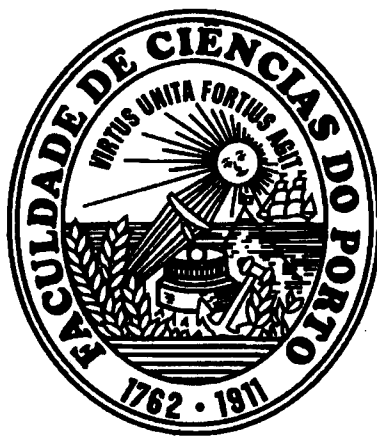


Ter-4/193

Mariana de Sá Ricca Manadelo Ferreira

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DO COMPLEXO DE *Sphagnum subsecundum* Nees e
DE *Platyhypnidium lusitanicum* (Schimp.) Ochyra & Bednarek-Ochyra e *P. riparioides* (Hedw.) Dixon



Departamento de Zoologia/Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2006



FC

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto



000065212

Fse - 11 / 193

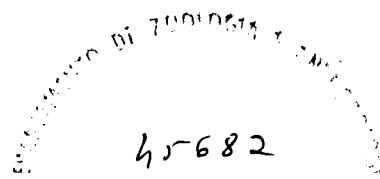
U. PORTO

FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO



Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

CIBIO-UP



DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DO COMPLEXO DE *Sphagnum subsecundum* Nees e DE *Platyhypnidium lusitanicum* (Schimp.) Ochyra & Bednarek-Ochyra e *P. riparioides* (Hedw.) Dixon

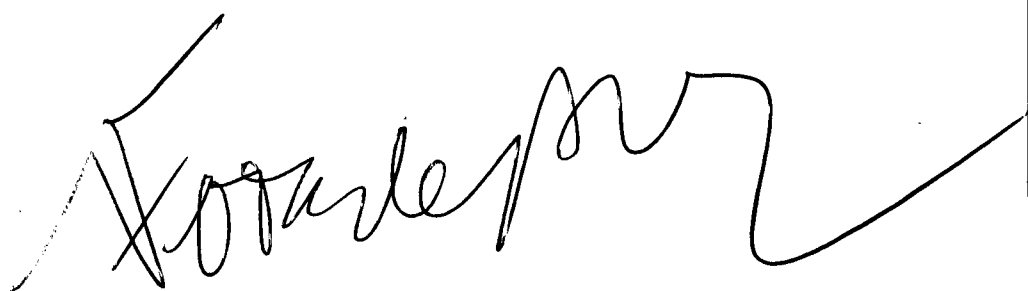
Mariana de Sá Ricca Manadelo Ferreira

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Recursos Genéticos apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Orientadora: Ana Séneca (Professora Auxiliar do Departamento de Botânica da Faculdade Ciências Universidade Porto).

Porto
2006

O presidente do Júri

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'F. de M.', written in a cursive style. The signature starts with a large, sweeping 'F' and ends with a long, horizontal flourish.

AGRADECIMENTOS

Não poderia iniciar esta dissertação sem antes dirigir algumas palavras de agradecimento a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a sua realização.

Em primeiro lugar gostaria de prestar os meus agradecimentos à Professora Doutora Ana Séneca, orientadora deste trabalho, pela disponibilidade e dedicação, nomeadamente no esclarecimento de dúvidas e pelo estímulo constante.

Ao Professor Doutor Nuno Ferrand, coordenador do CIBIO e do mestrado em Biodiversidade e Recursos Genéticos, gostaria de agradecer principalmente a confiança demonstrada e a oportunidade de fazer parte deste grupo de investigação. A formação de que pudemos usufruir ao longo deste curso foi sem dúvida de enorme qualidade, potenciando o nosso interesse e motivação como investigadores.

Não quero ainda deixar de manifestar a minha sincera gratidão ao Professor Doutor Barreto Caldas, Professora Doutora Susana Pereira, Professor Doutor João Honrado, Doutor Alain Vanderpoorten, Doutor James Harris, Doutor Claude Dopagne, Ângela Lomba, Cristiana Vieira, Helena Hespanhol, João Torres, Joana Marques, Paulo Alves, Sara Rocha, Sara Ferreira, Sérgio Timóteo e Teresa Azevedo sem os quais, pela amizade e apoio científico e técnico, este trabalho não teria sido realizado.

Devo ainda um agradecimento especial à minha família e ao Nuno, aos quais subtraí a atenção que me merecem!

