

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL

BIPOLARIDADE EM *POHLIA* HEDW. (MNIACEAE-BRYOPHYTA): UM
ESTUDO FILOGENÉTICO

BÁRBARA GUEDES COSTA SILVA

ORIENTADORA:

Prof. Dr^a. Micheline Carvalho Silva

Brasília- DF, Dezembro de 2016.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL

BIPOLARIDADE EM *POHLIA* HEDW. (MNIACEAE-BRYOPHYTA): UM
ESTUDO FILOGENÉTICO

Estudante: Bárbara Guedes Costa Silva

Orientadora: Micheline Carvalho Silva

Co-Orientador: Anderson Marcos de Souza

Trabalho Final apresentado ao
Departamento de Engenharia Florestal da
Universidade de Brasília, como parte das
exigências para obtenção do título de
Engenheiro Florestal.

Brasília- DF, Dezembro de 2016.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL

**BIPOLARIDADE EM *POHLIA* HEDW. (MNIACEAE-
BRYOPHYTA): UM ESTUDO FILOGENÉTICO**

Estudante: Bárbara Guedes Costa Silva

Matrícula: 11/0072251

Menção: SS

Banca Examinadora:

Micheline Carvalho Silva

Prof. Dr.^a Micheline Carvalho Silva

Anderson Marcos de Souza

Prof. Dr. Anderson Marcos de Souza

Diego Knop Henriques

Dr. Diego Knop Henriques

Brasília – DF, Dezembro de 2016.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS.....	9
2.1	Objetivos Gerais	9
2.2	Objetivos Específicos.....	9
3	JUSTIFICATIVA	9
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
5.1	Obtenção de amostras	16
5.2	Estudos filogenéticos.....	17
5.2.1	Extração de DNA e amplificação.....	17
5.2.2	Sequenciamento e análise dos dados.....	18
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
7	CONCLUSÃO.....	28
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

AGRADECIMENTOS

A minha mãe da graduação e orientadora, Dr^a. Micheline Carvalho Silva, por ter me proporcionado realizar este trabalho sempre caminhando ao meu lado, me dando a oportunidade de aprender cada vez mais.

Ao Dr. Paulo Eduardo Câmara, pelo apoio e carinho em todas as horas e todo conhecimento fornecido.

Aos amigos do laboratório de criptógamas, Ana Gabriela, Abel, Allan, Amanda Marinho, Amanda Leal, Carla, Daiane, Diego, Marcos, Tamara, Osvanda e Valéria pela ajuda em todos os momentos de convivência, sendo super solícitos em todos os momentos que precisei.

Aos herbários pelos empréstimos realizados.

Ao Proantar (Programa Antártico Brasileiro), Marinha do Brasil, Força Aérea Brasileira e aos demais colaboradores do projeto.

Ao Rodrigo Canhedo Silva, pois se não fosse ele eu não estaria onde estou.

A minha irmã Júlia Guedes, que sempre me ajudou em todos os momentos e foi minha companheira de todas as horas.

Aos meus amigos de graduação, os meus sinceros agradecimentos.

As minhas queridas amigas Ana Clara, Ingrid e Fernanda, que sempre torceram por mim.

A minha querida mãe Margareth, que sempre acreditou em mim, me incentivou para alcançar todos os meus sonhos.

Ao meu Pai José Antônio que sempre esteve ao meu lado me apoiando e me dando força.

A Deus, que me concedeu esta grande oportunidade.

Obrigada a todos pelo carinho, amor e compreensão, levarei vocês sempre comigo.

RESUMO

As briófitas são o segundo maior grupo de plantas terrestres e possuem cerca de 18.000 espécies. O gênero *Pohlia* é constituído por cerca de 150 espécies distribuídas em todos os continentes com a maior parte das espécies ocorrendo em regiões temperadas. Cinco espécies de *Pohlia* ocorrem na Antártica, sendo que quatro delas são consideradas bipolares apenas de acordo com dados morfológicos. O objetivo do trabalho foi testar a bipolaridade da espécie antártica, *Pohlia cruda* (Hedw.) Lindb., através de dados moleculares e morfológicos. As amostras foram obtidas através de empréstimos solicitados a nove herbários nacionais e internacionais e também a partir de coletas no continente Antártico. A extração do DNA foi realizada utilizando o protocolo mini-CTAB e a amplificação foi realizada segundo a técnica Reação em Cadeia da Polimerase. Foram amplificadas regiões do cloroplasto e do núcleo com os marcadores [íntron *trnL* e o espaçador intergênico *trnL-trnF*] e o marcador *ITS* respectivamente. Para reconstrução filogenética foram feitas árvores de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Os resultados mostram que a família Mniaceae é um grupo monofilético, no entanto o gênero *Pohlia* é parafilético. A bipolaridade de *Pohlia cruda* foi comprovada através dos dados moleculares e morfológicos e dados preliminares de outras espécies de *Pohlia* que ocorrem na Antártica também são apresentados.

Palavras-chave: Antártica, *Pohlia*, filogenia, morfologia.

ABSTRACT

The bryophytes are the second biggest group of terrestrial plants and has about 18,000 species. The genus *Pohlia* has by around 150 species spread in all continents with the majority of species located in the temperate regions. Five species of *Pohlia* occur in the Antarctic, in which four of them are considered bipolar according to morphologic data. The objective of this paper was to test the bipolarity of the Antarctic species, *Pohlia cruda* (Hedw.) Lindb. by molecular and morphologic data. The samples were obtained by loans of nine national and international herbarios and also by collections of Antarctic samples. The DNA extraction followed the mini-CTAB protocol and the amplification was made with the Polymerase Chain Reaction. Chloroplast and nucleus regions were amplified with the intron trnL markers and with the intergenic spacer trnL-trnF and ITS marker respectively. [In the phylogenetic reconstruction trees with maximum likelihood and Bayesian Interference]. The results show that the Mniaceae family is a monophyletic group, however the genus *Pohlia* is paraphyletic. *Pohlia cruda* bipolarity was proved with the molecular and morphologic data and preliminary data from other *Pohlia* species that occur in Antarctic are also shown.

Key Work: Antarctic, *Pohlia*, phylogeny, morphology.

1 INTRODUÇÃO

Briófitas são organismos ecologicamente fundamentais, pois são consideradas plantas pioneiras, sendo as primeiras a colonizar rochas e diversas áreas degradadas. Esse grupo de plantas transformam locais desfavoráveis em locais propícios ao estabelecimento de outras espécies de plantas (Hespanhol *et al.* 2008), além de microambientes para a ocorrência de animais como rotíferos, nematódeos e tardígrados (Gradstein *et al.* 2001). Espécies de briófitas também têm sido utilizadas para estudos de mudanças climáticas globais (Tuba *et al.* 2011).

As briófitas ocorrem em diversos ambientes, entre eles ambientes extremos como desertos, regiões do Ártico e na Antártica. As condições climáticas desfavoráveis desses ambiente não impediram o crescimento e estabelecimento dessas plantas, ao contrário, para alguns ambientes como na Antártica, as briófitas são as plantas dominantes.

