapetes *Barbacenia pabstiana* (Velloziaceae) endêmica dos inselbergs desta região. Para este estudo foram testados doze *primers* ISSR para avaliar a estruturação e diversidade genética das diferentes populações presentes em seis inselbergs. Os *primers* amplificaram de 9-25 fragmentos gerando 173 lócus com 100% de polimorfismo. A heterozigosidade esperada e o índice de Shannon não apresentaram diferenças significativas entre as populações (0,169 e 0,277, respectivamente). Em nível de população, *Barbacenia pabstiana* apresentou quatro diferentes grupos genéticos com alta similaridade genética entre as populações que estão distantes geograficamente. Apesar da barreira espacial, os resultados mostraram baixa estruturação genética entre as populações. A comparação entre diversidade genética e efeito antrópico entre as populações analisadas indicou que as comunidades rupícolas do inselberg “Pedra da Lajinha”, que ainda possui vegetação nativa de Mata Atlântica na borda do afloramento rupícola é o que abriga a população com maior diversidade genética entre as populações analisadas. Isso pode indicar que a perturbação antrópica influencia a diversidade genética das populações da espécie. Neste sentido, com base nos resultados genéticos aqui apresentados, sugerimos atenção particular a este inselbergue em futuras políticas de conservação, que poderá incluir a criação de novas Unidades de Conservação destas formações geológicas únicas, que também abrigam espécies vegetais altamente adaptadas. Futuras pesquisas sobre a polinização, dispersão e história evolutiva também são necessárias para compreender melhor a história dessas populações, para um melhor enfrentamento do impacto antrópico e mudanças climáticas.

Palavras-chave: Mata Atlântica Brasileira; inselbergues; tapetes de monocotiledôneas; Velloziaceae; genética de populações; marcadores ISSR; diversidade genética

ABSTRACT

The southeast region of the Brazilian Atlantic Forest is home to one of the largest reserves of monolithic granite or gneiss in Brazil. Given the abundance of these inselbergs, Espírito Santo is the Brazilian state that exports the most ornamental rocks in the country. Because they present disjunct vegetation in relicts the inselbergs are often compared to oceanic islands. Studies on population genetics have been carried out on species endemic to these rocky outcrops to understand the influence of the spatial barrier against dispersal and migration, as well as on speciation. This is the case of the mat-forming monocot *Barbacenia pabstiana* (Velloziaceae) endemic to the inselbergs of this region. For this study, twelve ISSR primers were tested to evaluate the structuring and genetic diversity of the different populations present in six inselbergs. The primers amplified from 9-25 fragments generating 173 loci with 100% polymorphism. The expected heterozygosity and Shannon index showed no significant differences among populations (0.169 and 0.277, respectively). At the population level, *Barbacenia pabstiana* showed four different genetic groups with high genetic similarity among populations that are geographically distant. Despite the spatial barrier, the results showed low genetic structuring among populations. The comparison between genetic diversity and anthropogenic effect among the populations analyzed indicated that the rupicolous communities of the inselberg "Pedra da Lajinha", which still has native Atlantic Forest vegetation at the edge of the rupicolous outcrop is the one that harbors the population with the highest genetic diversity among the populations analyzed. This may indicate that anthropic disturbance influences the genetic diversity of populations of the species. In this sense, based on the genetic results presented here, we suggest particular attention to this inselberg in future conservation policies, which may include the creation of new Conservation Units of these unique geological formations, which also harbor highly adapted plant species. Future research on pollination, dispersal, and evolutionary history is also needed to better understand the history of these populations for better coping with anthropogenic impact and climate change.

Keywords: Brazilian Atlantic Forest; inselbergs; monocot mats; Velloziaceae; population genetics; ISSR markers; genetic diversity

INTRODUCTION

Inselbergs are distributed in Brazil in the phytogeographic domains of Caatinga and Atlantic Forest (Martinelli, 2007; de Paula *et al.*, 2016). They show greater concentration in the Northeast region, but are also included in the Southeast region, encompassing the states of Rio de Janeiro, Espírito Santo, southern Bahia, and adjacent parts of Minas Gerais (Porembski, 2007; Vieira *et al.*, 2015; De Paula *et al.*, 2016). Given the abundance of these monolithic rock arrays of granite or gneiss, Espírito Santo is the state that contributes the most to ornamental rock exports from Brazil (Martinelli, 2007; ABIROCHAS, 2020). In the year 2019 the turnover was US\$ 827.7 million and a physical volume of 1.66 million tons. Corresponding to 82% of the total billing and 77% of the physical volume of Brazilian exports of this sector (ABIROCHAS, 2020).

Conservation studies of rupicolous vegetation in these inselbergs, such as floristic surveys, are still scarce in these communities, which presents a large number of species with restricted distribution, including endemic and threatened species (Porembski *et al.*, 1998; Porembski, 2007; De Paula *et al.*, 2016). This is the case of mat-forming monocotyledon *Barbacenia pabstiana* L.B.Sm. & Ayensu (Velloziaceae J.Agardh). With an estimated age of ~4 million years (Cabral *et al.*, 2021) it was described in 1976 by Smith & Ayensu in the locality of Aracê, municipality of Domingos Martins, it has tubular flowers with violet or blue coloration, 30 mm long, it has rupicolous and terrestrial habit (Smith & Ayensu, 1976).

Because of their disjunct nature in relicts, rocky outcrops of inselbergs are often compared to oceanic islands, as they exhibit a degree of spatial and ecological isolation marked by the surrounding area in the barrier against dispersal and migration, a crucial role in speciation processes (Porembski *et al.*, 2000; Burke, 2003; Porembski, 2007; Lousada *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2012; Lousada *et al.*, 2013; De Paula *et al.*, 2016; Corlett & Tomlinson, 2020). Research conducted with population genetics in the rocky outcrops of the Cerrado and

Atlantic Forest indicated high genetic variability for several plant groups, mainly due to the disjunct geographic distribution, even when analyzed with different molecular markers (Borba *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2011).

Although the genus *Barbacenia* (Velloziaceae) occurs in Brazilian inselbergs, information about ecological and molecular aspects of these species remains scarce. Considering the increase of anthropogenic activities at rupicolous communities of inselbergs, recently related to rock extractions, in this study we used ISSR genetic markers to access and evaluate the genetic diversity and structures in native populations of *B. pabstiana* (Mendes & Padovan, 2000; Assis *et al.*, 2004; Novelli, 2010; Christ *et al.*, 2016). The amplification using markers such as RAPD and ISSR has been employed as a good alternative to understand the adaptation and also the distribution of populations facing a changing environment, besides presenting low cost and good reproducibility (Primack & Rodrigues, 2001; Matioli & Fernandes, 2012).

For all these aspects, the present work has as its main contribution the provision of more accurate data on the geographical distribution status, genetic variability and population structure of *Barbacenia pabstiana*, the target of this study.

MATERIALS AND METHODS

Study Area

Based on virtual surveys in herbaria (Flora of Brazil 2020 and SpeciesLink, 2021) all occurrence and distribution sites records for *Barbacenia pabstiana* were selected for field expeditions. The *Pedra da Lajinha* inselberg was the only one that did not present a collection record, and was selected after informal conversations with local residents during the field trips. Fifteen inselbergs, distributed across 11 municipalities were visited (Table S1, Figure S1). Of the 15 inselbergs visited, currently only six of them (Table 1; Figure 1; Table S2; Figure S2) harbor *B. pabstiana* populations. In *Pedra Paulista* inselberg we found and collect only one individual. Despite this record, it was not included in the study because it did not provide a satisfactory sample for genetic analysis.

Table 1. Population code, sample size (n = number of individuals), county, locality, voucher number, and geographic coordinate of the sampled populations (total of 114 individuals).

Code	n	Municipality	Inselberg	Voucher	Geographic Coordinate
FG	20	Castelo	Pedra de Forno Grande	53475	20°30'39.6"S 41°05'24.0"W
PA	20	Domingos Martins	Pedra Azul	53484	20°25'27.4"S 40°59'43.8"W
PC	20	Itaguaçu	Pedra do Caparaó	53456	19°44'29.0"S 40°58'52.0"W
PG	20	Santa Maria de Jetibá	Pedra do Garrafão	53457	20°10'39.0"S 40°55'11.0"W
PL	20	Afonso Cláudio	Pedra da Lajinha	53447	20°00'22.3"S 41°05'56.0"W
PO	14	Santa Teresa	Pedra da Onça	53462	19°53'52.0"S 40°48'53.0"W

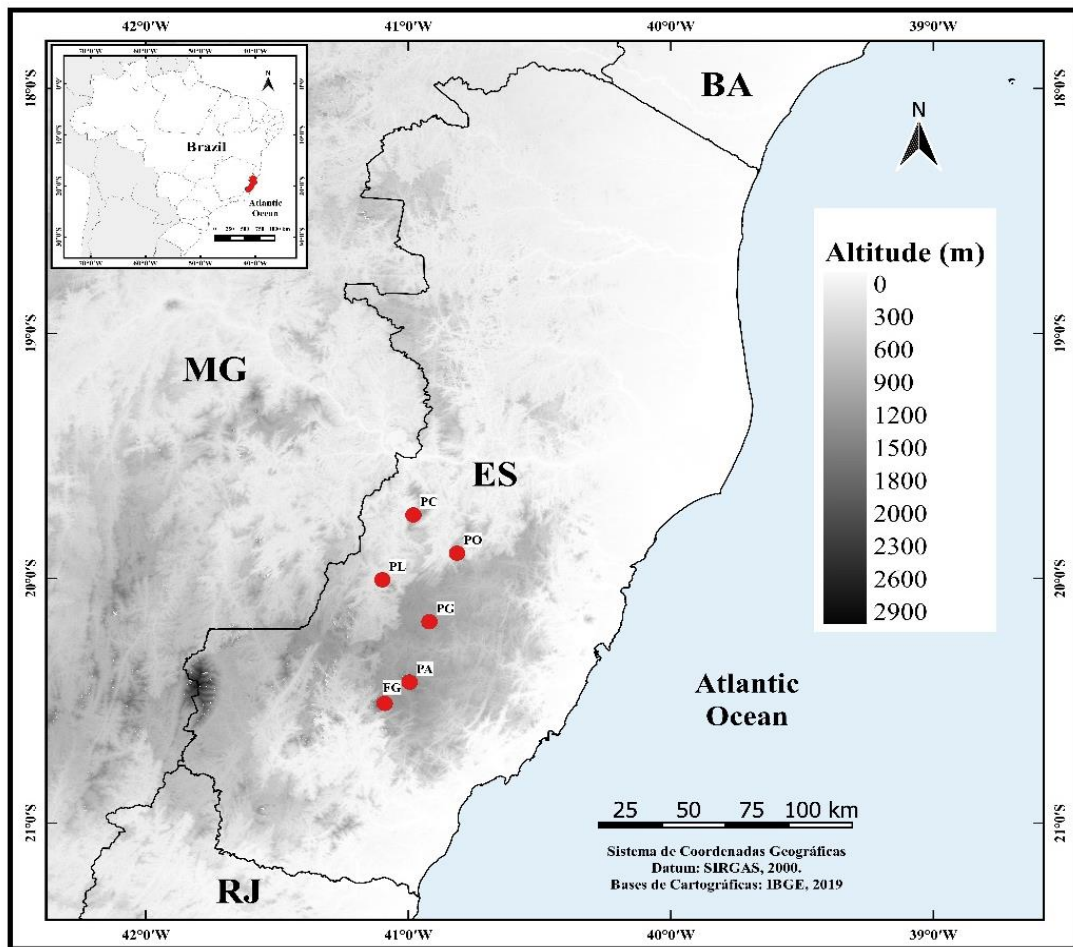


Figure 1. Thumbnail, upper left corner, map of Brazil with emphasis on the State of Espírito Santo. Map highlighted, with the location of the inselbergs that had viable populations of *Barbacenia pabstiana* for the study. Information about the codes indicated in each population is shown in Table 1. **Fonte:** A autora.

Collections occurred in May, June, and October 2019. To avoid clones, young leaves from one individual per mat was collected. Subsequently these leaves were packed in paper bags, identified and stored in silica gel for further extraction of genetic material. Samples of reproductive and vegetative material from each population were also collected for recording and exsiccate confection. All herborized material was deposited in VIC herbarium, at Plant

Biology Department of the Federal University of Viçosa. The geographic coordinates of each population were taken by GPS location.

Extraction and Amplification DNA

Total DNA extraction followed the standard CTAB protocol proposed by Doyle & Doyle (1987), with additional steps of precipitation with isopropanol and to remove excess polysaccharides with two takes of chloroform: isoamyl alcohol (24:1). The extraction products were visualized on 1% agarose gel and 1% TBE buffer, stained with GelRed, and photodocumented. All extraction samples were stored in -20°C freezer.

Amplification reactions were performed using twelve ISSR marker primers (Tab. 2) previously described in other studies in the family Velloziaceae (Lousada et al., 2011; Lousada et al., 2013; Luz, 2014), in 114 individuals from populations sampled from six inselbergs. Amplifications were performed in a final volume of 20µL, consisting of 4µL of buffer (1 X), 0.42µL of dNTPs (10mM), 0.64µL of primer (10mM), 0.2µL of Taq polymerase (1 U), 13.74µL of water, and 1µL (15ng) of genomic DNA. The reactions were performed in a thermal cycler following the program of initial denaturation at 94°C for 4 minutes; 37 cycles of: denaturation at 94°C for 1 minute, annealing 46-50°C at 2 minutes and extension 72°C at 2 minutes; followed by a final extension of 72°C at 7 minutes. The specific annealing temperature values for each marker are described in Table 2. Amplification products were separated electrophoretically at a constant voltage of 60 V for 4.5 hr on 1.5% agarose gels with TAE 1x buffer, stained with 1.5% ethidium bromide, and photographed under ultraviolet light. Two DNA scales of 1kb and 100kb were used to estimate the molecular size of the fragments.