RESUMO

Nos últimos 20 anos, estudos com isoenzimas revelaram inesperados níveis de variação genética de briófitas, o que conduziu a uma reavaliação da biologia populacional e das taxas de evolução nestes organismos. Recentemente, em vários trabalhos verificaram-se discrepâncias entre a taxonomia convencional e os resultados obtidos por análises genéticas, evidenciando que é necessário melhorar o conhecimento que temos sobre a biologia destas plantas.

Este trabalho visa o estudo de populações do agregado de espécies de *Sphagnum* L. mais comum em Portugal – o complexo de *S. subsecundum* Nees e o da diversidade genética de duas morfoespécies controversas e de difícil delimitação *Platyhypnidium lusitanicum* (Schimp.) Ochyra & Bednarek-Ochyra e *P. riparioides* (Hedw.) Dixon utilizando ISSR.

Os resultados obtidos mostram que as populações que representam o limite sul da distribuição europeia do complexo de *S. subsecundum* para além de geograficamente isoladas, são também geneticamente diferenciadas, mostrando a importância de conservação destas áreas.

Com estes marcadores não se obteve uma distinção entre as duas espécies de *Platyhypnidium*, antes elevados valores de variação intraespecífica.

ABSTRACT

In the last 20 years, isoenzymes studies in bryophytes revealed unexpected levels of genetic variation, which led to a reevaluation of the populational biology and evolution rates of these organisms. Recently, many papers highlighted discrepancies between traditional taxonomy and results obtained by genetic analysis, emphasizing that is still too much to learn about the biology of these plants.

This work focuses on the populational study of the most common species of *Sphagnum* L in Portugal – the *S. subsecundum* Nees complex – and on the genetic diversity of two controversial morphospecies *Platyhypnidium lusitanicum* (Schimp.) Ochyra & Bednarek-Ochyra e *P. riparioides* (Hedw.) Dixon using ISSR as genetic markers.

The obtained results show that the southernmost populations besides geographically isolated, are genetically differentiated, exposing the importance of conservation of these areas.

In the case of *Platyhypnidium*, these markers didn't segregate the two species in different groups, and was obtained high levels of infraspecific variation.

ÍNDICE

Agradecimentos	2
Resumo	3
Abstract	4
1. Introdução.....	7
1.1 <i>Sphagnum</i> L.....	8
1.1.2 Ecologia.....	9
1.1.3 Secção <i>Subsecunda</i> Lindb.....	9
1.1.4 O complexo de <i>Sphagnum subsecundum</i> Nees	10
1.1.5 Taxonomia e nomenclatura.....	12
1.2 <i>Platyhypnidium</i> M. Fleisch.....	13
1.2.1 Taxonomia e nomenclatura de <i>Platyhypnidium</i>	14
1.2.2 <i>Platyhypnidium riparioides</i> e <i>P. lusitanicum</i> (Schimp.) Ochyra & Bednarek-Ochyra	14
1.3 Utilização de marcadores moleculares em estudos populacionais e filogenéticos de briófitas.....	17
1.3.1 Marcadores ISSR.....	17
1.4 Objectivos.....	19
2. Material e métodos	20
2.1 Material vegetal	20
2.2 Extracção de DNA.....	21
2.3 Reacção de amplificação	23
2.4 Electroforese em gel de poliacrilamida.....	25
2.5 Análise dos dados	25
3. Resultados.....	28
3.1 Diversidade genética de populações do complexo de <i>Sphagnum subsecundum</i>	28
3.1.1 Resultados do marcador 808	28
3.1.2 Resultados do marcador 873	29
3.1.3 Composição haplotípica das amostras quando agrupadas por região.....	30
3.1.3 Resultados de AMOVA	31
3.1.4 Resultados da AMOVA das amostras agrupadas por região geográfica	34
3.2 Diversidade genética de <i>Platyhypnidium lusitanicum</i> e <i>P. riparioides</i>	36
3.2.1 Resultados da análise fenética	38
3.2.2 Resultados de AMOVA	40
4. Discussão	42
4.1 <i>Sphagnum</i>	42
4.1.1 Diversidade genética de populações do complexo de <i>Sphagnum subsecundum</i>	42
4.1.2 Diferenciação de populações	42
4.1.3 Diferenciação de populações entre regiões geográficas.....	44

4.2 Diversidade genética de <i>Platyhypnidium riparioides</i> e <i>P. lusitanicum</i>	45
5. Conclusões.....	46
6. Bibliografia.....	47
6.1 Bibliografia consultada.....	47
6.2 Bibliografia secundária.....	53
Anexo I.....	57
Anexo II.....	61
Anexo III.....	64
Anexo IV.....	66

1. INTRODUÇÃO

A divisão Bryophyta inclui quatro subdivisões monofiléticas: Sphagnopsida (*Sphagnum* L., *Ambuchanania* Seppelt & H.A. Crum), Andreopsida (*Andreaea* Hedw., *Andreaeobryum* Steere & B.M. Murray), Takakiopsida (*Takakia* S. Hatt. & Inoue) e Bryopsida (865 géneros).