Para explicar a distribuição das espécies bipolares, aquelas que ocorrem em regiões do Ártico e Antártica concomitantemente, a teoria mais aceita é de origem Holoártica, onde as espécies teriam chegado as regiões austrais por meio de dispersão à longa distância através das cadeias de montanhas tropicais (Dodge 1973, Lamb 1970, Lindsay 1977, Ochrya *et al.* 2008). Esta dispersão pode ter ocorrido por três rotas: 1) “American Pathway” (via americana), utilizando como rota os neotrópicos, passando pela Patagônia e pela Antártica marítima; 2) “African Pathway” (via africana) através das montanhas do Leste e do Sul da África para as ilhas subantárticas na região de Kerguelen; 3) O “Indomalayan-Malesian Pathway” (via Indonésia-Malásia) do sudeste da Ásia (Malásia) para o sudeste australiano, Nova Zelândia e ilhas associadas (Ochrya *et al.* 2008). As análises filogenéticas podem ser o caminho para a explicação dessas teorias e a descoberta sobre a colonização das briófitas na Antártica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Este estudo visa testar a bipolaridade do gênero *Pohlia* Hedw., através de dados moleculares e morfológicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Testar o monofiletismo do gênero *Pohlia*;
- Esclarecer se a morfologia de *Pohlia cruda* reflete os resultados dos dados moleculares.

3 JUSTIFICATIVA

Embora a brioflora antártica seja bem conhecida (Putzke & Pereira 2001, Ochyra *et al.* 2008), existem poucos estudos sobre a diversidade genética e padrões de evolução e distribuição das espécies, e qual a relação das espécies antárticas com seus pares da região Ártica e regiões intermediárias (Hedenäs 2012, Kato *et al.* 2013).

As regiões polares são ambientes extremos e isolados, portanto, locais sujeitos a endemismo, pois as espécies que lá se estabelecem podem sofrer mutações e pode não ocorrer o fluxo gênico, tornando-se diferente das plantas-mãe. O endemismo, assim como o número e espécies em uma localidade têm sido frequentemente utilizados como critério para conservação de áreas para preservação de espécies (Carvalho 2009). Os resultados obtidos poderão ser utilizados para gerar planos de conservação para regiões na Antártica e no Ártico ou para algumas espécies.

Os estudos filogenéticos podem explicar a bipolaridade de espécies ou determinar o endemismo, o monofiletismo e os padrões de distribuição da espécie na Antártica e no Ártico.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As briófitas são o segundo maior grupo de plantas terrestres, atrás apenas das angiospermas, (Buck & Goffinet, 2000). Possuem cerca de 18.000 espécies distribuídas em mais de 1.200 gêneros e estão representadas por Musgos (filo Bryophyta com 13.000 - 12.800 espécies), Hepáticas (filo Marchantiophyta 5.000 espécies) e Antóceros (filo Anthocerotophyta com 100 - 150 espécies) (Gradstein *et al.*, 2001; Goffinet *et al.*, 2009).

Embora sejam plantas relativamente de pequeno tamanho e delicadas, as briófitas estão amplamente distribuídas pelo mundo e habitam preferencialmente os ambientes úmidos e sombreados. São encontradas desde o Ártico a Antártica, em florestas tropicais, desertos e ambientes submersos, mas nunca em ambiente marinho (Delgadillo & Cárdenas, 1990).

O grupo (Briófitas) possui propriedades antimicrobianas (Singh *et al.*, 2007), e podem ser indicadores ecológicos ou de poluição, pois muitas espécies são muito sensíveis a pequenas mudanças as condições ambientais (Santos & Lisboa, 2003). Outras espécies podem ser utilizadas como indicadores da integridade de florestas (Frego, 2007), para recuperação de áreas degradadas (Bardat & Aubert, 2007), e para demonstrar o aumento de nitrogênio liberado na atmosfera durante as últimas décadas (Wilson *et al.*, 2009).

Economicamente, o grupo é utilizado como substrato para orquídeas e algumas plantas ornamentais e é relatado o seu potencial medicinal como anticancerígeno e anti-inflamatório, como também para a produção de antibióticos e antivirais e cicatrização de queimaduras e tratamento de hematomas (Fernández & Serrano, 2009).

Briófitas organizam-se em três divisões, Anthocerotophyta, Marchantiophyta e Bryophyta. Os antóceros são plantas da divisão Anthocerotophyta, e possuem de 100-150 espécies. Caracterizam-se por apresentar plantas talosas, onde as células do talo possuem um único cloroplasto contendo pirenoide, com gotículas de óleo presentes, anterídio de origem endógena. O arquegônio é único, embutido na superfície do talo dorsal e o esporófito cresce a partir da base por atividade meristemática indeterminada (Frey & Engler, 2009).

Segundo Frey & Engler (2009), a divisão Marchantiophyta, também conhecida como hepáticas, são supostamente monofiléticas, provavelmente representam a linhagem divergente mais antiga das embriófitas existentes e o mais antigo registro fóssil de todos os grupos de briófitas. As hepáticas são um grupo altamente diversificado, com substancial

heterogeneidade morfológica, composta por cerca de 5.250 espécies em 8 classes, 32 ordens e 89 famílias. São plantas talosas com oleocorpos presente, gametângio sem células apicais, cápsula sem columela, elatério unicelular e estômatos ausente.

A divisão Bryophyta é caracterizada pelos musgos, um grupo diverso e bem-sucedido de plantas terrestres que é amplamente distribuído em todos os ecossistemas terrestres, colonizando uma gama diversificada de territórios. Bryophyta é composta por aproximadamente 12.500 espécies distribuídas em três subdivisões, sete classes, 35 ordens, 120 famílias e 860 gêneros. São plantas folhosas com gametângio ontogênico com células apicais, cápsula com peristômio e columela, elatério ausente e o esporófito com estômato. (Frey & Engler, 2009).

Os musgos são plantas criptogâmicas avasculares, isto é, possuem órgãos reprodutores não evidentes e não apresentam sistema condutor organizado em floema e xilema. (Lisboa, 1993). Sua propagação e disseminação podem ser feita através de esporos, por partículas unicelulares de material vivo, pela fragmentação de plantas em partes menores capazes de produzir novas plantas, e/ou por propágulos (ou gemas) cujo tamanho pode variar de poucas a muitas células (Lisboa, 1993).

Bryophyta pode ser dividida em dois grupos de acordo com o hábito de crescimento e origem do esporófito. Os musgos acrocárpicos que geralmente têm gametófitos eretos, simples ou pouco ramificados e crescem em tufos produzindo esporófitos no ápice do caulídeo ou ramo principal; e os musgos pleurocárpicos, que possuem gametófitos prostrados ou pendentes, livremente ramificados e crescem emaranhados e produzem esporófitos lateralmente ao ramo principal (Lisboa, 1993).

Entre as famílias de musgos acrocárpicos está a família Mniaceae. De acordo com The Plant List (2013), a família é composta por treze gêneros e aproximadamente 390 nomes estão classificados dentro da família, porém, apenas 222 nomes de espécies são aceitos. Frey & Engler (2009) citam que a família possui quinze gêneros e cerca de 370 espécies.

De acordo com Frey & Engler (2009), Mniaceae é dividida em duas subfamílias, Mielchhoferioideae e Mnioideae. A família é caracterizada por plantas geralmente terrestres, usualmente de tamanho pequeno ou médio, em terrenos relvados, com caules simples ou ramificados, podendo ser tomentosos ou não, com costa presente, filídeos orbiculares até lanceoladas, base decorrente ou não, margens geralmente limbadadas, inteiras até serradas. As

células da lâmina são subquadradas até hexagonais ou linear-alongadas, com paredes finas, lisas ou raramente mamilosas, porosas ou não.

Mniaceae possui distribuição cosmopolita, ocorrendo desde o Ártico até a Antártica, contendo também representantes nas florestas tropicais (Frey & Engler, 2009).