Table 2. List of molecular markers tested, repeat sequences, annealing temperature used, and number of polymorphic loci obtained.

Primer	Sequence (5'-3') *	T (°C)	n (P)
Bechy	(CA) ₇ YC	50.1	17
Chris	(CA) ₇ YG	47.6	17
John	(AG) ₇ YG	47.6	14
Manny_Lou	(CAC) ₄ RC	50.1	25
Mao	(CTC) ₄ RC	50.1	19
Manny_Luz	(CA) ₄ RC	50.0	9
Omar	(GA) ₄ RC	50.0	0
UBC 808	(AC) ₈ C	53.0	18
UBC 827	(AC) ₈ G	46.1	10
UBC 840	(GA) ₈ YT	50.1	15
UBC 848	(CA) ₈ RG	50.1	16
UBC 899	(CA) ₆ RG	50.1	13
Total			173 (100)

T (°C) = annealing temperature; n = number of fragments, P = percent polymorphic fragments. *Y = C or T; R = A or G

Analysis of variability, relatedness and genetic structure

The ISSR-amplified fragments were visually labeled assuming that amplified products of similar molecular size, amplified with the same primer, were homologous. ISSR bands were scored as 1 (presence) or 0 (absence) and an ISSR phenotype matrix was constructed. Only data from intensely stained bands were used for data analysis.

GenAlEx v.6.51b2 software (Smouse *et al.*, 2017) was used to estimate genetic diversity parameters, such as the percentage of polymorphic loci (P), Shannon's phenotypic diversity index (I), and expected heterozygosity (He). Also with GenAlEx a non-trending Nei

(1978) genetic distance matrix was calculated for all population pairs, which was subsequently employed to perform a principal coordinate analysis (PCoA).

The Bayesian algorithm of the AFLP-SURV software (Vekemans *et al.*, 2002) was used to construct 1000 Nei genetic distance matrices. From these matrices phylogenetic trees were generated by the neighbor-joining distance method in the NEIGHBOUR module of the PHYLIP v. 3.698 software (Felsenstein, 2005). The CONSENSE module of the PHYLIP software was used to compute a majority consensus tree as well as the branch support values (bootstrap).

Using Arlequin v.3.5.2 software, Molecular Analysis of Variance (AMOVA) was tested to estimate the variance components and the partitioning of variation within and between populations. Estimates of genetic structuring were performed by Bayesian approach with Structure v.2.3.4 software (Pritchard *et al.*, 2000) to infer the number of genetic clusters (K) based on the absence and presence of bands performed on AFLP-SURV. The number of clusters tested were from K =1 to K = 8, and 5 independent runs were performed for each K. In each run, 500,000 Monte Carlo interactions via Markov Chains (MCMC) were performed, with initial burn-in of 100,000 interactions. To infer the number of genetic clusters, we calculated the average of each probability value of K, "log likelihood" (LnP (D)), across all runs as suggested by Pritchard *et al.* (2000) and the delta K statistic according to Evanno *et al.* (2005).

RESULTS

Of the twelve, eleven primers were successfully employed, resulted in 173 loci with good resolution. The primers amplified from 9-25 fragments (Table 2). The percentage of polymorphic loci (P) at the species level was 100%, ranging from 70.86 (PO) - 82.29% (PL) across populations, with an average of 76.57% (Table 3). The mean expected heterozygosity (He) showed no significant difference between populations, ranging from 0.161 (PG and PO) to 0.192 (PL) with a mean of 0.169. For the diversity Shannon index (I) values ranged from 0.262 (PO) to 0.311 (PL), and the mean was 0.277. At the species level, *Barbacenia pabstiana* showed high genetic variability, with a value of He = 0.181 and I = 0.303 (Tab. 3).

Table 3. Parameters of genetic diversity of six populations of *Barbacenia pabstiana*, based on 173 ISSR loci.

Population	P (%)	I (\pm SD)	He (\pm SD)
FG	73.14	0.271 (\pm 0.017)	0.166 (\pm 0.012)
PA	80.57	0.284 (\pm 0.016)	0.172 (\pm 0.011)
PC	76.00	0.265 (\pm 0.017)	0.162 (\pm 0.012)
PG	76.57	0.266 (\pm 0.016)	0.161 (\pm 0.011)
PL	82.29	0.311 (\pm 0.017)	0.192 (\pm 0.012)
PO	70.86	0.262 (\pm 0.017)	0.161 (\pm 0.012)
Mean	76.57	0.277 (\pm 0.007)	0.169 (\pm 0.005)
Species	100	0.303 (\pm 0.193)	0.181 (\pm 0.141)

P = percent polymorphic locus; I = Shannon diversity index; He = expected heterozygosity. Standard deviation in parentheses.

In the PCoA analysis, the percentage of total variance was 55% explained by the first two axes (axis 1 = 28.5% and axis 2 = 21.6%) (Fig. 3). No distinct genetic groups of populations were found, reflecting a low genetic structure between populations, despite the

high genetic diversity. In the first axis (1) PL population individuals seem to be negatively related to the axis and a second group formed by sparse, overlapping individuals from all six populations positively associated with this axis. In the second axis (2) it is possible to notice a slight separation in two other groups one with FG and PC negatively related to the axis and another formed by the PA and PO populations positively related to the axis.

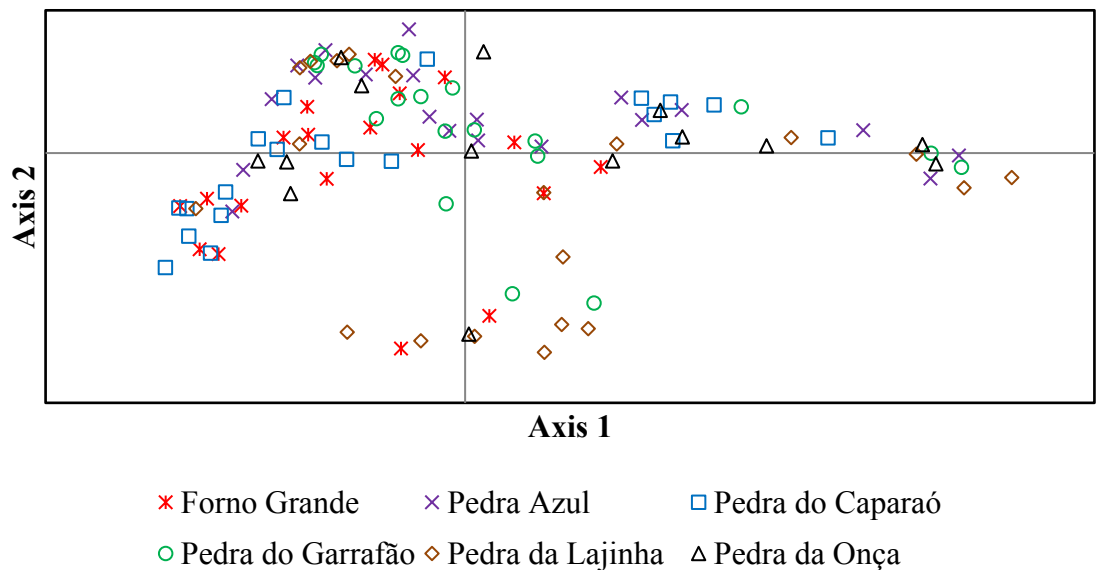


Figure 3. Representation of the first two axes of principal coordinate analysis (PCO) of the genetic distance matrix of 114 individuals from six populations of *B. pabstiana*. Percentage of cumulative variance in the first two axes = 50.1% (axis 1 = 28.5%, axis 2 = 21.6%).

The AMOVA showed low divergence among populations ($\Phi_{st} = 0.072$) and high variation within populations ($\Phi_{st} = 0.927$) (Table 4). F_{st} showed a value of 0.072 confirming the low genetic structure among sampled population.

Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) of *Barbacenia pabstiana* in the inselbergs of Capixaba.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Variation %	Fixation Index Fst
Among population	5	101.442	0.40004 Va	7.24	
Within populations	222	1.138.650	5.12905 Vb	92.76	
Total	227	1.240.092	552.909		0.07235

The resulted neighbor-joining-based phylogenetic tree shows groups with low statistical support ($\geq 39\%$). The first group containing the PL and PO populations had bootstrap support of 39.8%, the second group FG and PC presents a value of 67.8%; these two groups were connected by 98.5% support. The phylogenetic relationships between the PA and PG populations are not defined, as observed in the presented phylogeny (Fig. 4).

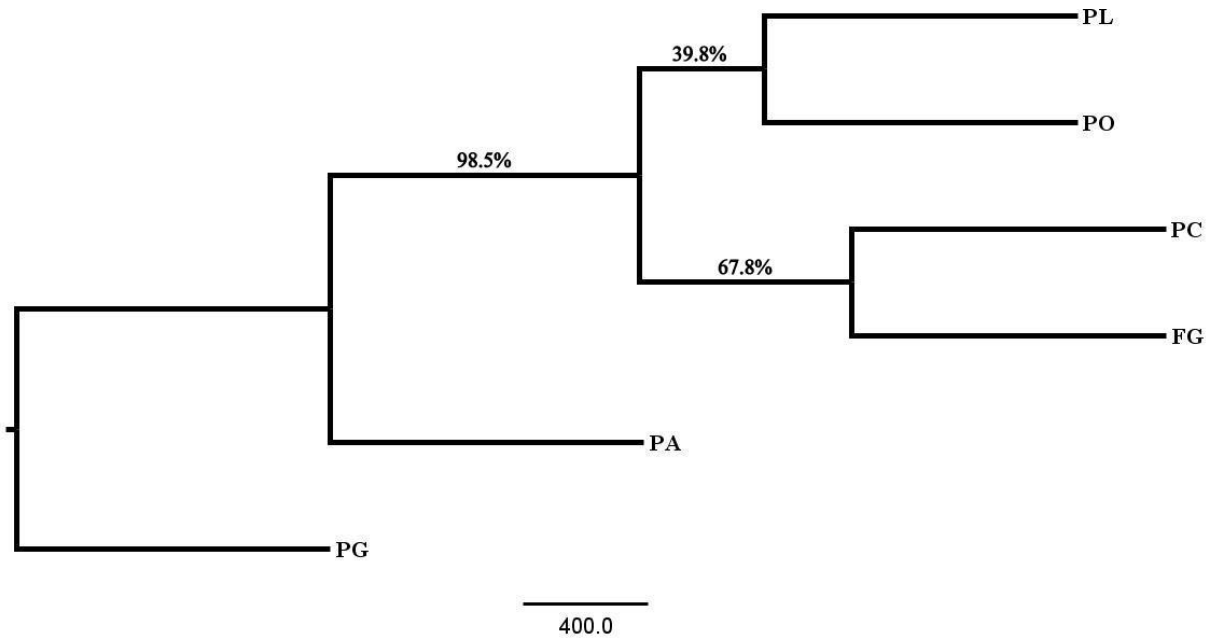


Figure 4. Neighbor-joining tree showing the relationships among six populations of *B. pabstiana*, constructed using the genetic distance matrix (Nei 1978; unbiased estimation) based on 173 ISSR loci. Bootstrap percentages ($\geq 39\%$) are above the branches. For population names: PG – *Pedra do Garraão*, PA – *Pedra Azul*, FG – *Forno Grande*, PC – *Pedra do Caparaó*, PO – *Pedra da Onça* e PL – *Pedra da Lajinha*.

The Structure Bayesian analysis revealed the existence of four different genetic cluster in the dataset, since the $\text{LnP}(K)$ values stabilized at $\Delta K = 4$ according to Evanno method. The proportion of contribution from each genetic cluster in individuals and populations of *B. pabstiana* are displayed in Figure 5, revealing a low genetic structure among the defined genetic clusters and the sampled populations. Despite this low genetic structure, a slight proximity can be observed between some populations. FG and PC populations have individuals more related to blue genetic cluster; PA and PG populations are more related to green cluster; the red genetic cluster are poorly represented um some populations, but high presented in FG and PL populations. When we analyze the general diversity in each population, PL and PO were more diverse, since they display more representation from all genetic groups.

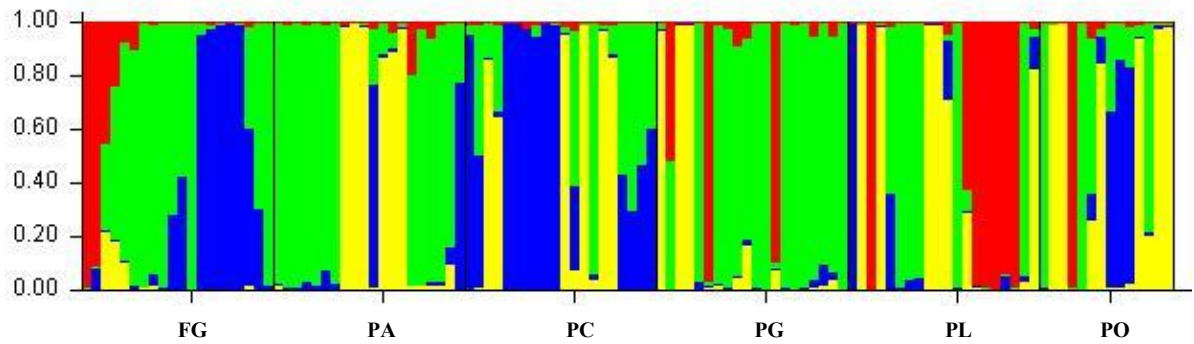


Figure 5. Representation of the genetic structure from Bayesian cluster analysis. Different colors represent different genetic groups. Each vertical line represents a sampled individual, with their inferred genetic constitution according to color proportions. Populations are identified and separated by vertical bars.