O estudo filogenético das briófitas a nível específico e da sistemática molecular é, em muitos casos, limitado pela baixa variabilidade dos marcadores moleculares usados correntemente ou por dificuldades técnicas do uso de marcadores mais variáveis.

As espécies de briófitas têm geralmente áreas de distribuição muito alargadas, ocorrendo frequentemente em vários continentes. Por vezes, as mais comuns albergam vários taxa infraespecíficos que ou são reconhecidos como sendo unidades evolutivas distintas ou como modificações induzidas por variações de diversos parâmetros ambientais (Cronberg 2004). Contudo, com a crescente aplicação de métodos moleculares tem-se descoberto a existência de várias espécies crípticas e, já que apenas uma minoria de espécies de briófitas foi estudada, é de esperar que o número de espécies crípticas venha a aumentar (Shaw 2001). Torna-se assim importante investigar o fundo genético das espécies que são definidas por caracteres morfológicos (Cronberg 2004).

Vários conceitos de espécie e de população de briófitas têm sido utilizados nos últimos anos. A maioria dos taxonomistas usa uma abordagem baseada em padrões de morfologia, definindo espécies como grupos de indivíduos que formam agregados com alguns caracteres morfológicos distintos. Outros baseiam o seu conceito de espécie em pressupostos de funcionamento das forças evolutivas (Stenøien 2002).

Em ecologia, as populações são definidas como conjuntos de indivíduos da mesma espécie que ocorrem na mesma área no mesmo intervalo de tempo e ocupam o mesmo nicho ecológico. Uma população pode ser vista como uma linhagem evolutiva mais ou menos distinta, ou seja, um agregado de indivíduos ou genes no qual novas variantes genéticas podem surgir, dispersar-se e, eventualmente, substituir outras. Forças evolutivas como o fluxo génico, mutação, deriva genética e selecção são factores que influenciam a probabilidade de fixação de um alelo numa população. Em organismos essencialmente clonais, os cruzamentos devem ter apenas um papel coesivo limitado e as características distintivas das linhagens evolutivas são determinadas por selecção, mutação e deriva genética, para além do fluxo genético entre as populações (Stenøien 2002).

1.1 *Sphagnum* L.

Uma das ordens da divisão Bryophyta é a das Sphagnales, que inclui apenas uma família SPHAGNACEAE e esta dois géneros *Sphagnum* L. e *Ambuchanania* Seppelt & Crum. No género *Sphagnum* estão incluídas cerca de 250-450 espécies (Shaw 2000a), que têm preferencialmente uma distribuição ártica-boreal, com componentes tropicais no hemisfério Sul (Séneca 1999).

As plantas do género *Sphagnum* apresentam uma morfologia e anatomia distintas das restantes briófitas: ramos dispostos em fascículos e a presença de um capítulo mais ou menos bem definido ou um agregado de ramos jovens no ápice do gametófito (Figura 1). Uma das características mais marcadas deste género é a diferenciação de clorocistos e de hialocistos nas folhas. Os hialocistos são células mortas na maturidade, por vezes porosas, e fibriladas. Os clorocistos são células vivas, clorofilinas, não porosas e estreitas, dispostas numa malha que envolve os hialocistos (Figura 1). A diferenciação destes dois tipos celulares envolve padrões complexos de divisões celulares durante a ontogenia da folha (Shaw 2000a).