O gênero *Pohlia* está amplamente distribuído e é considerado um dos grandes gêneros de briófitas possuindo cerca de 150 espécies (Crosby et al. 2000), sendo que 25 destas ocorrem na Europa (Frahm & Frey, 2004).

O gênero *Pohlia* foi descrito por Hedwig (1801), com base em uma única espécie: *Pohlia elongata* Hedw. (Shaw, 2006). É um gênero grande, variável e difícil de ser descrito taxonomicamente, devido a caracteres indefinidos (Guerra 2011, Ochyra et al. 2008). A dificuldade relacionada a precisa circunscrição é refletida na história taxonômica e nomeclatural do gênero (Ochyra et al. 2008). No século 19, a obra *Bryologia europaea* considerada de grande importância tanto sobre questões taxonômicas como também nomenclaturais de musgos europeus incluía espécies de *Pohlia* dentro do gênero *Bryum*, (Bruch et al., 1839).

Pohlia é representado em todos os continentes, com a concentração máxima de espécies em regiões de locais frescos e temperados do Hemisfério Norte, mas também nas regiões altas dos trópicos (Shaw, 1981). Espécies de *Pohlia* ocupam uma grande variedade de habitats, a maioria dos táxons ocorrem em solo ácido, muitas vezes em locais perturbados, mas ocorrem também em locais não perturbados, nas margens de córregos; em solos preenchidos de fissuras rochosas no bioma Tundra e locais expostos em zonas alpinas (Shaw, 1981).

Dentre as espécies de *Pohlia*, encontra-se *Pohlia cruda* (Hedw.) Lindb. Essa espécie distribui-se nas regiões polares com poucas localidades intermediárias nos trópicos, porém na Antártica tem sido encontrada em diversas localidades. A espécie também é encontrada na América do Norte, Sul e Central, Europa, Ásia, África, nas ilhas do Pacífico Nova Zelândia e Austrália (Shaw, 2009).

Guerra et al. (2011) realizaram um estudo filogenético com a família Mielichhoferiaceae-Mniaceae (Bryophyta) com base em dados moleculares no qual incluiu a espécie *Pohlia cruda*. O estudo incluiu os marcadores de cloroplasto trnL-F e rps4. Os resultados do estudo sugerem que Mielichhoferiaceae está aninhado com Mniaceae. Além

disso, as sequências investigadas revelaram que *Schizymenium* e *Mielichhoferia* estão relacionados com espécies da Seção *Pohlia-Pohlia* e que a espécie *Pohlia cruda* é mais provável ser encontrada em um clado isolado e basal de Mielichhoferiaceae-Mniaceae.

Segundo (Ochyra et al. 2008), *Pohlia cruda* são plantas de tamanho médio ou ocasionalmente pequenas, esbeltas e bastante robustas, com coloração variando do verde brilhante ao esbranquiçado a verde-amarelado. Os caules possuem comprimento de 4-50 mm de comprimento de cor avermelhada, simples ou ramificada por inovações; em secção transversal com nervura central e bem desenvolvida (Figura 1).

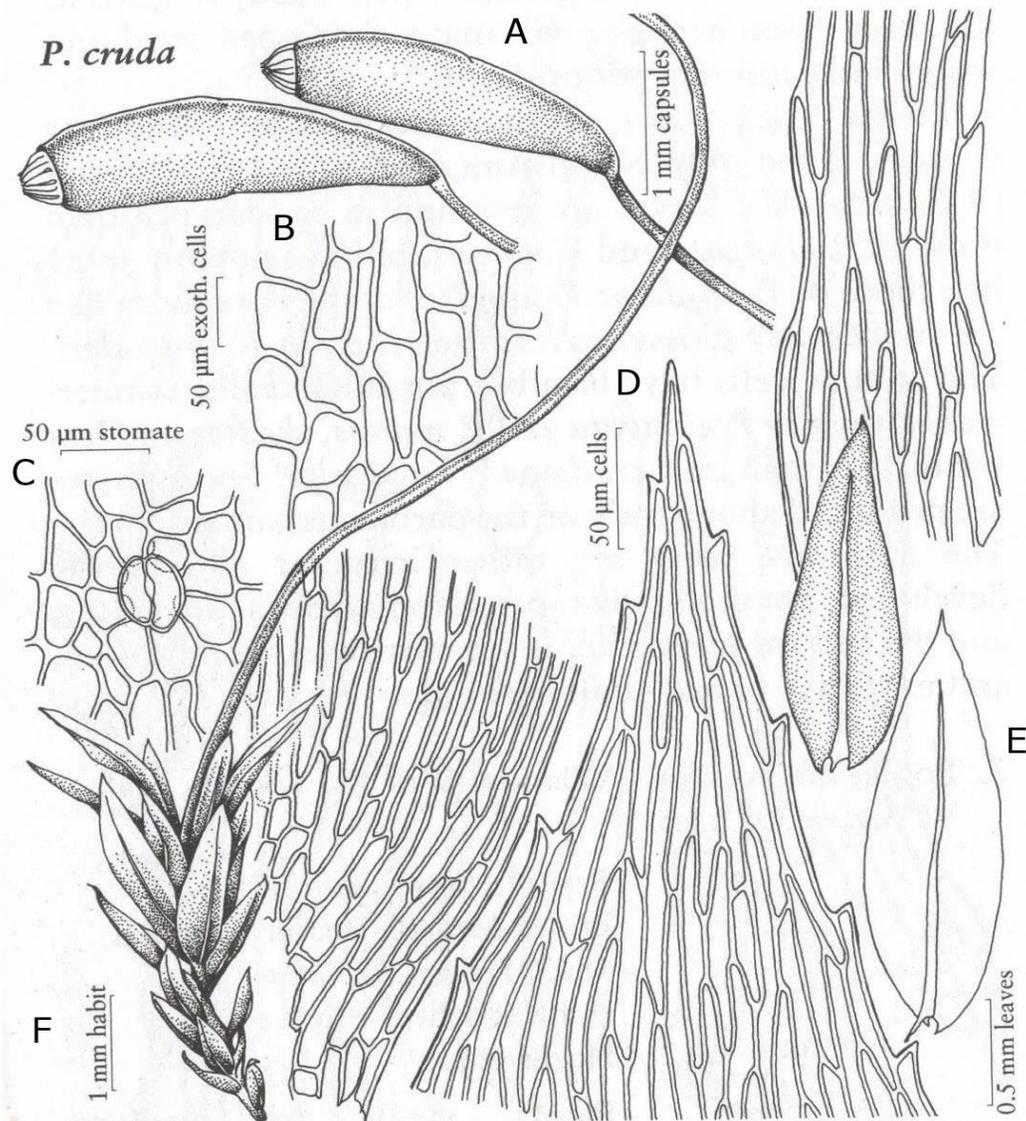


Figura 1. *Pohlia cruda* (Hedw.) Lindb. A. Cápsulas B. Células do exostômio C. Estômato D. Células do ápice E. Filídios F. Hábito. (Flora of North America Editorial Committee, 2007).

Embora seja uma espécie facilmente reconhecida no hemisfério norte, na Antártica tem sido frequentemente confundida com a *Pohlia wahlenbergii* e *P. drummondii*. Na Antártica são citadas cinco espécies de *Pohlia*: (*P. wilsonii* (Mitt.) Ochyra, *Pohlia cruda* (Hedw.) Lindb, *P. drummondii* (Müll. Hal.) A.L. Andrews, *P. nutans* (Hedw.) Lindb. e *P. wahlenbergii* (F.Weber & D. Mohr.), A.L. Andrews), as quatro últimas consideradas bipolares.