DISCUSSION

This is the first study concerning the evaluation of genetic diversity and its distribution in populations of a species belonging to Velloziaceae endemic to inselbergs inserted in Brazilian Atlantic Forest. All collections were performed along rainy season, and consequently in the flowering and/or fructification period of the species. Of the 15 inselbergs that presented occurrence of *Barbacenia pabstiana*, six currently exhibit relatively large populations. We speculate that for the seventh inselberg, Pedra Paulista, the species is locally extinct due to its long history of goat grazing. We believe that this practice has drastically reduced the number of individuals within the populations of this species, as only a single specimen of *B. pabstiana* was found at this location.

According to Colombo et al. (1998) it is necessary to use seven to thirty RAPD primers generating 50-200 polymorphic loci to estimate reliable results between populations. ISSR are dominant markers similar to RAPD; thus the validation of reliable results and a good sample of loci was achieved in this study (Okun et al., 2008; Almeida et al., 2009; Lousada et al., 2013). The percentage of polymorphic loci is sometimes used as a measure of genetic diversity (Ge & Sun, 2001; Alexander et al., 2004; Xia et al., 2007). For example, Ribeiro et al. (2013) found 87.06% polymorphic loci for 16 primers, Lousada et al. (2013) found 37.5% polymorphism for eight primers, Luz (2014) found 89.58% for four primers, and Nazareno et al. (2020) found 27.3% for five primers. Thus, the populations of *Barbacenia pabstiana* showed 76.57% polymorphism for eleven ISSR primers, thus presenting levels of genetic diversity similar to other species analyzed with these markers (Nybom & Bartish, 2000; Arnau et al., 2003; Nybom, 2004; Jin et al., 2006).

When evaluated the Shannon index (I) comparing with species of other botanical families (e.g. Orchidaceae and Bromeliaceae) endemic to inselbergs *B. pabstiana* showed lower levels of genetic diversity in relation to *Cattleya lobata* (Gomes et al., 2017), *Pitcairnia*

flammea (Souza-Sobreira *et al.*, 2015) and *Vriesea cacuminis* (Ribeiro *et al.*, 2013), and higher diversity compared to the *Pseudolaelia vellozicola* complex (Nazareno *et al.*, 2020).

When evaluated the Shannon index (I) comparing with species of other botanical families (e.g. Orchidaceae and Bromeliaceae) endemic to inselbergs *B. pabstiana* showed lower levels of genetic diversity in relation to *Cattleya lobata* (Gomes *et al.*, 2017), *Pitcairnia flammea* (Souza-Sobreira *et al.*, 2015) and *Vriesea cacuminis* (Ribeiro *et al.*, 2013), and higher diversity compared to the *Pseudolaelia vellozicola* complex (Nazareno *et al.*, 2020).

According to Nybom (2004) species with wide geographic distribution tend to present higher values of expected heterozygosity (H_e) compared to endemic species (0.21 and 0.20, respectively), *B. pabstiana* presented H_e value (0.181) close to endemic species. Now when the same set of primers was evaluated, when comparing the mean H_e levels with other species belonging to the Velloziaceae family, *B. pabstiana* showed lower genetic diversity than *Barbacenia paranaensis*, *Vellozia hirsuta* complex and *V. gigantea* (Lousada *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2012; Luz, 2014) and higher than *V. compacta* (Lousada *et al.*, 2013). Even when compared to other vellosias that used other molecular markers, such as alloenzymes for *V. epidendroides* and *V. leptopetala* (Franceschinelli *et al.*, 2006) and with microsatellites for *V. plicata* (de Paula *et al.*, 2017), it also showed lower genetic diversity.

Franceschinelli *et al.* (2006) point out that for endemic species that occur in disjunct and restricted populations usually have fewer polymorphic loci, lower mean number of alleles per locus and lower heterozygosity observed compared to widely distributed species. The Φ_{st} value (0.072) found by AMOVA was lower than other Velloziaceae species (0.143 *Vellozia hirsuta*, 0.439 *V. epidendroides*, 0.266 *V. leptopetala*, 0.559 *V. compacta*, 0.280 *V. gigantea*, and 0.286-0.183 *V. plicata*). This value was also lower than those found by RAPD for species with similar characteristics to *B. pabstiana*, endemic species (0.26), long-lived perennial species (0.25) and species with wind-dispersed seeds (0.25) (Nybom & Bartish, 2000). This

low fixation index (F_{st}) found suggests that the species has low genetic structure and high heterogeneity. This high genetic variability depends on pollination dynamics, seed dispersal dynamics and plant population size in the area (Borba *et al.*, 2001, 2007; Azevedo *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2012).

Unlike what usually occurs in rupestrian fields, where species with high levels of population structuring due to restricted gene flow, the low genetic structuring in populations of *B. pabstiana* may be related to the size of populations in each inselberg, the maintenance of recent gene flow among populations in the same geographic area, and the maintenance of ancient gene similarity, especially among geographic groups (Borba *et al.*, 2001, Jesus *et al.*, 2001). According to Cabral *et al.* (2021) the genus *Barbacenia* diversified in dry environments during the cooling of the Miocene, and these environmental conditions would have facilitated the expansion of the species' range. Subsequently its origin may have been through colonization of isolated habitats and subsequent geographic isolation.

Despite the scarcity of work on pollination and seed dispersal within the genus and family, flowers are pollinated primarily by beetles, ants, and bees, some species by hummingbirds and bats, and dispersal is almost predominantly anemochoric or autochoric (Sazima, 1978; Porembski *et al.*, 1998; Conceição *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2007; 2009; Verçoza, 2012; Luz, 2014). Information on the pollinator and disperser contribution in the emergence and maintenance of gene flow within *B. pabstiana* populations is needed to elucidate how the geographic isolation of these terrestrial islands has influenced the long-term barrier of gene flow.

Studies on patch size, distance between patches, and isolation by distance in Australian (Nevill *et al.*, 2019; Yates *et al.*, 2019) and African (Burke, 2019) inselbergs suggests that geographic distance between populations should not necessarily be considered the only or the best determinant in gene flow exchanges between plants. In *B. pabstiana*, even

with low bootstrap value, the most geographically distant inselbergs (Fig. 2) are closer genetically (Fig. 4). Burke (2019) states that species endemic to inselbergs with short-range dispersal maintain their viable populations through the ability to disperse to the nearest suitable habitat or also through occasional long-range dispersal. Even by species not adapted for this type of dispersal, it can result in the establishment of new populations that remain for long periods thus maintaining gene flow (Cain *et al.*, 2000; Millar *et al.*, 2014). The high gene similarity between the geographically distant populations found in the present study may be explained by a sharing of a unique ancient gene stock dispersed over long distances through ancestral corridors between these non-adjacent inselbergs, and are currently restricted on the tops of these mountains (Flantua *et al.*, 2019; Rahbek *et al.*, 2019; Cabral *et al.*, 2021).

Implications for conservation and future research

The inselbergs of capixabas have a great diversity of species. Efforts to collect data on phytosociology, community structure and population genetics are essential to fill information gaps and expand the floristic and phytogeographic knowledge of these rupicolous outcrops inserted in the Atlantic Forest (Covre *et al.*, 2020; Pinto-Júnior *et al.*, 2021). Furthermore, management and conservation policies are essential to protect this unique vegetation that harbor many endangered species, rare and endemic to rocky outcrops.

Anthropic effects, such as agriculture and livestock farming, in the vicinity of inselberg vegetation have favored the colonization of these outcrops by invasive and exotic species due to their open character (de Paula *et al.*, 2015; Pinto-Júnior *et al.*, 2021; Rocha & Pinto, 2021;). Another important threat, especially for Espírito Santo State in Brazil, is large-scale mining. The exploitation of these terrestrial islands for the commercialization of ornamental rocks has reduced entire rupicolous communities, of which their richness and

diversity are unknown (Mundial, 2016; Veronez & Montaña, 2017; Faria & Silva, 2017; Almeida *et al.*, 2019; Amarante *et al.*, 2021).

Lousada *et al.* (2013) point out that for *Vellozia gigantea*, human disturbances such as fire, cattle grazing, tourism, and illegal collection of ornamental plants did not affect the species diversity. For *B. pabstiana*, different populations were surrounded by monocultures (Pedra do Caparaó by coffee and eucalyptus plantations, Pedra do Garrafão by strawberries and eucalyptus fields, and Pedra da Onça by coffee plantations) and receive tourists frequently (Forno Grande and Pedra Azul) showed lower genetic diversity in comparison to the inselberg that still has a surrounding matrix of native vegetation and low tourism (Pedra da Lajinha) (Supplementary material: Figure 3). Although genetic diversity is high in all inselbergs, anthropogenic disturbances have influenced the genetic compositions of these populations. The Pedra da Onça inselberg occasionally suffers from unnatural burning, drastically reducing the number of individuals of the populations present within the rupicolous community. It was the only area that presented less than 20 individuals for the analyses. The Pedra Paulista inselberg has a history of goat grazing, and we speculate that this practice has drastically reduced the number of individuals within the populations of this species, since only a single specimen of *B. pabstiana* was found in this outcropping.

According to Yates *et al.* (2019), to increase effectiveness in conservation strategies we should focus on protecting multiple inselbergs across different regional climatic gradients, rather than a few inselbergs or those with the highest species richness and diversity. Adequate protection of these inselbergs is therefore of utmost importance. This is currently the case for Forno Grande and Pedra Azul which are inserted within a Conservation Unit (UC), whereas the terrestrial islands of Pedra do Caparaó, Pedra da Onça, Pedra do Garrafão and Pedra da Lajinha are not located in protected areas.

Considering that it would not be realistic to preserve all inselbergs, we suggest, based on the data presented here, that Pedra da Lajinha inselberg could be a site for the creation of a protected area. The population of this inselberg showed the highest genetic diversity among the sampled populations, presenting genetic composition of all genetic groups present in the species. In addition, it is located in an area with low impact caused by human activities, and possesses an extensive area of native vegetation, which includes rupicolous plants with surrounding Atlantic Forest formations.

Pollination, dispersal and evolutionary history are some of the aspects that have not been investigated in this study. Therefore phylogeographic and ecological studies should be considered in the future to understand important aspects about the biological evolution in these unique environments. Understanding all these factors would help to identifying vulnerable areas that need protection due to climate change and habitat alteration through human impact.

CONCLUSION

This is the first study to evaluate levels of genetic diversity and its distribution in populations of a species belonging to the family Velloziaceae endemic to Brazilian Atlantic Forest inselbergs. Currently the species *Barbacenia pabstiana* presents relatively large populations distributed in six inselbergs.

Despite the high genetic diversity of the populations studied, anthropogenic disturbances have influenced the coverage and distribution of the species within rupicolous communities. Inselbergs that receive tourism frequently and that are surrounded by a vegetation matrix composed of monocultures showed lower genetic diversity, as well as a reduced number of individuals per population. Given the high genetic variability in populations of *B. pabstiana* in the Pedra da Lajinha inselberg, the creation of a Conservation Unit is justified and supported in order to preserve a significant part of the inselberg flora.