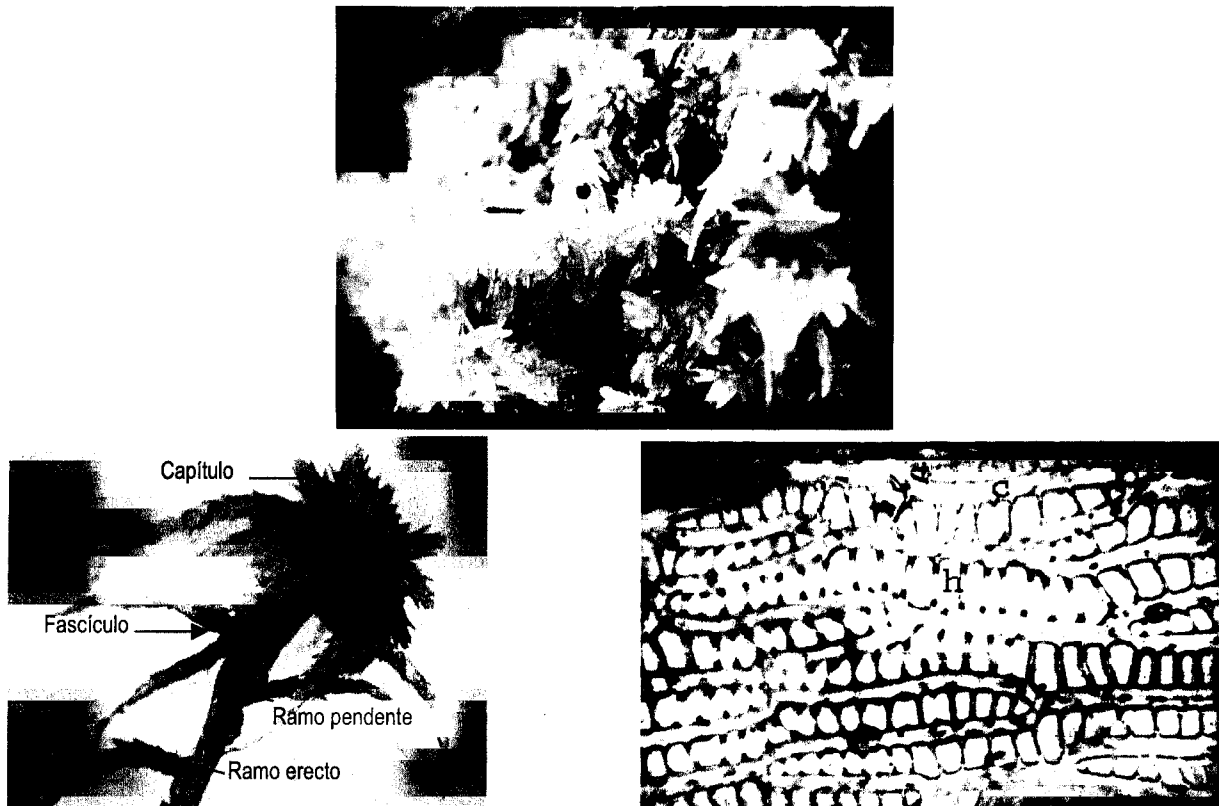


Figura 1. Em cima, plantas de *Sphagnum* sp. com cápsulas. À esquerda, morfologia de *Sphagnum* sp.¹. Malha de células hialinas mortas (h), rodeadas por estreitas células clorofilinas (c) nas folhas de *Sphagnum*, à direita.².

As espécies de *Sphagnum* apresentam grande plasticidade morfológica, que se pensa ser o resultado de: adaptações a condições ambientais locais ou diferenças genotípicas. Qualquer que seja a origem desta

¹ Imagem disponível em <http://www.bioimages.org.uk>. Copyright Malcolm Storey.

² Imagem disponibilizada pela Doutora Ana Séneca.

variabilidade, ela acarreta dificuldades na delimitação das espécies, sendo até considerado por Shaw (2000a) que a taxonomia a nível de espécie deste género é uma das mais controversas nas briófitas.

1.1.2 Ecologia

As comunidades em que os esfagnos predominam são denominadas turfeiras, dados os factores ambientais peculiares e também a morfologia e tipo de crescimento que caracterizam estes habitats e estas briófitas (Séneca 1999).

Na Península Ibérica, os esfagnos não são tão abundantes nem cobrem áreas tão extensas como nos países do Norte e Centro da Europa, de clima marcadamente atlântico ou boreal, nem onde a topografia permite drenagens muito lentas de águas superficiais e/ou subterrâneas e as condições climáticas favorecem taxas de evapotranspiração baixas. Ainda assim, são elementos relativamente habituais na área cantábrico-atlântica, no Noroeste de Portugal e nalgumas ilhas dos Açores (Séneca 1999). No interior peninsular e áreas mediterrânicas, refugiam-se em áreas montanhosas e/ou mais húmidas. Crescem sobre substratos siliciosos e ácidos. As verdadeiras turfeiras são raras na Península Ibérica (Brugués *et al.* 2004). O mais comum é encontrar estas plantas em pequenas zonas húmidas ou inundadas com depósito reduzido de turfa, como nascentes e depressões encharcadas, urzais e pastagens muito húmidas e higroturfosas, taludes ácidos ressumantes, rochedos siliciosos orientados a Norte, bacias lacustres colmatadas ou encharcamentos nos bordos das lagoas ou regatos de montanha.