De acordo com Du Rietz (1940), as espécies bipolares são aquelas que ocorrem em regiões polares ou temperadas frias de ambos os hemisférios. São os táxons distribuídos em ambos as regiões dos pólos (regiões do Ártico e Antártica), podendo ou não ocorrer em altas altitudes nas regiões intermediárias.

A região Ártica é representada por áreas, tanto continental quanto marítima, que se estendem ao redor do pólo norte. Abarca o Oceano Glacial e suas ilhas, assim como a parte setentrional da Europa, Ásia e América. A área é restringida pelo círculo polar ártico, porém segue um pouco mais adiante, onde o paralelo 70°N consiste o limite meridional no Alasca e na Sibéria (Walker *et al.* 2005). O clima caracteriza-se por extensos períodos de frio, com noites de temperatura média de -25°C (já registrado -68°C), sucedido por curtos verões, poucas chuvas e muito vento. A vegetação da região ártica predomina as plantas vasculares com cerca de 2.218 espécies, sendo 2.130 de angiospermas (Daniëls *et al.* 2013).

A brioflora no Ártico é pobremente conhecida em diversas regiões, no entanto estima-se que é compreendida por 600-900 espécies (Daniëls *et al.* 2013, Hassel *et al.* 2012, Longton 1988).

Segundo Tindall (2004), o continente Antártico é qualificado como o mais frio, elevado, seco e inóspito do planeta Terra e está situado na região polar austral. É permanentemente recoberto por uma camada de gelo e envolvido por uma camada de mar congelado. O volume de gelo antártico possui aproximadamente 70% de água doce. As temperaturas podem chegar até -40° C durante os meses de inverno e a menor temperatura já registrada no planeta foi na região, chegando a atingir -89,2°C, no ano de 1983.

O isolamento geográfico, as condições climáticas e ambientais impactam fortemente a vegetação da Antártica, que é composta predominantemente de musgos e líquens, porém as hepáticas estão também representadas por 27 espécies. Os líquens são representados por 386 espécies e os musgos por 111 espécies (Gradstein, 2001; Ochyra *et al.*, 2008).

As espécies de musgos encontrados na Antártica são divididas entre seis elementos fitogeográficos, que são: Estritamente Antárticas (11 espécies - 9,9%); Subantárticas (18 espécies - 16,2%); temperadas do Sul (26 espécies - 23,4%); Cosmopolitas (5 espécies - 4,5%); Tropicais (1 espécie - 0,9%); e bipolares (50 espécies - 45,1%) (Ochyra *et al.*, 2008).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção de amostras

As amostras empregadas neste estudo foram obtidas através de empréstimos solicitados aos herbários: AAS (The British Antarctic Survey), CAN (National Herbarium of Canada), F (Field Museum - United States), H (Finnish Museum of Natural History - Finland), L (National Herbarium of the Netherlands), LE (Komarov Botanical Institute - Russia), NY (New York Botanical Garden), RB (Instituto de Pesquisa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro) e S (Swedish Museum of Natural History -Sweden), (siglas segundo Thiers (2016)).

Além disso, foram utilizadas amostras coletadas no continente Antártico. As coletas foram realizadas pela equipe do Projeto Evolução e Dispersão de Espécies Antárticas Bipolares de Briófitas e Líquens (64/2013) do (MCTI/CNPq) durante os verões antárticos de 2014-2015 e 2015-2016, nas expedições OPERANTAR XXXIII e XXXIV.

Uma nova coleta ainda ocorrerá no verão de 2016-2017, OPERANTAR XXXV. O material foi coletado segundo as orientações de Yano (1984), coletando, sempre que possível, cinco exemplares por população. O material coletado foi depositado no herbário da Universidade de Brasília (UB). Foram utilizadas amostras de *Pohlia cruda* de diversas regiões da Antártica, bem como regiões do Ártico (tabela 1 e 2).

Previamente à expedição para a Antártica, participei e fui aprovada no Treinamento Pré-Antártico (TPA), no qual professores e alunos de universidades brasileiras, representantes do Ministério do Meio Ambiente (MMA), do Ministério das Relações Exteriores (MRE) e da Força Aérea Brasileira (FAB); alpinistas do Clube Alpino Paulista; psicólogos e especialistas em atividades físicas e de manejo com embarcações participaram do treinamento. O objetivo do treinamento foi propiciar conhecimentos básicos necessários ao exercício de atividades no ambiente antártico, assim como a integração dos participantes das Operações Antárticas (OPERANTAR), (RAPAL, 2009). No TPA foram proferidas palestras, demonstrações, exercícios e instruções visando prover aos alunos uma clara ideia do que iriam encontrar na Antártica e familiarizá-los com todos os aspectos do Sistema do Tratado da Antártica, com ênfase especial às situações adversas que poderão ocorrer no Ambiente Antártico, a bordo de navios ou das Estações Antárticas (RAPAL, 2009). Somente após esse treinamento a equipe está apta a participar da expedição na Antártica. Ainda terei

oportunidade de participar da OPERANTAR XXXV e estarei na Antártica entre os dias 07 a 30 de janeiro de 2017.

5.2 Estudos filogenéticos

5.2.1 Extração de DNA e amplificação

Os espécimes selecionados para a extração foram limpas em água destilada com auxílio de um pincel ou agulha visando à retirada da terra, restos de substratos e outras espécies que fortuitamente crescem em associação com o material selecionado. A extração do DNA genômico foi obtido utilizando o protocolo mini-CTAB (Doyle & Doyle 1987), com modificações (Câmara, 2010). A amplificação do DNA foi realizada segundo a Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) (Mullis & Faloona, 1987).

Foram amplificados regiões de dois genomas. Para regiões do cloroplasto foi utilizado o marcador íntron *trnL* e o espaçador intergênico *trnL-trnF* com a utilização dos primers (*trnL (C-F)*) e para o núcleo foi utilizado o marcador *ITS* com os primers (*PISA 1* e *PISA 2*). Os primers utilizados na amplificação se encontram na tabela 1.

Tabela 1. Primers utilizados na amplificação do DNA, com direção e respectivas sequências.

Primer	Direção	Sequência
<i>PISA 1</i>	Forward	CCG ATT GAA TGG TCC GGT GAA GTT TTC G
<i>PISA 2</i>	Reverso	GCT GGG CTC TTT CCG GTT CGC TCG CCG
<i>trnL-C</i>	Reverso	CGA AAT TGG TAG ACG CTG CG
<i>trnL-F</i>	Forward	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG

A mistura da amplificação do PCR foi realizada com volume total de 50 µl, contendo de 5 µl de 10x “thermophilic” tampão, 5 µl de 50mM MgCl₂, 0,5 µl de Taq (Promega), 2 µl de BSA (10 mg / ml), 4 µl 1mM de dNTP, 2,5 µl de cada primer (10mM) e 2 µl do DNA. Para

a amplificação de *ITS*, foi adicionado 1µl de betaína quando a amplificação inicialmente falhou.

As condições de amplificação foram às seguintes para todos os primers, com diferenças apenas nas temperaturas de anelamento. O perfil de PCR para *ITS* e *trnL* foi de 94°C (1 minuto), 52 ou 59°C (1 minuto), 72°C (1 minuto) durante 35 ciclos, sempre precedido pela etapa de fusão inicial de 2 minutos a 94°C e a extensão final de 72°C durante 7 minutos. As temperaturas de anelamento dos primers foram de 48°C - 58°C para *ITS 1 e 2* e 50°C - 52°C (*trnL (F-C)*).