Finally, studies on pollination, dispersal and evolutionary history are some of the aspects that have not been investigated and, therefore, these studies should be considered in the future for understanding the distribution of the species under climate change and other human impacts.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Neotropical Grassland Conservancy (NGC) for The Student Grant Program (SGP), which subsidized our lodging, food, and transportation expenses. To C. David; N. Silva; G. Rodrigues; I. Coimbra; L. Dias; Ferreira family; Caparaó community, C. Sarnágua, I. Sarnágua *in memoria*, J.A. Binda; J. Mageski; A.F. Ribeiro; F.A. Fiorotti; R.C. Armini; T. Bragatto, D. Lopes, J.L.C. Vieira and to M.C. Silva for help with the population sampling. And to the professors and students of the Plant Growth Unit (UCP) laboratory of the Federal University of Viçosa for providing the facilities for the experiments and data analysis. This study was funded by projects of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- ABIROCHAS** – Associação Brasileira da Indústria de Rochas Ornamentais. 2021. Balanço das exportações e importações brasileiras de rochas ornamentais em 2019: informe 01/2020. Disponível em: https://abirochas.com.br/wp-content/uploads/2020/10/Informe-01_2020-Balanco_2019.pdf. Acesso em 08 jul.
- ALEXANDER, J.A.; LISTON, A.; POPOVICH, S.J. 2004. Genetic diversity of the narrow endemic *Astragalus oniciformis* (Fabaceae). **American Journal of Botany**. 91: 2004-2012.
- ALMEIDA, C.M.A.; LIMA, S.E.N.; LIMA, G.S.A.; BRITO, J.Z.; DONATO, V.M.T.S.; SILVA, M.V. 2009. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência e Agrotecnologia**. 33: 1771-1776.
- ALMEIDA, M.R.R.; MALVESTIO, A.C.; BERNADI, Y.R. 2019. Modificações do licenciamento ambiental em Minas Gerais: avanço ou retrocesso? **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, 52, 91–113.
- AMARNTE, L.M.; YAMANE, L.H.; SIMAN, R.R.; SILVA-FILHO, R.; VERONEZ, F.A. 2021. Proposição de diretrizes considerando a vulnerabilidade ambiental para os Estudos de Impacto Ambiental de extração de rochas ornamentais. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.4, p. 36240-36262.
- ARNAU, G.; LALLEMAND, J.; BOURGOIN, M. 2003. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Euphytica**. 129: 69-79.
- ASSIS, A. M.; THOMAS, L.D.; PEREIRA, O.J. 2004. Florística de um trecho de floresta de restinga no Município de Guarapari, Espírito Santo, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 18(1): 191-201.
- AZEVEDO, M.T.A.; BORBA, E.L.; SEMIR, J.; SOLFERINI, V.N. 2007. Very high genetic variability in *Neotropical myophilous* orchids. **Bot J Linn Soc** 153:33–40.
- BARBOSA, A. R.; FIORINI, C. F.; SILVA-PEREIRA, V.; MELLO-SILVA, R.; BORBA, E. L. 2012. Geographical genetic structuring and phenotypic variation in the *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) ochlospecies complex. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 9, p. 1477-1488.
- BORBA, E.L.; FELIX, J.M.; SOLFERINI, V.N.; SEMIR, J. 2001. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. **Am J Bot** 88: 419-428.
- BORBA, E.L.; FUNCH, R.R.; RIBEIRO, P.L.; SMIDT, E.C.; SILVA-PEREIRA, V. 2007. Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophronitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, **Brazil. Pl Syst Evol** 267:129–146.
- BRASIL. **Lei N9.985**, de 18 de julho de 2000. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19985.htm. Acessado em: 8 jul. 21.
- BREMER H., SANDER H. (2000) Inselbergs: Geomorphology and Geocology. In: Porembski S., Barthlott W. (eds) Inselbergs. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), vol 146. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59773-2_2.
- BURKE, A. 2003. *Inselbergs* in a changing world – global trends. **Diversity and Distributions**, v. 9, p. 375–383.
- BURKE, A. 2019. How important is patch size relative to patch isolation in an arid inselberg landscape? **S. Afr. J. Bot.**, 127, pp. 1-11.
- CABRAL, A.; LUEBERT, F.; MELLO-SILVA, R. 2021. Evidence for Middle Miocene origin and morphological evolutionary stasis in a Barbacenia Inselberg clade (Velloziaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 161, p. 107163.
- CAIAFA, A.N. & SILVA, A.F. 2005. Composição florística e espectro biológico de um Campo de Altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais – Brasil. **Rodriguésia** 56:163-173.
- CAIAFA, A.N. & SILVA, A.F. 2007. Structural analysis of the vegetation on a highland granitic rock outcrop in Southeast Brazil. **Revista Brasil. Bot.**, v.30, n.4, p.657-664.
- CAIN, M.L.; MILLIGAN, B.G.; STRAND, A.E. 2000. Long-distance dispersal in plant populations. **American Journal of Botany**, 87, 1217–1227.
- CHRIST, J.A.; SARNAGLIA-JUNIOR, V.B.; BARRETO, L.M.; GUIMARÃES, E.F.; GARBIN, M.L.; CARRIJO, T.T. 2016. The genus *Piper* (Piperaceae) in the Mata das Flores State Park, Espírito Santo, Brazil. **Rodriguésia** 67: 1031-1046.
- COLOMBO, C.; SECOND, G.; VALLE, T.L.; CHARRIER, A. 1998. Genetic diversity characterization of cassava cultivars *Manihot esculenta* Crantz. RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**. 21: 105-113.
- CONCEIÇÃO, A.A.; FUNCH, L.S.; PIRANI, J.R. P. 2007. Phenology, pollination and seed dispersal syndromes on sandstone outcrop vegetation in the "Chapada Diamantina", northeastern Brazil: population and community analyses. **Rev Bras Bot** 30: 475-485.

- CONCEIÇÃO, A.A.; GIULIETTI, A.M.; MEIRELLES, S.T. 2007a. Ilhas de vegetação em afloramentos de quartzito-arenito no Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Acta Bot. Bras.** v.21(2): p.335-347.
- CORLETT, R. AND TOMLINSON, K. 2020. Climate Change and Edaphic Specialists: Irresistible Force Meets Immovable Object? **Trends in Ecology & Evolution**, 35(4), pp.367-376.
- COVRE, J.M.C.; COUTO, D.R.; DIAS, H.M.; ZORZANELLI, J.P.F. 2021. Vascular plants on inselberg landscapes in Espírito Santo state: bases for the creation of a protected area in southeastern Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 43(1), e54760.
- CRUZ, D.T.; SELBACH-SCHNADELBACH A.; LAMBERT, S.M.; RIBEIRO, P.L.; BORBA, E.L. 2011. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. **Plant Syst and Evol** 294: 87-98.
- DE PAULA, L.F.A.; FORZZA, R.C.; NERI, A.V.; BUENO, M.L.; POREMBSKI, S. 2016. Sugar Loaf Land in south-eastern Brazil: a centre of diversity for mat-forming bromeliads on inselbergs. **Botanical Journal of the Linnean Society** 181: 459-476.
- DE PAULA, L.F.A.; MOTA, N.F.; VIANA, P.L.; STEHMANN, J.R. F 2017. floristic and ecological characterization of habitat types on an inselberg in Minas Gerais, southeastern Brazil. **Acta Bot. Brasilica** 31, 199–211.
- DE PAULA, L.F.A.; NEGREIROS, D.; AZEVEDO, L.O.; FERNANDES, R.L.; STEHMANN, J.R.; SILVEIRA, F.A.O. 2015. Functional ecology as a missing link for conservation of a resource-limited flora in the Atlantic forest. **Biodivers Conserv** 24:2239–2253.
- EVANNO, G., REGNAUT, S.; GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, 14(8), pp.2611-2620.
- FARIA, G.C.; SILVA, F.M. 2017. Participação pública no processo de avaliação de impacto ambiental no estado do Espírito Santo. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, 43, 139–151.
- FLANTUA, S.G.A., O'DEA, A., ONSTEIN, R.E., GIRALDO, C., HOOGHIEMSTRA, H. 2019. The flickering connectivity system of the north Andean páramos. **J. Biogeogr.** 46 (8), 1808–1825.
- Flora do Brasil 2020.** Disponível em: floradobrasil.jbrj.gov.br. Acesso em: 8 jul. 2021.
- FRANCESCHINELLI, E.V.; JACOBI, C.M.; DRUMMOND, M.G.; RESENDE, M.F.S. 2006. The genetic diversity of two Brazilian *Vellozia* (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. **Ann Bot** 97:585–592.
- GE, X. J.; SUN, M. 2001. Population genetic structure of *Ceriops tagal* (Rhizophoraceae) in Thailand and China. **Wetlands Ecology and Management**. 9: 203-209.
- GOMES, P.C.L.; SMIDT, E.C.; FRAGA, C.N.; SILVA-PEREIRA, V. 2018. High genetic variability is preserved in relict populations of *Cattleya lobata* (Orchidaceae) in the Atlantic Rainforests inselbergs. **Revista Brasileira de Botânica**, 41:185-195.
- JESUS, F.F.; SOLFERINI, V.N.; SEMIR, J.; PRADO, P.I. 2001. Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. **PI Syst Evol** 226:59–68.
- JIN, Y.; HE, T.; LU, B. 2006. Genetic spatial clustering: significant implications for conservation of wild soybean *Glycine soja* (Fabaceae). **Genetica**. 128: 41- 49.
- LOUSADA, J.M.; LOVATO, M.B.; BORBA, E.L. 2011. Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. **Genetica** 139(4):431-40. doi: 10.1007/s10709-011-9561-5.
- LOUSADA, J.M.; LOVATO, M.B.; BORBA, E.L. 2013. High genetic and low genetic variability in disjunct populations of the endemic *Vellozia compacta* (Velloziaceae) occurring in two edaphic environments of Brazilian campos rupestres. **Rev Bras Bot.** doi: 10.1007/s40415-013-0001-x.
- LUZ, P.M. 2014. **Biologia reprodutiva e genética de populações de *Barbacenia paranaensis* L.B.SM. (Velloziaceae), espécie endêmica e ameaçada de extinção no Paraná.** Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 77 p.
- MACHADO, C.G. 2009. Beija-flores (Aves: Trochilidae) e seus recursos florais em uma área de caatinga da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Zoo** 26 (2): 255-265.
- MACHADO, C.G.; COELHO, A.G.; SANTANA, C.S., RODRIGUES, M. 2007. Beija-flores e seus recursos florais em uma área de campo rupestre da Chapada Diamantina, Bahia. **Rev Bras de Ornitologia** 15 (2): 267-279.
- MARTINELLI, G. 2007. Mountain biodiversity in Brazil. **Revista Brasil. Bot.**, v.30, n.4, p.587-597.
- MATIOLI, S.R. & FERNANDES, F.M.C. 2012. **Biologia Molecular e Evolução.** Editora Holos, Ribeirão Preto, SP, 250 p.
- MENDES, S.L. & PADOVAN, M.P.A. 2000. Estação Biológica de Santa Lúcia, Santa Teresa, Espírito Santo. **Bol. Mus. Biol. Mello Leitão** (N. Ser.). 11/12: 7-34.

- MILLAR, M.A.; COATES, D.J.; BYRNE, M. 2014. Genetic connectivity and diversity in inselberg populations of *Acacia woodmaniorum*, a rare endemic of the Yilgarn Craton banded iron formations. **Heredity** 111:437–444.
- NAZARENO, A.G.; MENINI NETO, L.; BUZATTI, R.S.; VAN DEN BERG, C.; FORZZA, R.C. 2020. Four raised to one equals one: A genetic approach to the *Pseudolaelia vellozicola* complex does not follow a math rule. **Ecology and Evolution** 10: 4562–4569.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** 89:583–590.
- NEVILL, P.G.; ROBINSON, T.P.; VIRGILIO, G.D.; WARDELL-JOHNSON, G. 2019. Beyond isolation by distance: What best explains functional connectivity among populations of three sympatric plant species in an ancient terrestrial island system? **Diversity and Distributions**, 25, 1551–1563.
- NOVELLI, F.Z. 2010. A Reserva Biológica de Duas Bocas e seus vínculos com a história da conservação no Espírito Santo. **Natureza on Line** 8(2):57-59.
- NYBOM, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**. 13: 1143-1155.
- NYBOM, H.; BARTISH, I. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics**. 3: 93-114.
- OKUN, D.O.; KENYA, E.U.; OBALLA, P.O.; ODEE, D.W.; MULUVI, G.M. 2008. Analysis of genetic diversity in *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) seed sources using inter simple sequence repeats (ISSR) molecular markers. **African Journal of Biotechnology**. 7: 2119-2123.
- PINTO-JUNIOR, H.; VILLA, P.; PEREIRA, M.; MENEZES, L. 2021. The pattern of high plant diversity of Neotropical inselbergs: highlighting endemic, threatened and unique species. **Acta Botanica Brasilica**. doi.org/10.1590/0102-33062020abb0129.
- POREMBSKI, S. 2007. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 4, p. 579-586.
- POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. 2000. Granitic and gneissic outcrops (*inselbergs*) as centers of diversity for desiccationtolerant vascular plants. **Plant Ecology**, v. 151, p. 19–28.
- POREMBSKI, S.; MARTINELLI, G.; OHLEMÜLLER, R.; BARTHLOTT, W. 1998. Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on *inselbergs* in the Brazilian Atlantic rainforest. **Divers Distrib**, v. 4, p. 107.
- PRIMACK, R.B. & RODRIGUES, E. 2001. **Biologia da Conservação**. Editora Planta, Londrina, 327p.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155: 945-959.
- RAHBEK, C., BORREGAARD, M.K., COLWELL, R.K., DALSGAARD, B., HOLT, B.G., MORUETA-HOLME, N., NOGUES-BRAVO, D., WHITTAKER, R.J., FJELDSÅ, J. 2019. Humboldt's enigma: What causes global patterns of mountain biodiversity? **Science** 365, 1108–1113.
- RIBEIRO, P.; BORBA, E.; DE CAMARGO SMIDT, E.; LAMBERT, S.; SCHNADELBACH, A.; VAN DEN BERG, C. 2007. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. **Plant Systematics and Evolution**, 270(1-2), pp.109-137.
- RIBEIRO, P.C.C.; PINHEIRO, L.C.; DOMINGUES, R.; FORZZA, R.C.; MACHADO, M.A.; VICCINI, L.F. 2013. Genetic diversity of *Vriesea cacuminis* (Bromeliaceae): An endangered and endemic Brazilian species. **Genetics and Molecular Research** 12: 1934–1943.
- RIBEIRO, P.L.; BORBA, E.L.; SMIDT, E.C.; LAMBERT, S.M.; SCHNADELBACH, A.S.; VAN DEN BERG, C. 2008. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. **Pl Syst Evol** 270:109–137.
- ROCHA, L.G.D.S.; PINTO, J.R.R. 2021. Diversity and structural changes in *Cerrado Rupestre* under effects of disturbances. **Braz. J. Bot** 44, 213–225.
- RODRIGUES, W.F.; MAIA, R.P. AND GOMES, D.D.M. 2019. Condicionamento morfoestrutural do *inselberg* Pedra da Andorinha, Sertão Norte do Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Geomorfologia**, 20(4).
- SAZIMA, M. 1978. Biologia floral de espécies de Velloziaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais. **Tese, Universidade de São Paulo**.
- SMITH, L.B. & AYENSU, E.S. 1976. **A Revision of American Velloziaceae**. Smithsonian Institution Press. City of Washington.
- SMOUSE, P. E.; BANKS, S. C.; PEAKALL, R. 2017. Converting quadratic entropy to diversity: Both animals and alleles are diverse, but some are more diverse than others. **Plos One** 12, e0185499.