A importância ecológica de *Sphagnum* nos ecossistemas está relacionada com a capacidade de diminuir a taxa de decomposição, por contribuir activamente para a acidificação do meio em condições anaeróbias, e acumular grandes quantidades de água nos seus hialocistos, com o que contribui activamente para a regulação dos recursos hídricos locais. Numa determinada extensão é uma planta que, pelo tipo de alterações que induz no meio envolvente, regula a presença de outros organismos, competindo com sucesso com a maioria das plantas, incluindo plantas superiores. As espécies de *Sphagnum* são extremamente sensíveis a alterações de determinados parâmetros químicos e físicos, sendo, por isso, bons bioindicadores (Vitt 1997 *in* Séneca, 1999).

Estas plantas são únicas em numerosos aspectos da morfologia dos esporófito e gametófito. São também os únicos musgos com valor económico directo e substancial. Do ponto de vista ecológico são bastante importantes já que as turfeiras constituem importantes reservas globais de carbono, influenciando também fluxos de gases que regulam parâmetros climáticos globais, reciclagem de nutrientes, padrões regionais de hidrologia e biodiversidade. As características que os tornam economicamente úteis e ecologicamente importantes estão directamente relacionadas com as características físicas e químicas que apresentam (Shaw *et al.* 2003).

1.1.3 Secção *Subsecunda* Lindb.

Sphagnum é um dos géneros mais diverso de Bryophyta, contudo o número total de espécies é desconhecido (por exemplo, 200 espécies segundo Crum 2001, já Clymo & Hayward 1982 – *in* Sundberg 2000 – apontam 300), uma vez que a taxonomia específica e infraespecífica é uma das mais controversas nos musgos. Como em muitos

outros géneros de plantas ricos em espécies, algumas espécies de *Sphagnum* são morfologicamente distintas enquanto que outras pertencem a complexos de morfótipos com formas intermédias, contudo distinguíveis. Grande parte da controvérsia centra-se nestes complexos, porque alguns taxonomistas reconhecem apenas um taxon e outros vários (Shaw et al 2005). Estes complexos ocorrem nas quatro maiores secções do género: *Acutifolia* Wils. (McQueen 1989; Cronberg 1996), *Cuspidata* Lindb. (Såstad 1998), *Sphagnum* L. (Flatberg 1986) e *Subsecunda* Lindb. (Krzakowa & Melosik 2000).

As espécies da secção *Subsecunda* são caracterizadas por terem hialoderme do eixo principal e ramos sem células fibriladas, folhas dos ramos com poros dispostos em rosário ao longo das margens das células hialinas e clorocistos lenticulares, em secção transversal, mais ou menos igualmente expostos nas superfícies adaxial e abaxial. A secção inclui um enorme espectro de variação morfológica, provavelmente mais do que qualquer outra. Espécies morfológicamente muito diferentes e tradicionalmente colocadas noutras secções ou mesmo géneros (e.g., *S. macrophyllum* Bernh. ex Brid. incluída na secção *Isocladus*, *S. pylaesii* Brid. na secção *Hemitheca*), em estudos filogenéticos foram incluídas nesta secção (Shaw 2000 e Shaw et al. 2004). Estas espécies incluem formas sem poros, sem ramos e/ou sem fibras, com marcada isofilia, não apresentando, de forma marcada, três das características diagnósticas do género *Sphagnum*.

A taxonomia específica dentro desta secção é especialmente problemática dado que é a mais rica em espécies (Eddy 1977, 1985) e a morfologia do gametófito apresenta grande plasticidade em resposta a diferentes condições do habitat (Goosens & De Sloover 1981; Flatberg 1985). As espécies distinguem-se pelo número de ramos /fascículo, tamanho, forma, anatomia, fibrilação e porosidade das folhas do caule e do ramo (Hill 1975; Eddy 1977; Crum 1984; Daniels & Eddy, 1985, Flatberg, 1985, Melosik 2000).