5.2.2 Sequenciamento e análise dos dados

A purificação da reação de PCR e o sequenciamento (sem clonagem) foram terceirizadas e realizada pela empresa MACROGEN Inc (Coreia do Sul). A montagem das sequências (Contigs) foram feitas utilizando o software Geneious v. 6.1.6 (Biomatters 2010). Todas as sequências serão submetidas ao GenBank. Conjuntamente, foi utilizado as sequências do banco de dados de nucleotídeos (GenBank) – NCBI (National Center for Biotechnology Information) para complementação da matriz de dados.

Todas as sequências filogenéticas foram inicialmente alinhadas utilizando o software Clustal X (Higgins & Sharp 1988), e ajustadas manualmente por comparação visual no PhyDE (v. 0.9971). As análises de Máxima Verossimilhança foram feitas no programa GARLI v.0951 para Macintosh (Zwickl, 2006) e as análises Bayesianas no programa Mr Bayes v. 3.2.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Os modelos de evolução foram obtidos por meio do software JModeltest 2.1.1 (Guindon & Gascuel 2003, Darriba *et al.* 2012), para as análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana.

O suporte da árvore filogenética foi avaliado através do bootstrap não paramétrico (Felsenstein, 1985) com 100 repetições para Máxima Verossimilhança e probabilidades posteriores para Inferência Bayesiana.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram amplificadas 82 amostras no total, tanto para trn1F quanto para ITS. Para o marcador trn1F, 18 amostras do gênero *Pohlia* obtiveram sucesso no sequenciamento. Para o marcador ITS, 22 amostras de *Pohlia* obtiveram sucesso no sequenciamento. Na filogenia, 21 amostras de herbários foram utilizadas (Tabela 2) e conjuntamente, para complementação da matriz de dados, utilizou-se 43 sequencias do Genbank (Tabela 3). Também foi utilizado 18 sequencias do Norte, em parceria com Michael Stech, professor da Naturalis Biodiversity Center, localizada na Holanda.

Para gerar uma árvore combinada utilizando os marcadores ITS e trn1F, é preciso que ambas regiões tenham sido amplificadas e sequenciadas. As árvores filogenéticas foram geradas apenas a partir do marcador trn1F, pois as sequências de ITS do ártico ainda não foram obtidas, possuindo apenas as sequências do material da Antártica e assim, não havendo base para comparação entre a região Ártica e Antártica (Figura 2).

Tabela 2. Lista de material utilizados na filogenia contendo vouchers. (Continua)

Código	Local	Coletor	Número de Coleta	Data de Coleta	Identificação	Herbário
PO 33	Antártica, South Shetlands: King George Island	Oliveira, H.C.	2485	18/01/15	<i>Pohlia cruda</i>	UB
PO 32	Antártica, South Shetlands: King George. Península Fildes	Mundin, J.V.	485	06/03/15	<i>Pohlia cruda</i>	UB
PO 13	Antártica, South Shetlands: King George.	Dantas, T.S.	149	09/02/15	<i>Pohlia cruda</i>	UB
PO 02	Antártica, South Shetlands: Ilha Greenwich	Bordin, J.	2619	13/01/15	<i>Pohlia cruda</i>	UB
PO 04	Antártica, South Shetlands: Península Fildes around King Sejong Station	Dantas, T.S.	229	14/02/15	<i>Pohlia drummondii</i>	UB
PO 26	Antártica, South Shetlands: Península Fildes around King Sejong Station	Dantas, T.S.	230	14/02/15	<i>Pohlia drummondii</i>	UB
PO 25	Antártica, South Shetlands: King George Island	Dantas, T.S.	215	11/02/15	<i>Pohlia drummondii</i>	UB
PO 29	Antártica, South Shetlands: Península Fildes around King Sejong Station	Dantas, T.S.	233	14/02/15	<i>Pohlia drummondii</i>	UB
PO 28	Antártica, South Shetlands: Península Fildes around King Sejong Station	Dantas, T.S.	232	14/02/15	<i>Pohlia drummondii</i>	UB
PA 01	Suécia	-	-	-	<i>P. drummondii</i>	-

Tabela 2. Lista de material utilizados na filogenia contendo vouchers. (Continua)

Código	Local	Coletor	Número de Coleta	Data de Coleta	Identificação	Herbário
PO 27	Antártica, South Shetlands: Península Fildes around King Sejong Station	Dantas, T.S.	231	14/02/15	<i>Pohlia drummondii</i>	UB
PO 03	Antártica, South Shetlands: Península Fildes around King Sejong Station	Dantas, T.S.	220	11/02/15	<i>Pohlia drummondii</i>	UB
PO 07	Antártica, South Shetlands: Ardley	Oliveira, H.C.	2482	16/02/15	<i>Pohlia nutans</i>	UB
PO 08	Antártica, South Shetlands: King George Island. King Sejong Station	Dantas, T.S.	219	11/02/15	<i>Pohlia nutans</i>	UB
PO 05	Antártica, South Shetlands: King George Island. King Sejong Station	Dantas, T.S.	226	11/02/15	<i>Pohlia longicolla</i>	UB
PO 09	Antártica, South Shetlands: Ardley	Oliveira, H.C.	2474	16/02/15	<i>Pohlia wahlenbergii</i>	UB
PO 06	Antártica, South Shetlands: King George Island	Dantas, T.S.	225	11/02/16	<i>Pohlia longicolla</i>	UB
BP 38	Antártica, Estreito de Gerlache: Ilha Wiencke	Bordin, J.	2646	13/01/15	<i>Pohlia nutans</i>	UB
M1	Noruega. Svalbard.	Michael	1314	-	<i>Pohlia nutans</i>	L
M2	Noruega. Svalbard.	Michael	1315	-	<i>Pohlia nutans</i>	L

Tabela 2. Lista de material utilizados na filogenia contendo vouchers. (Conclusão)

Código	Local	Coletor	Número de Coleta	Data de Coleta	Identificação	Herbário
M3	Noruega. Svalbard.	Michael	1313	-	<i>Pohlia nutans</i>	L

Tabela 3. Lista de material utilizado na filogenia contendo número do Genbank. (Continua)

Número de acesso: primer trnI	Identificação
KR526303	<i>Mnium hornum</i>
AF231177	<i>Mnium hornum</i>
AF023767	<i>Mnium hornum</i>
AF363279	<i>Mnium hornum</i>
JF277343	<i>Mnium hornum</i>
JF277354	<i>Mnium spinosum</i>
KR526295	<i>Rhizomnium horikawae</i>
JF277357	<i>Rhizomnium punctatum</i>
KR526296	<i>Rhizomnium magnifolium</i>
KR526298	<i>Rhizomnium pseudopunctatum</i>
KR526297	<i>Rhizomnium magnifolium</i>
JF277356	<i>Rhizomnium magnifolium</i>
KR526293	<i>Mnium lycopodioides</i>
KR526294	<i>Mnium thomsonii</i>
KR5263292	<i>Mnium heterophyllum</i>
DQ108958	<i>Mnium stellare</i>
JF277355	<i>Mnium stellare</i>
AF023761	<i>Pohlia bolanderi</i>
JF277344	<i>Pohlia longicolla</i>
JF277340	<i>Epipterygium tozeri</i>
AY150359	<i>Epipterygium tozeri</i>
JF277341	<i>Pohlia wahlenbergii</i>
JF277342	<i>Pohlia melanodon</i>
JF277360	<i>Pohlia cruda</i>
JF277359	<i>Pohlia cruda</i>
AF023760	<i>Pohlia cruda</i>
JF277353	<i>Pohlia nutans</i>