SOUZA-SOBREIRA, F.B.; SOUZA, G.B.; ROSADO, C.C.G.; MIRANDA, F.D.; SOARES, T.C.B.; GONTIJO, A.B.P.L. 2015. Genetic diversity in three natural populations of *Pitcairnia flammea* (L.) John (Bromeliaceae) estimated by ISSR markers. *Genet. Mol. Res.* 14: 15892-15901.

SpeciesLink Network. Disponível em: <http://www.splink.org.br/>. Acesso em: 8 jul. 2021.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, v. 38, n. 7, p. 3022-3027.

VERÇOZA, F.C. 2012. Polinização de *Vellozia candida* Mikan (Velloziaceae) nos Afloramentos Rochosos do Costão de Itacoatiara, Niterói, RJ: Um Caso de Melitofilia em Inselbergue do Brasil. *EntomoBrasilis*, v. 5, n. 1, p. 29-32.

VERONEZ, F.; MONTAÑO, M. 2017. Análise da qualidade dos estudos de impacto ambiental no estado do Espírito Santo (2007-2013). *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, 43, 6–21.

VIEIRA, B.C.; SALGADO, A.A.R.; SANTOS, L.J.C. 2015. Landscapes and Landforms of Brazil - World Geomorphological Landscapes. Dordrecht, *Springer*.

XIA, T.; CHEN, S.; CHEN, S.; ZHANG, D.; GAO, Q.; GE, X. 2007. ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 35: 209-214.

YATES, C.J.; ROBINSON, T.; WARDELL-JOHNSON, G.W.; KEPPEL, G.; HOPPER, S.D.; SCHUT, A.G.T.; BYRNE, M. 2019. High species diversity and turnover in granite inselberg floras highlight the need for a conservation strategy protecting many outcrops. *Ecology and Evolution*, v. 9, n. 13, p. 7660-7675.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table 1. List with the municipalities studied and their respective georeferenced inselbergs.

Municipality	Inselberg	Geographic Coordinate
Castelo	Pedra de Forno Grande	20°30'39.6"S 41°05'24.0"W
Alegre	Pedra de Bons Aires	20°43'26.0"S 41°25'20.0"W
Domingos Martins	Pedra Azul	20°25'27.4"S 40°59'43.8"W
Santa Teresa	Pedra Toma Vento	19°54'39.0"S 40°48'25.0"W
Santa Maria de Jetibá	Pedra do Garrafão	20°10'39.0"S 40°55'11.0"W
Santa Teresa	Pedra da Onça	19°53'52.0"S 40°48'53.0"W
Itarana	Pedra de São Sebastião	19°59'34.0"S 40°51'35.0"W
Itarana	Pedra Alegre	19°53'20.0"S 40°49'29.0"W
Itaguaçu	Pedra do Caparaó	19°44'29.0"S 40°58'52.0"W
Itaguaçu	Cachoeirão	19°45'04.0"S 40°56'05.0"W
Itaguaçu	Pedra Paulista	19°50'02.0"S 40°47'36.0"W
São Roque do Canaã	Alto Misterioso	19°48'11.8"S 40°46'13.7"W
Águia Branca	Santa Luzia	18°58'40.0"S 40°39'56.0"W
Fundão	Pedra do Goiapaba-Açu	19°54'51.0"S 40°28'20.0"W
Afonso Cláudio	Pedra da Lajinha	20°00'22.3"S 41°05'56.0"W

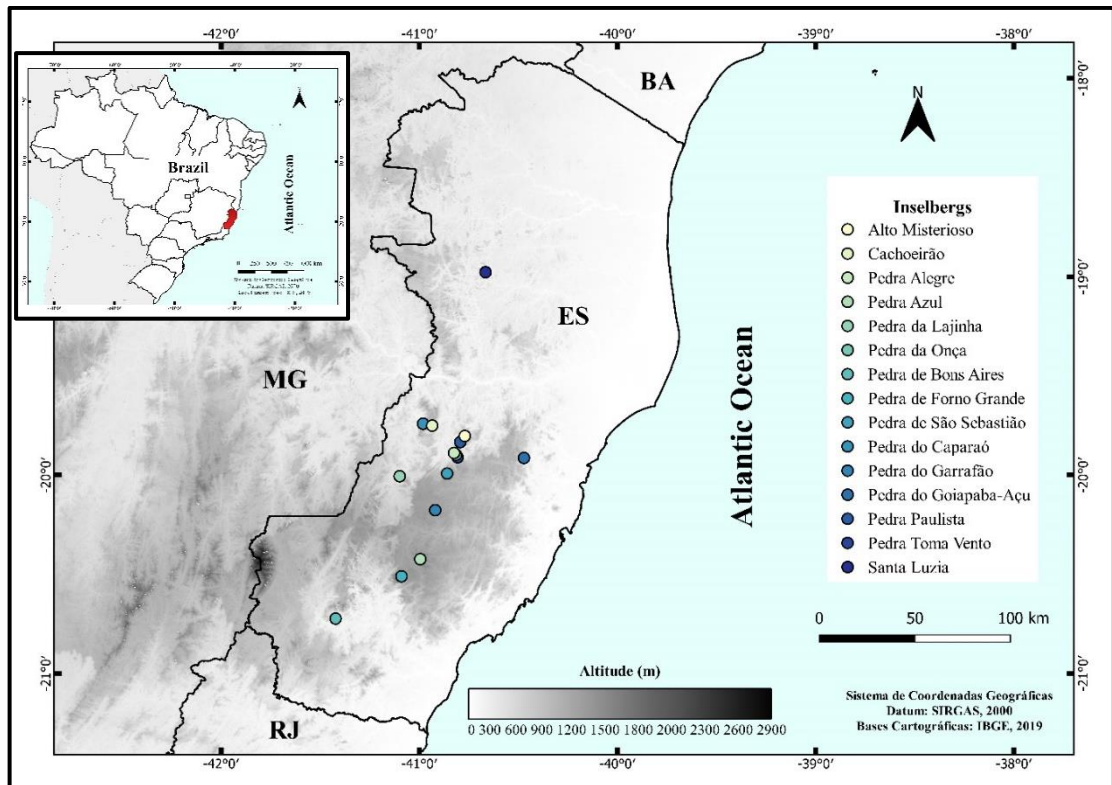


Figure 1. Thumbnail, map of Brazil with emphasis on the state of Espírito Santo (red).

Highlighted map of ES with all inselbergs that would present occurrence of *B. pabstiana*

according to the records in herbarium collections. **Map source:** W.S. Justino

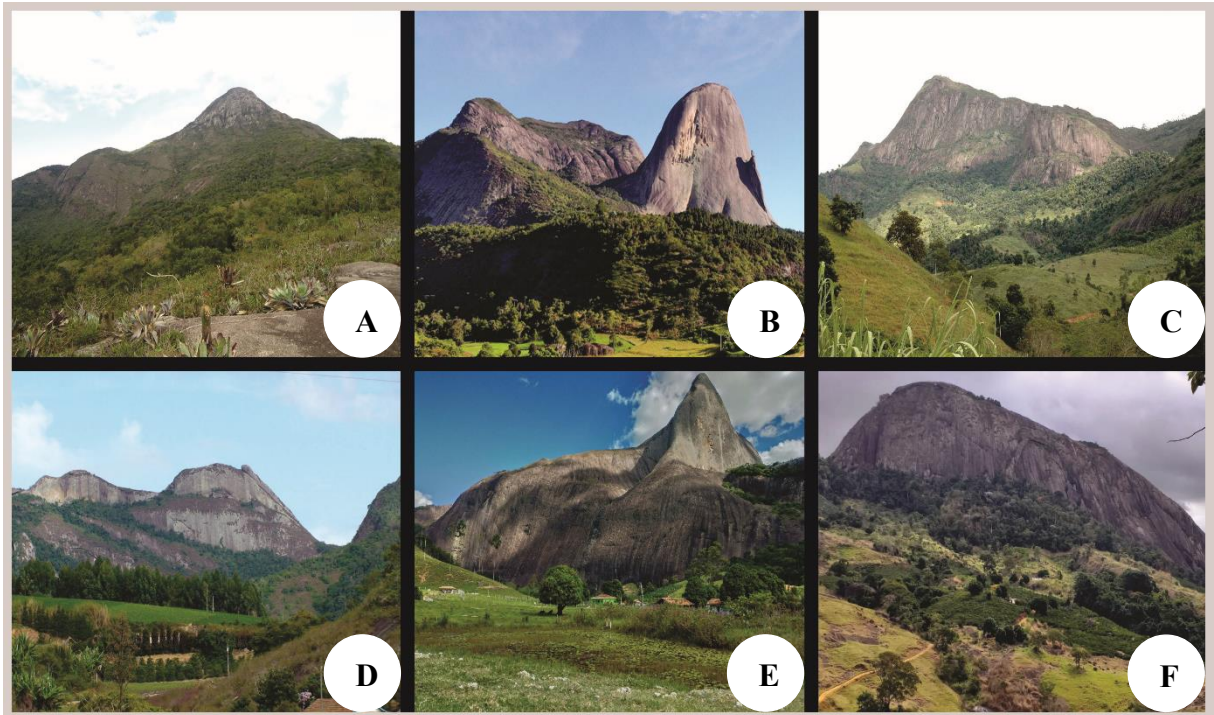


Figure 2. Inselbergs where populations of *Barbacenia pabstiana* still occur. a) Forno grande, **image source:** W.S. Justino; b) Pedra Azul, **image source:** <https://apureguria.com>; c) Pedra do Caparaó, **source image:** <https://www.itaguacu.es.gov.br/>; d) Pedra do Garrafão, **source image:** <https://mapio.net/pic/p-16574449/>; e) Pedra da Lajinha, **source image:** <https://blogdestinoes.com.br/pedra-da-lajinha/>; f) Pedra da Onça, **source image:** W.S. Justino.

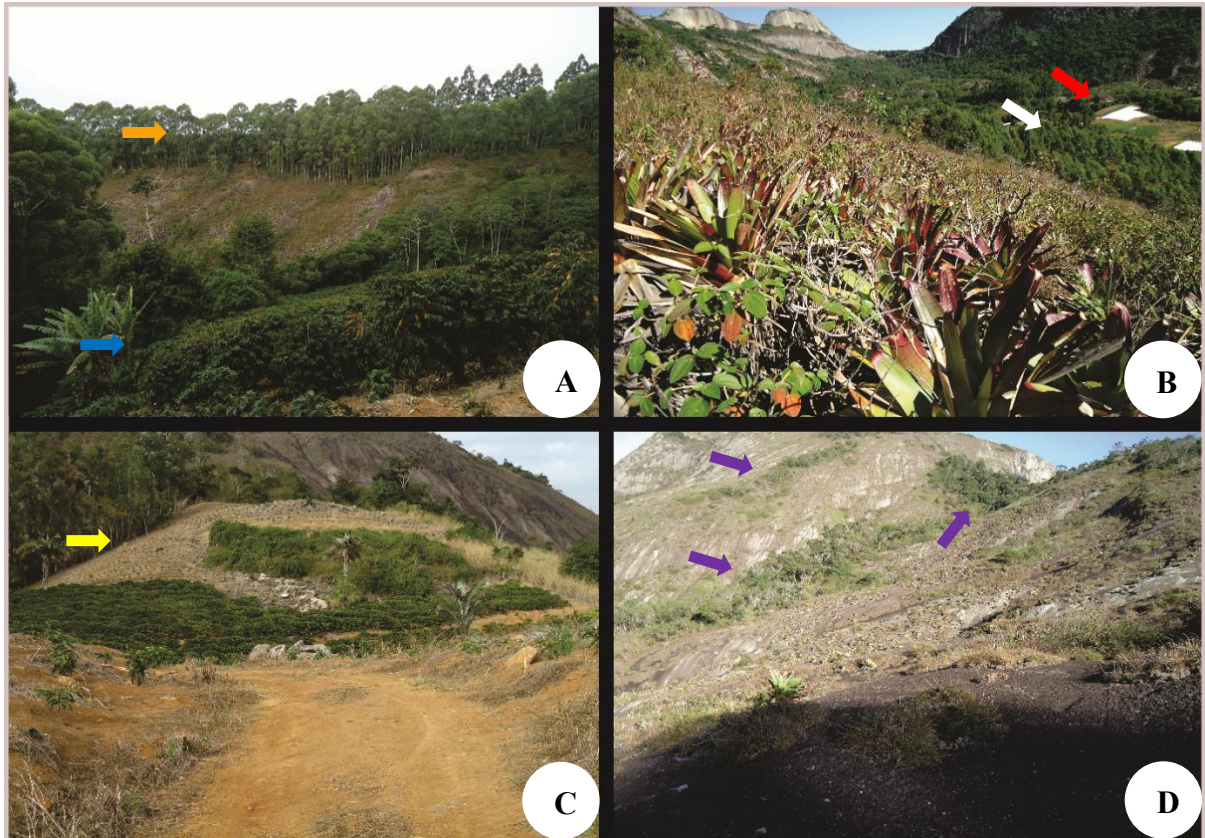


Figure 3. Anthropic actions that have impacted rupicolous communities in Espírito Santo. In a) inselberg Pedra do Caparaó, blue arrow showing the coffee plantations and orange arrow showing the eucalyptus; b) inselberg Pedra do Garrafão, white arrow showing the eucalyptus and red the strawberry trees; c) inselberg Pedra da Onça, yellow arrow showing the coffee plantations; d) inselberg Pedra da Lajinha purple arrow showing the native forest. Image source: personal archive. **Image source:** W.S Justino.

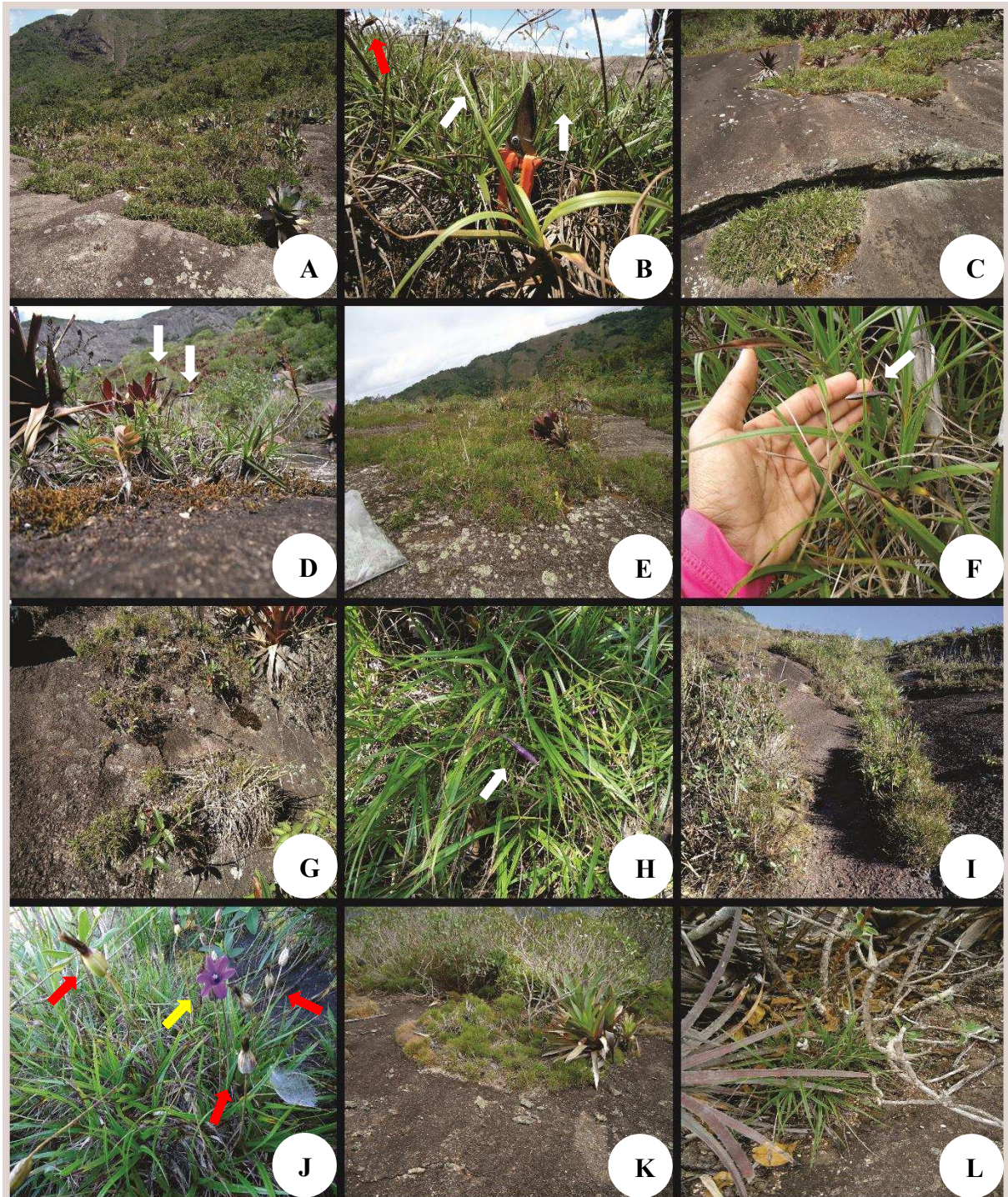


Figure 4. Mats monocot *Barbacenia pabstiana* in the inselbergs: a-b) Forno Grande; c-d) Blue Stone; e-f) Pedra do Caparaó; g-h) Pedra do Garrafão; i-j) Pedra da Lajinha; k-l) Stone of the Jaguar. White arrows highlighting the flower buds, yellow arrow the flower and red arrows the fruits. **Image source:** W.S Justino.

Table 2. Main characteristics of geology, temperature, rainfall and altitude of the inselbergs that present viable populations of *B. pabstina*.

	Forno Grande	Pedra Azul	Pedra do Caparaó	Pedra do Garrafão	Pedra da Lajinha	Pedra da Onça
Geology (CPRM)	Granite, allanite, titanite, granodiorite and medium to fine grained diorite	Granite and gneiss	Granito, granitoide, gnaisse e migmatito	Gneisses, microcline, plagioclase, quartz and biotite	Granite, granitoid, biotite-rich gneisses and garnets	Granito, granitoide, gnaisse e migmatito
Weather (Köppen, 1948)	Cwb – High Altitude Subtropical	Aw - Tropical	Aw - Tropical	Cwa - Tropical Altitude	Aw - Tropical	Cwa – Tropical Altitude
Average temperature (Incaper)	15°C	19°C	23,45°C	22°C	20,6°C	21,1°C
Annual rainfall (Incaper)	1.098 mm	1.200 mm	1.066 mm	1.250 mm	1.141 mm	1.282 mm
Forest Matrix (Garbin <i>et al.</i>, 2017)	Dense Ombrophyllous Montane Forest	Dense Ombrophyllous Montane Forest	Dense Ombrophilous Forest	Dense Ombrophilous Forest	Open Ombrophyllous Forest	Dense Ombrophilous Forest
City Altitude (Incaper)	100 m	542 m	150 m	700 m	350 m	645 m
Sample Point Altitude	1.480 m	1.200 m	850 m	1.000 m	900 m	980 m

4. CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho foram desenvolvidos estudos de variabilidade e estruturação genética de populações da *Barbacenia pabstiana* a fim de investigar a distribuição da diversidade em diferentes populações da espécie nos diferentes inselbergues distribuídos na região sudeste da Mata Atlântica Brasileira.

A utilização de marcadores ISSR, nos permitiu obter um panorama mais amplo a respeito do padrão de distribuição da variabilidade genética atual das populações e dos possíveis eventos físicos que estão moldando a variação genética da espécie, como por exemplo, a remoção de matas ciliares aos afloramentos rochosos. *Barbacenia pabstiana* apresenta diversidade genética intrapopulacional baixa, especialmente considerando que se trata de uma espécie com distribuição restrita.

Considerando o isolamento espacial entre os inselbergues escolhidos para as análises, a paisagem ainda não influenciou na estruturação genética dessas populações. A proximidade genética entre inselbergs distantes geograficamente sugere que as populações estão isoladas recentemente na escala geológica. O que reforça o trabalho de Cabral *et al.*, (2021) sobre a diversificação da espécie na Serra da Mantiqueira ter ocorrido aproximadamente 4Ma.

Mesmo as populações partilhando do mesmo *pool* gênico, em termos de conservação, o *inselberg* Pedra da Lajinha abriga a população com maior diversidade genética em relação as demais populações. A implantação de uma Unidade de Conservação nesse *inselberg* é pertinente, uma vez que ações antrópicas, como pastoreio, fogo e extração mineral, têm ameaçado as comunidades onde ocorre a *B. pabstiana*.

Por fim, este trabalho abre a perspectiva de novos estudos relacionados principalmente à biologia reprodutiva da espécie. Estudos deste tipo seriam fontes de informação sobre a biologia de sistemas de reprodução e dispersão encontrados nestas populações. Quais são seus polinizadores e como o comportamento destes polinizadores estão influenciando na estruturação genética destas populações.

5. REFERÊNCIAS GERAIS

- ABIROCHAS** – Associação Brasileira da Indústria de Rochas Ornamentais. Balanço das exportações e importações brasileiras de rochas ornamentais em 2019: informe 01/2020. Disponível em: https://abirochas.com.br/wp-content/uploads/2020/10/Informe-01_2020-Balanco_2019.pdf. Acesso em 08 jul. 2021.
- AB'SÁBER AN. Domínios morfoclimáticos e províncias fitogeográficas do Brasil. *Revista Orientação*, Instituto de Geografia da Universidade de São Paulo (IGEOG / USP) 3: 45–48, 1967.
- AB'SÁBER AN. No domínio das caatingas. Em Monteiro S, Kaz L, eds. *Sertanejos Caatinga-Sertão*. Rio de Janeiro: Livroarte, 37–46, 1994/1995.
- ALCANTARA, S.; REE, R.; MELLO-SILVA, R. Accelerated diversification and functional trait evolution in Velloziaceae reveal new insights into the origins of the campos rupestres' exceptional floristic richness. *Annals of Botany*, 122(1), pp.165-180, 2018.
- ALEXANDER, J.A.; LISTON, A.; POPOVICH, S.J. Genetic diversity of the narrow endemic *Astragalus oniciformis* (Fabaceae). *American Journal of Botany*. 91: 2004-2012. 2004
- ALI, F.; NADEEM, M.A.; HABYARIMANA, E.; YILMAZ, A.; NAWAZ, M.A.; KHALIL, I.H.; ERCİŞLI, S.; CHUNG, G.; CHAUDHARY, H.J.; BALOCH, F.S. Molecular characterization of genetic diversity and similarity centers of safflower accessions with ISSR markers. *Brazilian Journal of Botany*, v. 43, n. 1, p. 109-121, 2020.
- ALMEIDA, C.M.A.; LIMA, S.E.N.; LIMA, G.S.A.; BRITO, J.Z.; DONATO, V.M.T.S.; SILVA, M.V. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. *Ciência e Agrotecnologia*. 33: 1771-1776. 2009.
- ALMEIDA, M.R.R.; MALVESTIO, A.C.; BERNADI, Y.R. Modificações do licenciamento ambiental em Minas Gerais: avanço ou retrocesso? *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, 52, 91–113, 2019.
- AMARANTE, L.M.; YAMANE, L.H.; SIMAN, R.R.; SILVA-FILHO, R.; VERONEZ, F.A. Proposição de diretrizes considerando a vulnerabilidade ambiental para os Estudos de Impacto Ambiental de extração de rochas ornamentais. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v.7, n.4, p. 36240-36262. 2021
- APTE, G.S.; BAHULIKAR, R.A.; KULKARNI, R.S.; LAGU, M.D.; KULKARNI, B.G.; SURESH, H.S.; RAO, P.S.N.; GUPTA, V.S. Genetic diversity analysis in *Gaultheria fragrantissima* Wall. (Ericaceae) from the two biodiversity hotspots in India using ISSR markers. *Curr. Scien* 91(12): 1634-1640, 2006.
- ARNAU, G.; LALLEMAND, J.; BOURGOIN, M. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Euphytica*. 129: 69-79. 2003.
- ASSIS, A. M.; THOMAS, L.D.; PEREIRA, O.J. 2004. Florística de um trecho de floresta de restinga no Município de Guarapari, Espírito Santo, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 18(1): 191-201. 2004
- AZEVEDO, M.T.A.; BORBA, E.L.; SEMIR, J.; SOLFERINI, V.N. Very high genetic variability in *Neotropical myophilous* orchids. *Bot J Linn Soc* 153:33–40. 2007.
- BARBOSA A.R. Biossistemática do complexo *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) baseada em análise filogeográfica e genética de populações. *Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais*, 2011.
- BARBOSA, A. R.; FIORINI, C. F.; SILVA-PEREIRA, V.; MELLO-SILVA, R.; BORBA, E. L. Geographical genetic structuring and phenotypic variation in the *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) ochlopecies complex. *American Journal of Botany*, v. 99, n. 9, p. 1477-1488, 2012.
- BATALHA FILHO, H. & MIYAKI, C. Filogeografia da Mata Atlântica. *Revista da Biologia*, 7, pp.31-34, 2011.
- BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015. (DOI: 10.1590/2175-7860201566411), 2015.
- BIABANI, A.; RAFII, M.Y.; SALEH, G.B.; LATIF, M.A. Inter-and intra-population genetic variations in *Jatropha curcas* populations revealed by inter-simple sequence repeat molecular markers. *Maydica* 58:111–118. 2013.
- BIEDINGER, N & FLEISCHMANN, K. Seychelles. *Inselbergs* (eds: S. Porembski and W. Barthlott), pp. 290–277. Springer-Verlag, Berlin.2000.
- BORBA, E.L.; FELIX, J.M.; SOLFERINI, V.N.; SEMIR, J. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *Am J Bot* 88: 419-428, 2001.
- BORBA, E.L.; FUNCH, R.R.; RIBEIRO, P.L.; SMIDT, E.C.; SILVA-PEREIRA, V. Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophronitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. *Pl Syst Evol* 267:129–146. 2007.