Tabela 3. Lista de material utilizado na filogenia contendo número do Genbank. (conclusão)

Número de acesso: primer trnF	Identificação
JF277352	<i>Pohlia nutans</i>
DQ108957	<i>Pohlia nutans</i>
JF277349	<i>Pohlia elongata</i>
JF277348	<i>Pohlia elongata</i>
JF277351	<i>Pohlia chilensis</i>
JF277346	<i>Pohlia lescuriana</i>
JF277350	<i>Mielichhoferia mielichhoferiana</i>
AF023765	<i>Mielichhoferia bryoides</i>
AF023766	<i>Mielichhoferia elongata</i>
JF277347	<i>Schizymenium campylocarpum</i>
EU186548	<i>Mielichhoferia mielichhoferiana</i>
JF277337	<i>Pohlia annotina</i>
JF277338	<i>Pohlia annotina</i>
JF277339	<i>Pohlia camptotrachela</i>
JF277336	<i>Pohlia andalusica</i>
JF277345	<i>Pohlia bolanderi</i>
L0818598	<i>Pohlia drummondii</i>

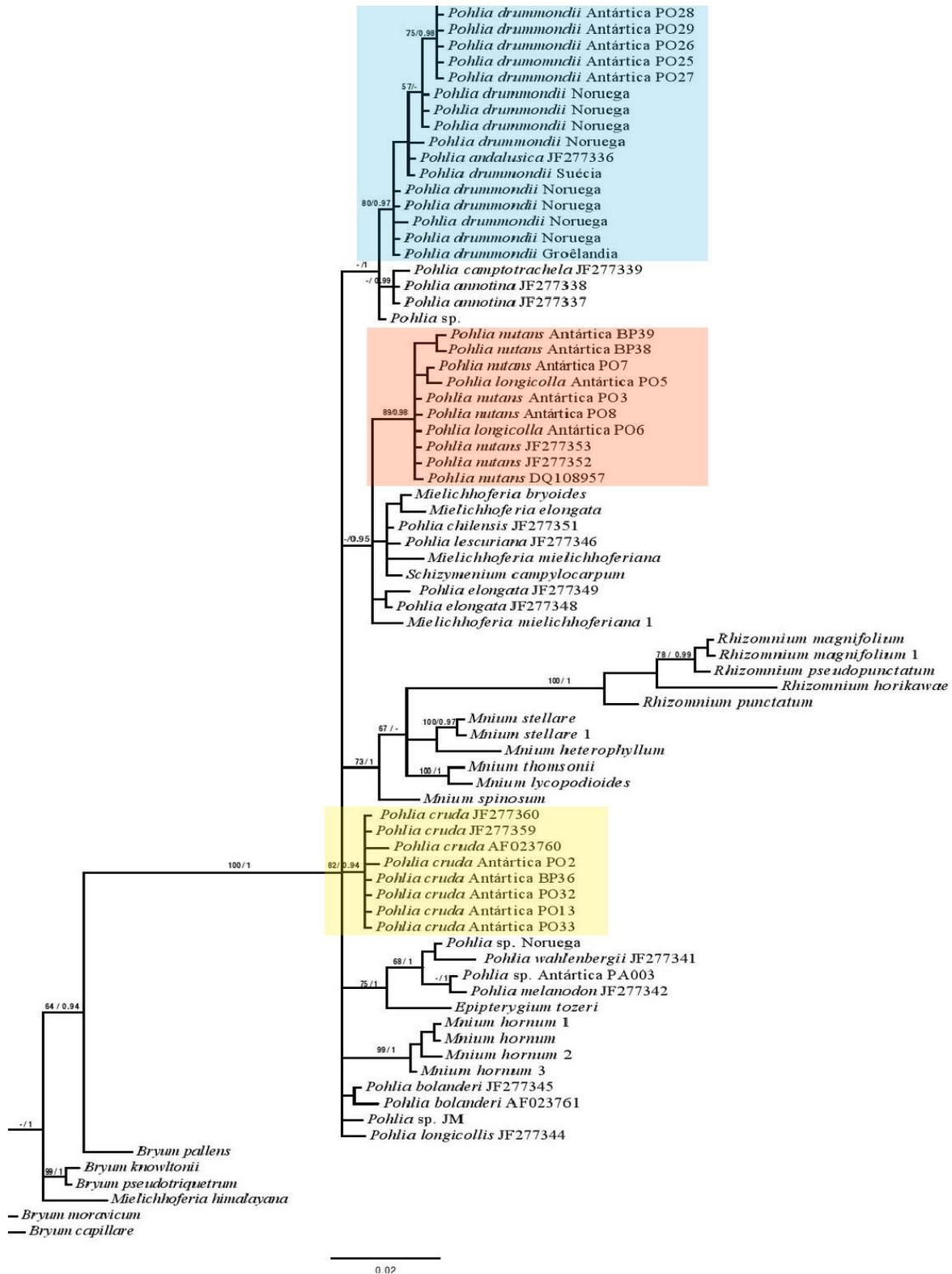


Figura 2. Cladograma (bayesiana) obtido a partir do marcador trnF. Os valores sobre os ramos correspondem aos valores de bootstrap de verossimilhança e probabilidades posteriores da análise Bayesiana.

Na análise filogenética, foi utilizado como um grupo externo o gênero *Bryum*, da família Bryaceae, grupo irmão da família Mniaceae (Guerra et al., 2011). Nas análises apresentadas a família Mniaceae é um grupo monofilético, com alto suporte (1 PP - probabilidade posterior e 100 BS – bootstrap), dados já demonstrado por Guerra et al. (2011). Foram amostradas 14 espécies de *Pohlia*, a maioria espécies que ocorrem na Europa, no entanto cinco espécies que ocorrem na antártica (*P. wahlenbergii*, *P. longicolla*, *P. nutans*, *P. drummondii*, *P. cruda*,) também foram amostradas. Dentre as espécies antárticas, *Pohlia wilsonni* (Mitt.) Ochyra não foi amostrada, pois embora seja registrada na bibliografia (Ochyra et al 2008), não obtivemos nenhum material para estudo.

Pohlia wahlenbergii encontra-se na filogenia, mas o espécime amostrado pertence ao banco de dados do Genbank e não temos informação sobre a localidade de origem desse material. Embora já tenhamos amostras coletadas da espécie, ainda não conseguimos sucesso na amplificação do material, no entanto não temos informações para testar a bipolaridade da espécie.

Pohlia drummondii, outra espécie considerada bipolar, ocorre na região Norte na América do Norte, Europa, Ásia e no Sul frequentemente encontrada na ilha subantártica Georgia do Sul, penetrando a antártica marítima, e também no Sul do Hemisfério Sul, no Sudoeste da Austrália e Tasmânia, na antártica ocorrendo na ilha South Sandwich, passando pela ilha South Orkney, ilha Smuh Shetland até Graham Coast, no Oeste da península antártica (Ochyra et al. 2008). A espécie aparece na filogenia em um clado com alto suporte (0,97 PP - probabilidade posterior, 80 BS - bootstrap), no entanto, dentro do mesmo clado aparece também a espécie *P. andalusica*. A sequência de *P. andalusica* foi retirada do Genbank, o que impossibilitou a identificação e verificação morfológica da espécie.

Pohlia drummondii é uma espécie bipolar, incluindo amostras da antártica e da região Norte (Holanda, Groelândia, Noruega e Suécia). Nossos dados mostram um subclado formado apenas pelos os espécimes da antártica, apresentando suporte razoável (0,96 PP – probabilidade posterior, 90 BS – bootstrap), mas os espécimes do Norte apresentam-se como parafiléticos e incluem a espécie *P. andalusica*.