- BORNET, B.; ANTOINE, E.; BARDOUIL, M.; BAUT, C.M. ISSR as new markers for genetic characterization and evaluation of relationships among phytoplankton. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 4, p. 285-290, 2004.
- BRASIL. **Lei N° 9.985**, de 18 de julho de 2000. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19985.htm. Acessado em: 8 jul. 21.
- BURKE, A. How important is patch size relative to patch isolation in an arid inselberg landscape? **S. Afr. J. Bot.**, 127, pp. 1-11. 2019.
- BURKE, A. *Inselbergs* in a changing world – global trends. **Diversity and Distributions**, v. 9, p. 375–383, 2003.
- CABRAL, A.; LUEBERT, F.; MELLO-SILVA, R. Evidence for Middle Miocene origin and morphological evolutionary stasis in a Barbacenia Inselberg clade (Velloziaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 161, p. 107163, 2021.
- CAIAFA, A.N. & SILVA, A.F. Composição florística e espectro biológico de um Campo de Altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais – Brasil. **Rodriguésia** 56:163-173, 2005.
- CAIAFA, A.N. & SILVA, A.F. Structural analysis of the vegetation on a highland granitic rock outcrop in Southeast Brazil. **Revista Brasil. Bot.**, v.30, n.4, p.657-664, 2007.
- CAIN, M.L.; MILLIGAN, B.G.; STRAND, A.E. Long-distance dispersal in plant populations. **American Journal of Botany**, 87, 1217–1227. 2000.
- CHRIST, J.A.; SARNAGLIA-JUNIOR, V.B.; BARRETO, L.M.; GUIMARÃES, E.F.; GARBIN, M.L.; CARRIJO, T.T. The genus Piper (Piperaceae) in the Mata das Flores State Park, Espírito Santo, Brazil. **Rodriguésia** 67: 1031-1046. 2016
- COLOMBO, C.; SECOND, G.; VALLE, T.L.; CHARRIER, A. Genetic diversity characterization of cassava cultivars *Manihot esculenta* Crantz. RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**. 21: 105-113. 1998.
- CONCEIÇÃO, A.A. & ORR, B.J. Post-fire flowering and fruiting in the caulescent rosette *Vellozia sincorana*, an endemic plant to the Northeast of Brazil. **Acta Botanica Brasilica** 26: 94-100, 2012.
- CONCEIÇÃO, A.A. & PIRANI, J.R. Diversidade em quatro áreas de campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: espécies distintas, mas riqueza similares. **Rodriguésia** v.58, n.1, p.193-206, 2007.
- CONCEIÇÃO, A.A.; FUNCH, L.S.; PIRANI, J.R. Phenology, pollination and seed dispersal syndromes on sandstone outcrop vegetation in the "Chapada Diamantina", northeastern Brazil: population and community analyses. **Rev Bras Bot** 30: 475-485, 2007.
- CONCEIÇÃO, A.A.; GIULIETTI, A.M.; MEIRELLES, S.T. Ilhas de vegetação em afloramentos de quartzito-arenito no Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Acta Bot. Bras.** v.21(2): p.335-347, 2007a.
- CONCEIÇÃO, A.A.; PIRANI, J.R.; MEIRELLES, S.T. Floristic, structure and soil insular vegetation in four quartzite-sandstone outcrops of "Chapada Diamantina", Northeast Brazil. **Revista Brasil. Bot.**, v.30, p.641-656, 2007b.
- CORLETT, R. AND TOMLINSON, K. Climate Change and Edaphic Specialists: Irresistible Force Meets Immovable Object? **Trends in Ecology & Evolution**, 35(4), pp.367-376. 2020
- COSTA, M.C.D.; FARRANT, J.M.; OLIVEER, M.J.; LIGTERINK, W.; BUITINK, J.; HILHORST, H.M.W. Key genes involved in desiccation tolerance and dormancy across life forms. **Plant Sci.** doi:10.1016/j.plantsci.2016.001, 2016.
- COUTINHO, L.M. O conceito de bioma. **Acta bot. bras.** 20(1): 13-23. 2006
- COVRE, J.M.C.; COUTO, D.R.; DIAS, H.M.; ZORZANELLI, J.P.F. Vascular plants on inselberg landscapes in Espírito Santo state: bases for the creation of a protected area in southeastern Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 43(1), e54760. 2021.
- CPRM – Serviço Geológico do Brasil. Mapa de recursos minerais do estado do Espírito Santo. 2013. Acessado em 25 jan. 2019. <http://www.cprm.gov.br/publique/>
- CRUZ, D.T.; SELBACH-SCHNADELBACH A.; LAMBERT, S.M.; RIBEIRO, P.L.; BORBA, E.L. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. **Plant Syst and Evol** 294: 87-98, 2011.
- DE PAULA, L.F.A.; FORZZA, R.C; NERI, A.V.; BUENO, M.L.; POREMBSKI, S. Sugar Loaf Land in south-eastern Brazil: a centre of diversity for mat-forming bromeliads on inselbergs. **Botanical Journal of the Linnean Society** 181: 459-476, 2016.
- DE PAULA, L.F.A.; KOLB, R.; POREMBSKI, S.; SILVEIRA, F.; ROSSATTO, D. Rocks and leaves: Can anatomical leaf traits reflect environmental heterogeneity in inselberg vegetation? **Flora**, 250, pp.91-98. 2019.

- DE PAULA, L.F.A.; MOTA, N.F.; VIANA, P.L.; STEHMANN, J.R. Floristic and ecological characterization of habitat types on an inselberg in Minas Gerais, southeastern Brazil. **Acta Bot. Brasilica** 31, 199–211, 2017.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.S. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull** 19: 11-15, 1987.
- EARL, D.A. & VONHOLDT, B.M. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. **Conservation genetics resources** 4: 359-361, 2012.
- ESSER, L.; NEVES, D. AND JARENKOW, J. Habitat-specific impacts of climate change in the Mata Atlântica biodiversity hotspot. **Diversity and Distributions**, 25(12), pp.1846-1856. 2019.
- ESTOPA, R.A.; SOUZA, A.M.de; MOURA, M.C.de O.; BOTREL, M.C.G; MENDONÇA, E.G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropapus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, n. 70, p.97-106, 2006.
- EVANNO, G., REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, 14(8), pp.2611-2620, 2005.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131: 479-491, 1992.
- EXCOFFIER, L. & LISCHER, HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources** 10: 564-567, 2010.
- FARIA, G.C.; SILVA, F.M. Participação pública no processo de avaliação de impacto ambiental no estado do Espírito Santo. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, 43, 139–151, 2017.
- FLANTUA, S.G.A., O'DEA, A., ONSTEIN, R.E., GIRALDO, C., HOOGHIEMSTRA, H. The flickering connectivity system of the north Andean páramos. **J. Biogeogr.** 46 (8), 1808–1825. 2019.
- Flora do Brasil 2020**. Disponível em: floradobrasil.jbrj.gov.br. Acesso em: 8 jul. 2021.
- FRANCESCHINELLI, E.V.; JACOBI, C.M.; DRUMMOND, M.G.; RESENDE, M.F.S. The genetic diversity of two Brazilian *Vellozia* (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. **Ann Bot** 97: 585–592, 2006.
- FRANKHAM, R.; BRISCOE, D.A.; BALLOU, J.D. Introduction to conservation genetics. **Cambridge University Press**, New York, USA, p.1011-4211, 2002.
- FU, D.; ZHUANG, J.; ZHANG, R.; SUN, G. Optimization of ISSR-PCR reaction system and genetic diversity analysis of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple. **Acta Phytophylacica Sinica** 40, 231236. 2013.
- GE, X. J.; SUN, M. Population genetic structure of *Ceriops tagal* (Rhizophoraceae) in Thailand and China. **Wetlands Ecology and Management**. 9: 203-209. 2001.
- GE, X.; ZHANG, L.; YUAN, Y.; HAO, G.; CHIANG, T. Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon stylophorus* (Gentianaceae) detected by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR). **Biodiversity and Conservation**, 14(4), pp.849-861, 2005.
- GIULIETTI, A.M.; MENEZES, N.L.; PIRANI, J.R.; MEGURO, M.; WANDERLEY, M.G.L. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista das espécies. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** 9: 1-151, 1987.
- GIULIETTI, A.M.; PIRANI, J.R. & HARLEY, R.M. Espinhaço Range Region, Eastern Brazil. In: Davis, S. D.; Heywood, V. H.; Herrera-Macbride, O.; Villa-Lobos, J. & Hamilton, A. C. Centres of plant diversity. **A guide and strategy for their conservation. Vol. 3.** The Americas. IUCN Publication Unity, Cambridge. Pp. 397-404, 1997.
- GOMES, P.C.L.; SMIDT, E.C.; FRAGA, C.N.; SILVA-PEREIRA, V. High genetic variability is preserved in relict populations of *Cattleya lobata* (Orchidaceae) in the Atlantic Rainforests inselbergs. **Revista Brasileira de Botânica**, 41:185-195. 2018.
- GONZÁLEZ, A.; COULSON, M.; BRETTELL, R. Development of DNA markers (ISSRs) in mango. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 575, p.139-143, 2002.
- GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C.M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, **Dordrecht**, n. 122, p.81-89, 2001.
- GREILHUBER, J.; BORSCH, T.; MÜLLER, K.; WORBERG, A.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. **Plant Biol** 8:770–777, 2008.
- GUPTA, M.; CHYI, Y.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, 89-89(7-8), pp.998-1006, 1994.
- HAMRICK, J.L.; GOLDT, M.J.W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philos T R Soc B** 351: 1291–1298, 1996.

- HILSDORF, A.W.S. **Ferramentas Moleculares Aplicadas à Pesca e Aquicultura**, 2011. Disponível em: ftp://ftp.sp.gov.br/ftpcesca/10recip/palestras/XReCIP_Hilsdorf.pdf. Acesso em: 25 jan. 2019.
- HONNEF, D., ALBA, E., MARCHESAN, J., FAVARIN, J., SCHUH, M., BADIN, T., OLIVEIRA, H., WOFFER, M. and PEREIRA, R., 2019. Use of High Spatial Resolution Images for the Monitoring of Forest Cover. **Anuário do Instituto de Geociências - UFRJ**, 42(4), pp.148-154.
- IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Panorama cidades. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/es/panorama>. Acesso em 19 dez. 2020.
- IJSN** – Instituto Jones dos Santos Neves. Panorama Econômico do Espírito Santo IV trimestre de 2019. Disponível em: <http://www.ijsn.es.gov.br/component/attachments/download/6877>. Acesso em 08 jul. 2021.
- JACOBI, C. M., & CARMO, F. F. Diversidade dos campos rupestres ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero, MG. **Megadiversidade**, 4(1-2), 25-33, 2008.
- JESUS, F.F.; SOLFERINI, V.N.; SEMIR, J.; PRADO, P.I. Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. **PI Syst Evol** 226:59–68. 2001.
- JIN, Y.; HE, T.; LU, B. Genetic spatial clustering: significant implications for conservation of wild soybean *Glycine soja* (Fabaceae). **Genetica**. 128: 41- 49. 2006
- JÜRGENS, N. & BURKE, A. The arid scenario: inselbergs in the Namib desert are rich oases in a poor matrix (Namibia & South Africa). **Inselbergs** (eds: S. Porembski and W. Barthlott), pp. 237–258. Springer-Verlag, Berlin.2000.
- KUMAR, D.; VIBERG, J.; NILSSON, A.; CHABES, A. Highly mutagenic and severely imbalanced dNTP pools can escape detection by the S-phase checkpoint. **Nucleic Acids Research**, 38(12), pp.3975-3983, 2010a.
- KUMAR, S; JENA, S.N; NAIR, N.K. ISSR polymorphism in Indian wild orange (*Citrus indica* Tanaka, Rutaceae) and related wild species in North-east India. **Scientia Horticulturae**, v.123, n.3, p.350-359, 2010b.
- LI, M.; ZHAO, Z.; MIAO, X. Genetic diversity and relationships of apricot cultivars in North China revealed by ISSR and SRAP markers. **Scientia Horticulturae**, v. 173, p. 20-28, 2014.
- LOUSADA, J.M.; LOVATO, M.B.; BORBA, E.L. Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. **Genetica** 139(4):431-40. doi: 10.1007/s10709-011-9561-5, 2011.
- LOUSADA, J.M.; LOVATO, M.B.; BORBA, E.L. High genetic and low genetic variability in disjunct populations of the endemic *Vellozia compacta* (Velloziaceae) occurring in two edaphic environments of Brazilian campos rupestres. **Rev Bras Bot**. doi: 10.1007/s40415-013-0001-x, 2013.
- LUZ, P.M. **Biologia reprodutiva e genética de populações de *Barbacenia paranaensis* L.B.SM. (Velloziaceae), espécie endêmica e ameaçada de extinção no Paraná**. 2014. 77p. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- MACHADO, C.G. Beija-flores (Aves: Trochilidae) e seus recursos florais em uma área de caatinga da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Zoo** 26 (2): 255-265, 2009.
- MACHADO, C.G.; COELHO, A.G.; SANTANA, C.S.; RODRIGUES, M. Beija-flores e seus recursos florais em uma área de campo rupestre da Chapada Diamantina, Bahia. **Rev Bras de Ornitologia**15 (2): 267-279, 2007.
- MARTINELLI, G. Mountain biodiversity in Brazil. **Revista Brasil. Bot.**, v.30, n.4, p.587-597, 2007.
- MATIOLI, S.R. & FERNANDES, F.M.C. **Biologia Molecular e Evolução**. Editora Holos, Ribeirão Preto, SP, 250 p., 2012.
- MATIOLI, S.R. & FERNANDES, F.M.C. **Biologia Molecular e Evolução**. Editora Holos, Ribeirão Preto, SP, 250 p., 2012.
- MATTHEWS, D. *et al.* 5'-anchored simple-sequence repeat primers are useful for analysing potato somatic hybrids. **Plant Cell Reports**, v. 19, p.210-212, 1999.
- MATTIONI, C.; CASASOLI, M; GONZALEZ, M.; IPINZA, R.; VILLANI, F. Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean Nothofagus species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 6, p. 1064-1070, 2002.
- MEDINA, B.M.O.; RIBEIRO, K.T. & SCARANO, F.R. Plant–Plant and Plant–Topography Interactions on a Rock Outcrop at High Altitude in Southeastern Brazil. **Biotropica**, v.38, n.1, p.27–34, 2006.
- MELLO-SILVA R. Aspectos taxonômicos, biogeográficos, morfológicos e biológicos das Velloziaceae de Grão-Mogol, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da USP** 14: 49–79, 1995.
- MELLO-SILVA R. Morphological analysis, phylogenies and classification in Velloziaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society** 148: 157–173, 2005.
- MELLO-SILVA R. Velloziaceae raras do Brasil. In: Giulietti AM, Rapini A, Andrade MJG, Queiroz LP, Silva JMC, eds. Plantas Raras do Brasil. Belo Horizonte: **International Conservation**, 392–398, 2009.