Pohlia nutans é uma espécie pantropical (Ochyra et al. 2008), e os espécimes estão inseridos dentro de um mesmo clado, incluindo amostras da antártica e da região Norte (Noruega, Holanda, Espanha), com suporte de baixo (0,74 PP – probabilidade posterior, 89

BS – bootstrap). No mesmo clado que *P. nutans*, também está inserido dois espécimes de *P. longicolla*. Os espécimes de *P. longicolla* que se encontram dentro desse clado são da Antártica, e foram identificados pela primeira vez para a região, no entanto, outro material do Genbank da mesma espécie é encontrado na base da árvore. A identificação do material da Antártica foi realizada pelo pesquisador Doutor Guillermo Suaréz, especialista no gênero *Pohlia*. Os dados iniciais demonstram que morfológicamente as duas espécies (*Pohlia nutans* e *P. longicolla*) sejam diferentes, porém geneticamente semelhantes. Nossos dados já sugerem a bipolaridade de *P. nutans*, porém, mais amostras das duas espécies, bem como novos marcadores são necessários para melhorar a resolução dentro desse clado e fornecer mais informação sobre a monofilia desses grupos.

Pohlia cruda é encontrada no Norte em toda faixa contínua do Holártico e no Sul é encontrada na zona do *Nothofagus*, nas margens ocidentais do Sul da América do Sul da província Valdivia localizada no Chile até Terra do Fogo na Argentina, na ilha subantártica Georgia do Sul, na antártica marítima, no sudoeste da Austrália e da Tasmânia e nas ilhas South Shetlands na antártica (Ochyra et al. 2008).

Está estabelecida na filogenia e caracterizada como um grupo monofilético com suporte moderado (0,94 PP – probabilidade posterior, 82 BS – bootstrap). Com amostragem de oito espécimes, sendo cinco da antártica e três do Ártico o comprimento dos ramos não varia, exceto em dois espécimes, que possuem ramos mais longos do que os outros devido ao número de mutações. O primeiro espécime (AF023760) é uma amostra da região Norte, e possui duas mutações em seu sítio nucleotídico. Na primeira mutação a base nitrogenada Guanina é substituída pela Adenina, e outra mutação a base nitrogenada Adenina é substituída pela Timina. O segundo espécime (PO 2), é um espécime da Antártica e possui apenas uma mutação que a diferencia dos outros espécimes de *P. cruda*, onde a base nitrogenada passa de Guanina para Timina.

As características morfológicas de *P. cruda* da região Norte foram comparadas com as características dos espécimes da região antártica. Foram observadas principalmente caracteres morfológicos do gametófito, pois não foi encontrado espécimes com esporófito na Antártica. As características morfológicas analisadas (tamanho do gametófito, formas e tamanho dos filídeos) não apresentaram diferenciação entre os espécimes estudados, os tamanhos estão sempre sobrepostos. Essas observações foram realizadas com a colaboração

do Dr. Guillermo Suárez e até o momento não foi encontrada nenhuma diferença morfológica entre os espécimes da região do Ártico e da Antártico, concordando com os dados já relatados por (Ochyra et al. 2008) (Figura 3).

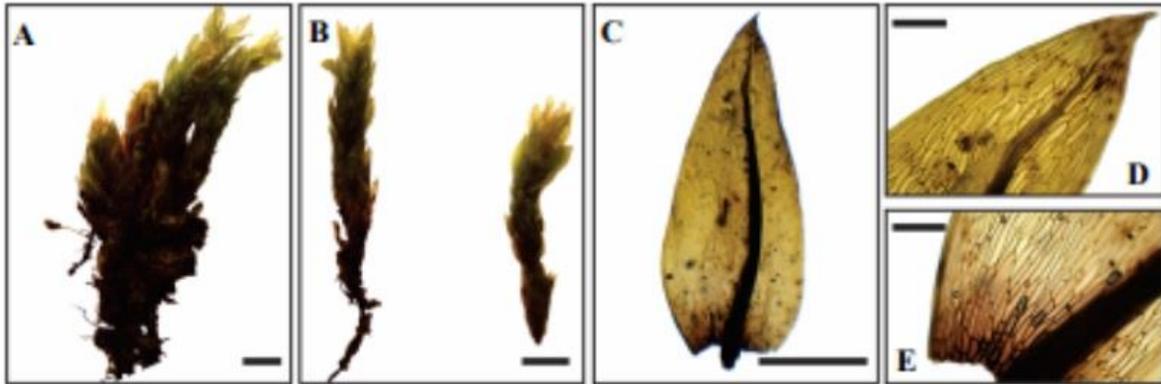


Figura 3. A. Gametófito; B. Detalhe dos ramos; C. Filídeo; D. Ápice do filídeo; E. Base do filídeo. **Escalas:** A e B: 1mm; C: 500 μ m; D e E: 200 μ m. Foto: Diego Knop Henriques, 2016.

7 CONCLUSÃO

A bipolaridade de *Pohlia cruda* foi testada e comprovada através de dados moleculares e morfológicos. A espécie é monofilética e foram encontradas no máximo duas mutações entre os espécimes tratados. Sabe-se que o marcador trnIF é um marcador de cloroplasto e para alguns grupos de plantas considerados muito conservadores. Para as espécies de musgos acrocárpicos o trnLF é um bom marcador utilizado frequentemente para separar espécies.

Novos espécimes ainda estão sendo trabalhados, e serão incluídos na análise filogenética de forma a aumentar a representatividade geográfica. Também estão sendo amplificados um marcador de núcleo, o ITS, para todas as amostras e serão incluídos na filogenia de forma a melhorar o suporte dos ramos e comprovar a monofilia dos grupos. Morfológicamente a espécie da Antártica não apresenta diferenças em relação aos espécimes do Ártico o que já havia sido demonstrado por Ochyra (2008). Esses dados corroboram com os dados moleculares obtidos e sugerem a bipolaridade de *Polia cruda*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSOS, I.G.; EIDEN, P.B.; EHRICH, D.; SKREDE, I.; WESTERGAARD, K.; JACOBSEN, G.H.; LANDVIK, J.Y.; TABERLET, P.; BROCHMANN, C.. Frequent long-distance plant colonization in the changing Arctic. **Science**. v. 316, p.1606–1609. 2007.
- BARDAT, J.; AUBERT, M. Impact of forest management on the diversity of corticolous bryophyte assemblages in temperate forests. **Biological Conservation**., v. 139, p. 47-66. 2007.
- BRUCH & W. P. SCHIMPER. Setzten ihre. **Bryologia Europaea**, od. Monographien europ. Moesgattungen mit Abbild. 1839.
- BUCK, W. R.; GOFFINET, B. Morphology and classification of mosses. **Bryophyte Biology**., England, p. 71-123. 2000.
- CÂMARA, P. E. A. S. Métodos de extração de DNA de Bryophyta para análises filogenéticas. **Boletim do Instituto de Botânica**., v.18, p. 159-162. 2010.
- CARVALHO, C. J. B. Padrões de endemismo e a conservação da biodiversidade. **Mega diversidade**., v.5, p. 77-85. 2009.
- CROSBY, M. R.; MAGILL, R. E.; ALLEN, B. & He S. **A checklist of the mosses**. St. Louis: Missouri Botanical Garden. 1999.
- DANIËLS, F. J. A.; GILLESPIE, L. J. & POULIN, M. ABA – Arctic Biodiversity Assessment. **Plants**., cap.9, p.310-353. 2013. Disponível em: <www.arcticbiodiversity.is>. Acesso em: 06 abr. 2016.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. ModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**. v.9, p. 772. 2012.
- DELGADILLO M.; C. & A. CÁRDENAS S. **Manual de briófitas**. 2ª ed. México: Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. 1990.