MELLO-SILVA, R. **Velloziaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15099>>.

MELLO-SILVA, R.; SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F.; MOTTA, L.B.; CATTAL, M.B.; SASAKI, D.; LOVO, J.; PITA, P.B.; ROCINI, C.; RODRIGUES, C.D.N.; ZARREI, M.; CHASE, M.W. Five vicarious genera from Gondwana: the Velloziaceae as shown by molecules and morphology, **Annals of Botany**, Volume 108, Issue 1, July 2011, Pages 87–102.

MENDES, S.L. & PADOVAN, M.P.A Estação Biológica de Santa Lúcia, Santa Teresa, Espírito Santo. **Bol. Mus. Biol. Mello Leitão** (N. Ser.). 11/12: 7-34.

MILLAR, M.A.; COATES, D.J.; BYRNE, M. Genetic connectivity and diversity in inselberg populations of *Acacia woodmaniorum*, a rare endemic of the Yilgarn Craton banded iron formations. **Heredity** 111:437–444. 2014.

MITTERMEIER R.A., TURNER W.R., LARSEN F.W., BROOKS T.M., GASCON C. 2011 Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. In: Zachos F., Habel J. (eds) **Biodiversity Hotspots**. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20992-5_1

MOBOT.org. *Angiosperm Phylogeny Website*. [online] Available at: <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html>. Acessado em: 8 July 2021.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.; MITTERMEIER, C.; DA FONSECA, G.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403(6772), pp.853-858, 2000.

NAZARENO, A.G.; MENINI NETO, L.; BUZATTI, R.S.; VAN DEN BERG, C.; FORZZA, R.C. Four raised to one equals one: A genetic approach to the *Pseudolaelia vellozicola* complex does not follow a math rule. **Ecology and Evolution** 10: 4562–4569. 2020.

NAZNEEN, H.F.; ARUNKUMAR NAIK, B. A.; RAMESH, P.; SEKHAR, A.C.; SHANKAR, P.C. Genetic diversity using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeats (ISSR) markers in *Tinospora cordifolia* from the Rayalseema region in Andhra Pradesh. **African Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 10, p. 231-241, 2019.

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

NEVES, D.M.; DEXTER, K.G.; PENNINGTON, R.T.; VALENTE, A.S.M.; BUENO, M.L.; EISENLOHR, P.V.; FONTES, M.A.L.; MIRANDA, P.L.S.; MOREIRA, S.N.; REZENDE, V.L.; SAITER, F.Z.; OLIVEIRA-FILHO, A.T. Dissecting a biodiversity hotspot: The importance of environmentally marginal habitats in the Atlantic Forest Domain of South America. **Diversity and Distributions**, 23(8), 1 – 12. 2017

NEVILL, P.G.; ROBINSON, T.P.; VIRGILIO, G.D.; WARDELL-JOHNSON, G. Beyond isolation by distance: What best explains functional connectivity among populations of three sympatric plant species in an ancient terrestrial island system? **Diversity and Distributions**, 25, 1551–1563. 2019.

NOVELLI, F.Z. A Reserva Biológica de Duas Bocas e seus vínculos com a história da conservação no Espírito Santo. **Natureza on Line** 8(2):57-59. 2010.

NYBOM H.; BARTISH, I.V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspect Plant Ecol** 3: 93-144, 2000.

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

OHLEMÜLLER, R. Biodiversity patterns of plant communities in shallow depressions on Western Australian granite outcrops (*inselbergs*). **MSc Thesis, University of Bonn, Bonn**, 1997.

OKUN, D.O.; KENYA, E.U.; OBALLA, P.O.; ODEE, D.W.; MULUVI, G.M. Analysis of genetic diversity in *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) seed sources using inter simple sequence repeats (ISSR) molecular markers. **African Journal of Biotechnology**. 7: 2119-2123. 2008.

ORNDUFF, R. Islands on Islands: Plant Life on the Granite Outcrops of Western Australia. Harold L Lyon Arboretum Lecture 15. University of Hawaii Press, Honolulu, 1987.

PINTO-JUNIOR, H.; VILLA, P.; PEREIRA, M.; MENEZES, L. The pattern of high plant diversity of Neotropical inselbergs: highlighting endemic, threatened and unique species. **Acta Botanica Brasilica**. doi.org/10.1590/0102-33062020abb0129. 2021.

POREMBSKI, S. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 4, p. 579-586, 2007.

POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Granitic and gneissic outcrops (*inselbergs*) as centers of diversity for desiccationtolerant vascular plants. **Plant Ecology**, v. 151, p. 19–28, 2000.

POREMBSKI, S.; BECKER, U. & SEINE, R. Islands on islands: habitats on *inselbergs*. In: Porembski S, Barthlott W, eds. **Inselbergs – biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions**, vol. 146. Berlin: Ecological Studies, Springer-Verlag, p. 49–67, 2000.

- POREMBSKI, S.; MARTINELLI, G.; OHLEMÜLLER, R.; BARTHLOTT, W. Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on *inselbergs* in the Brazilian Atlantic rainforest. **Divers Distrib**, v. 4, p. 107, 1998.
- POREMBSKI, S.; SILVEIRA, F.; FIEDLER, P.; WATVE, A.; RABARIMANARIVO, M.; KOUAME, F.; HOPPER, S. Worldwide destruction of inselbergs and related rock outcrops threatens a unique ecosystem. **Biodiversity and Conservation**, 25(13), pp.2827-2830, 2016.
- PRIMACK, R.B. & RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Editora Planta, Londrina, 327p., 2001.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155: 945-959, 2000.
- RAGHOENANDAN, U.P.D. The Guianas (Guyana, Suriname, French Guiana). **Inselbergs** (eds: S. Porembski and W. Barthlott), pp. 315–339. Springer-Verlag, Berlin.2000.
- RAHBEK, C., BORREGAARD, M.K., COLWELL, R.K., DALSGAARD, B., HOLT, B.G., MORUETA-HOLME, N., NOGUES-BRAVO, D., WHITTAKER, R.J., FJELDSÅ, J. Humboldt's enigma: What causes global patterns of mountain biodiversity? **Science** 365, 1108–1113. 2019.
- REFLORA**. Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 19 dez. 2020.
- RIBEIRO, K.T.; MEDINA, B.M.O.; SCARANO, F.R. Species composition and biogeographic relations of the outcrop flora on the high plateau of Itatiaia, SE-Brazil. **Revista Brasil. Bot.**, v.30, p.623-639, 2007.
- RIBEIRO, P.; BORBA, E.; DE CAMARGO SMIDT, E.; LAMBERT, S.; SCHNADELBACH, A.; VAN DEN BERG, C. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. **Plant Systematics and Evolution**, 270(1-2), pp.109-137, 2007.
- RIBEIRO, P.C.C.; PINHEIRO, L.C.; DOMINGUES, R.; FORZZA, R.C.; MACHADO, M.A.; VICCINI, L.F. Genetic diversity of *Vriesea cacuminis* (Bromeliaceae): An endangered and endemic Brazilian species. **Genetics and Molecular Research** 12: 1934–1943. 2013
- ROCHA, L.G.D.S.; PINTO, J.R.R. Diversity and structural changes in *Cerrado Rupestre* under effects of disturbances. **Braz. J. Bot** 44, 213–225. 2021.
- ROSENBERG, N.A. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Resources** 4: 137-138, 2004.
- SAFFORD, H.D. & MARTINELLI, G. Southeast Brazil. p.339-389. In: POREMBSKI, S. & BARTHLOTT, W. (eds.) **Inselbergs**. Heidelberg Ecological Studies, Springer-Verlag, v.146, 2000.
- SAJO, M.G.; MELLO-SILVA, R.; RUDALL, P. Homologies of Floral Structures in Velloziaceae with Particular Reference to the Corona. **International Journal of Plant Sciences**, 171(6), pp.595-606. 2010
- SAZIMA, M. Biologia floral de espécies de Velloziaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais. **Tese, Universidade de São Paulo**, 1978.
- SCARANO, F.R. Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic Rainforest. **Annals of Botany**, v.90, p.517-524, 2002.
- SCHAEFER, C.E.G.R., 2012. Bases físicas da paisagem brasileira: estrutura geológica, relevo e solos, in: Araújo, P. A., Alves, B.J.R. (Ed.), **Tópicos Em Ciência Do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, pp. 1–69.
- SEINE, R. & BECKER, U. East and Southeast Africa. **Inselbergs** (eds: S. Porembski and W. Barthlott), pp. 213–236. Springer-Verlag, Berlin. 2000.
- SILVA, J. Panorama sobre a vegetação em afloramentos rochosos do Brasil. **Oecologia Australis**, 20(04), pp.451-463, 2016.
- SMITH, L.B. & AYENSU, E.S. **A Revision of American Velloziaceae**. Smithsonian Institution Press. City of Washington, 1976.
- SMITH, L.B. **A synopsis of the American Velloziaceae**. Contr. U. S. Nat. Herb. 35: 251-292, 1962.
- SMOUSE, P. E.; BANKS, S. C.; PEAKALL, R. Converting quadratic entropy to diversity: Both animals and alleles are diverse, but some are more diverse than others. **Plos One** 12, e0185499, 2017.
- SOS Mata Atlântica** – Fundação SOS Pro-Mata Atlântica. 2019. Qual é a área de cobertura da Mata Atlântica? Disponível em: <https://www.sosma.org.br/artigos/qual-e-area-de-cobertura-da-mata-atlantica/>. Acesso em 08 jul. 2021.
- SOUZA-SOBREIRA, F.B.; SOUZA, G.B.; ROSADO, C.C.G.; MIRANDA, F.D.; SOARES, T.C.B.; GONTIJO, A.B.P.L. Genetic diversity in three natural populations of *Pitcairnia flammula* (L.) John (Bromeliaceae) estimated by ISSR markers. **Genet. Mol. Res.** 14: 15892-15901. 2015.
- SpeciesLink Network**. Disponível em: <http://www.splink.org.br/>. Acesso em: 8 jul. 2021.

- TABARELLI, M.; PINTO, L.P.; SILVA, J.M. C.; HIROTA, M.M.; BEDÊ, L.C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**. v. 1, n. 1, p. 132-138. 2005.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.
- TONHASCA, J.R.A. **Ecologia e história natural da Mata Atlântica**. Interciência, Rio de Janeiro, 197 pp., 2005.
- TURCHETTO, C.; TURCHETTO-ZOLET, A.C.; PASSAIA, G.; ZANELLA, C.M. Marcadores genéticos baseados em DNA. **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. (eds.: Turchetto-Zolet, A.C.; Turchetto, C.; ZANELLA, C.M. and Passaia, G.) p.12-20. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017.
- VASCONCELOS, M.F. O que são campos rupestres e campos de altitude nos topos de montanha do Leste do Brasil? **Revista Brasil. Bot.**, v.34, n.2, p.241-246, 2011.
- VERÇOZA, F.C. Polinização de *Vellozia candida* Mikan (Velloziaceae) nos Afloramentos Rochosos do Costão de Itacoatiara, Niterói, RJ: Um Caso de Melitofilia em Inselbergue do Brasil. **EntomoBrasilis**, v. 5, n. 1, p. 29-32, 2012.
- VERONEZ, F.; MONTAÑO, M. Análise da qualidade dos estudos de impacto ambiental no estado do Espírito Santo (2007-2013). **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, 43, 6–21, 2017.
- VIEIRA BC, SALGADO AAR, SANTOS LJC. Landscapes and Landforms of Brazil - World Geomorphological Landscapes. Dordrecht, **Springer**, 2015.
- WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: **Plant Molecular Systematics II** eds. D. E. Soltis, P. S. Soltis and J. J. Doyle. Kluwer, p.43-86, 1998.
- WORLD RESOURCES INSTITUTE**. Mining and critical ecosystems: mapping the risks. World Resources Institute, Washington, DC. 2003.
- XIA, T.; CHEN, S.; CHEN, S.; ZHANG, D.; GAO, Q.; GE, X. 2007. ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. 35: 209-214.
- YATES, C.J.; HOPPER, S.D.; BROWN, A.; VAN LEEUWEN, S. Impact of two wildfires on endemic granite outcrop vegetation in Western Australia. **J Veg Sci** 14:185–194, 2003.
- YATES, C.J.; ROBINSON, T.; WARDELL-JOHNSON, G.W.; KEPPEL, G.; HOPPER, S.D.; SCHUT, A.G.T.; BYRNE, M. High species diversity and turnover in granite inselberg floras highlight the need for a conservation strategy protecting many outcrops. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 13, p. 7660-7675, 2019.
- YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T.B.; YE, Z.H.; MAO, J.X. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. **Canada, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta**. 1997.
- ZAPPI, D.C.; LUCAS, E.; STANNARD, B.L.; NICLUGHADHA, E.; PIRANI, J.R.; QUEIROZ, L.P.; ATKINS, S.; HIND, D. J.N.; GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M. & CARVALHO, A.M. Lista das plantas vasculares de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** 21(2): 345-398, 2003.
- ZHAO, F.; NIE, J.; CHEN, M.; WU, G. Assessment of genetic characteristics of *Aconitum* germplasms in Xinjiang Province (China) by RAPD and ISSR markers. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 309-314, 2015.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification, **Genomics**, v. 20, p.176-193, 1994.