- DODGE, C.W. **Lichen flora of the Antarctic Continent and adjacent islands.** 1 ed. Estados Unidos, Canaan, New Hampshire: Phoenix publishing, 1973. 399 p.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.
- DU RIETZ, G.E. Problems of the bipolar plant distribution. **Acta Phytogeographic**, Suecica, v.13, p, 215–282. 1940.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p.779–783. 1985.
- FERNÁNDEZ, E.G.; SERRANO, A. M. V. **Atividade biológica das Briófitas.** Âmbito Cultural, 2009, 190p.
- FLORA OF NORTH AMERICA EDITORIAL COMMITTEE. **Flora of North America.** Bryophytes: Mosses, part 2. Oxford University Press, New York. v. 28. 2007. 199 p.
- FRAHM, J.P.; FREY, W. **Moosflora.** 4^a ed. 2004.
- FREGO, K.A. Bryophytes as potential indicators of forest integrity. **Forest Ecology and Management**, vol. 242, p. 65-75. 2007.
- FREY, W. & ENGLER, A. A. **Syllabus of plants families.** 13^a ed. 2009. p. 195-196.
- GOFFINET, B.; BUCK, W.R. & SHAW, A.J. Morphology and Classification of the Bryophyta. In: Goffinet, B. & Shaw, A.J. (eds.). **Bryophyte Biology.** New York: Cambridge University Press, 2009. p. 55-138.
- GRADSTEIN, S.R. **The Liverwort Flora of Antarctica. Book review.** Antarctic Science, v. 13 (2), p. 222. 2001.
- GRADSTEIN, S.R.; CHURCHILL, S. P. & SALAZAR-ALLEN, N. **Guide to the Bryophytes of Tropical America.** Memoirs of the New York Botanical Garden, v.87, p.1-301. 2001.
- GUINDON, S. & GASCUEL, O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. **Systematic Biology**, v.52 p. 696-704. 2003.

- HASSEL, K.; PRESTO, T. & SCHMIDT, N.M. **Bryophyte diversity in high and low Arctic Greenland**. Establishment of permanent monitoring transects and bryophyte mapping in Zackenberg and Kobbefjord 2009-2010. Aarhus University, DCE – Danish Centre for Environment and Energy. Scientific Report from DCE – Danish Centre for Environment and Energy, n. 27. 2012. Disponível em: <<http://www.dmu.dk/Pub/SR27.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2016.
- HEDENÄS, L. Global phylogeography in *Sanionia uncinata* (Amblystegiaceae: Bryophyta). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 168, p. 19-42. 2012.
- HESPANHOL, H.; VIEIRA, C. C. & SÉNECA, A. **Briófitas**. Porto: Vertigem. 2008. 36p.
- HIGGINS, D.G. & SHARP, P.M. CLUSTAL: A package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. **Gene**, Department of genetics, trinity college, Dublin, Ireland, v.73, p. 237–244. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3243435>>. Acesso em: 04 jul. 2016.
- GUERRA, J.; JIMENEZ-MARTÍNEZ, J.F.; CANO, M.J. & JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, J.A.. A contribution to the phylogenetic study of Mielichhoferiaceae-Mniaceae (Bryophyta) based on molecular sequence data. **Nova Hedwigia**, v. 93, n.1-2, p. 47–56. 2011.
- KATO, K.; ARIKAWA, T.; IMURA, S.; KANDA, H. Molecular identification and phylogeny of an aquatic moss species in Antarctic lakes. **Polar Biology**, v. 36, p. 1557-1568.
- LAMB, I.M. Antarctic terrestrial plants and their ecology. In: **Antarctic Ecology**, M.W. Holdgate (ed.), London, Academic Press. p. 733-751. 1970.
- LINDSAY, D.C. Lichens of cold deserts. In: Seaward, M.R.D. (ed.). **Lichen Ecology**. Academic Press, London. p. 183-209. 1977.
- LISBOA, R.C.L. Musgos e Hepáticas. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 91, p. 14-19, 1993.
- MULLIS, K.B, FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** v.155 p.335–350. 1987.

- OCHYRA, R., LEWIS SMITH, R.I., BEDNAREK-OCHYRA H. **The illustrated moss flora of Antarctica**. Cambridge: Cambridge University Press. 2008.
- PUTZKE, J. & PEREIRA, A. B. **The Antarctic mosses, with special reference to the South Shetland Islands**. Canoas/RS: ULBRA (Universidade Luterana do Brasil), 196p. 2001.
- (RAPAL) Reunião de Administradores de Programas Antárticos Latino-Americanos. INSTITUTO ANTÁRTICO URUGUAIO. **Treinamento pré-antártico**. Disponível em: <http://www.iau.gub.uy/rapal2009/docs-rapal2009/di-rapal2009/di-07_brasil_%20entrenamiento_preantartico.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2016.
- ROGERS, A.D. Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. v. 362, p.2191–2214. 2007.
- RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J. P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v.19 p.1572-1574. 2003.
- SANTOS, R.C. & LISBOA, R.C.L.. Musgos (Bryophyta) do Nordeste Paraense, Brasil – 1. Zona Bragantina, Microrregião do Salgado e Município de Vicseu. **Acta Botânica**, v. 33, n.3, p.415-422. 2003.
- SHAW, A. J. A. Revision of the Moss Genus *Pohlia* Hedw. (Mniaceae) in Australia. **Systematic Botany**. 2006.
- SHAW, A. J.. Flora of North America, **Bryophytes. Mielichhoferiaceae**, v. 28, p. 194. 2009.
- SINGH, M.; RAWAT, A.K.S. & GOVINDARAJAN, R. Antimicrobial activity of some Indian mosses. **Fitoterapia**, v.78, p. 156-158. 2007.
- SWOFFORD, D.L. Phylogenetic Analyses using parsimony (*and other methods), version 4.0. **Sinauer Associates**, Sunderland, Massachusetts. 2002.
- THE PLANT LIST. **The Plant List**. Version 1.1. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

- THIERS, B. INDEX HERBARIORUM. A **global directory of public herbaria and associated staff**. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponível em: <<http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>>. Acesso em: 07 jun. 2016.
- TINDALL, B.J. Prokaryotic diversity in the Antarctic: the tip of the iceberg. **Microbial Ecology**, v. 47, p. 271-283. 2004.
- WALKER, K.A.; RANDALL, C.E.; TREPTE, C.R.; BOONE, C.D. & BERNATH, P.F. Initial validation comparisons for the Atmospheric Chemistry Experiment (ACE-FTS). **Geophysical Research Letters**, v.32, ed 16. 2005.
- WILSON, D.; STOCK, W.D. & HEDDERSON, T. Historical nitrogen content of bryophyte tissue as an indicator of increased nitrogen deposition in the Cape Metropolitan Area, South Africa. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 938-945. 2009.
- YANO, O. Briófitas. In: O. Fidalgo & V. Bononi (coord.). **Técnicas de coleta, Preservação e Herborização de Material botânico**. Briófitas. Série Documentos, Instituto de Botânica de São Paulo. p. 27-30. n.4 1984.
- ZWICKL, D.J. **Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion**. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin. p. 125 2006.