1.1.4 O complexo de *Sphagnum subsecundum* Nees

A secção *Subsecunda* inclui, no Hemisfério Norte, um grupo de espécies próximas de *Sphagnum subsecundum* Nees, que se distingue das restantes espécies desta secção por apresentarem caules unicorticados (com apenas uma camada de células hialinas no córtex). O complexo de *S. subsecundum* inclui *taxa* que têm sido distinguidos como espécies (Russow, 1894; Flatberg, 1985; Melosik, 2000), subespécies (Daniels and Eddy, 1985; Eddy, 1977) ou variedades (Rahman, 1972; Hill, 1975; Crum 1984). Os *taxa* deste complexo são comuns na América do Norte, Europa e Ásia. Têm um habitat distinto quando comparados com outros esfagnos, aparecendo frequentemente em locais higroturfosos e minerotróficos, em vez de turfeiras ombrotólicas.

As relações sistemáticas entre os *taxa* deste complexo são controversas dadas a plasticidade morfológica, ampla área de distribuição, ocorrendo frequentemente em vários continentes, e a ausência de informação sobre os padrões e processos genéticos das populações. Alguns dos caracteres morfológicos diagnósticos (como a forma e tamanho das folhas dos ramos e caulinares, número de ramos por fascículo, nº de folhas por ramo, localização dos poros e fibrilação das folhas caulinares) parecem ser consistentes nalgumas regiões da sua área de distribuição, enquanto que noutras ocorrem formas de estados intermédios, acarretando grandes dificuldades sistemáticas.

Em Portugal, sendo o grupo de esfagnos mais comum e dado que a sua área de distribuição se estende por regiões com características climáticas/topográficas muito diversas, a delimitação do grupo é particularmente difícil. Existe um sem número de formas intermédias difíceis de incluir nos taxa de acordo com a globalidade dos caracteres diagnóstico descritos (Séneca 1999, 2003). Existem ainda descrições de formas que parecem relacionadas com tipos diferentes de habitats e que se intergradam de modo complexo de acordo com variações dos diferentes parâmetros que caracterizam os seus nichos ecológicos.

As plantas pertencentes a *S. subsecundum* Nees. ssp. *subsecundum* são pequenas e delicadas, formam tufos mais ou menos laxos acima do nível da água, raramente aparecendo submersas (Brugués *et al.* 2004), em lugares encharcados ou simplesmente húmidos.

As plantas de *S. subsecundum* Nees ssp. *inundatum* (Russ.) Eddy são de tamanho médio, por vezes robustas, ocupam o mesmo tipo de habitat, podendo, contudo, aparecer em locais menos encharcados e frequentemente ensombrados (Séneca 1999, 2003).

Os exemplares de *S. auriculatum* Schimp são variáveis em termos de robustez do hábito, formam tufos mais ou menos laxos, vulgarmente grandes e de cor variável. São plantas higrófilas, raramente hidrófilas, abundantes sobretudo a baixas altitudes onde formam tufos ou tapetes nas margens de lagoachos, ribeiros ou em locais periodicamente encharcados (Séneca 1999, 2003). É a espécie mais abundante do género na Península Ibérica e a menos exigente relativamente às condições ambientais (Séneca 1999). Cresce em todo o tipo de lugares higróturfosos, desde verdadeiras turfeiras a encharcamentos no bordo de lagoas ou cursos de água (Brugués *et al.* 2004). Estas plantas são extremamente polimórficas, podendo ser delicadas ou muito curtas, consoante o grau de exposição e no caso de serem plantas pioneiras sobre solos turfosos.

Foram descritas várias formas desta espécie, entre as quais *S. auriculatum* Schimp f. *crassicladum* Warnst. e *S. auriculatum* Schimp f. *obesum* Warnst. (Warnstorf, 1911, descreveu dezenas que no presente não são mais consideradas como tal, mas apenas morfótipos). As plantas de *S. auriculatum* f. *crassicladum* incluem plantas robustas ou não, formando tufos muito laxos de plantas pouco rígidas, com folhas dos ramos raramente porosas ou aporosas na face dorsal e porosidade maior na ventral. A *S. auriculatum* f. *obesum* pertencem plantas cujas folhas dos ramos, são em média de maior dimensão que as da forma anterior, não possuem poros ou possuem poros raros em ambas as faces. Não se conhecem em Portugal exemplares férteis destas duas formas. São plantas hidrófilas ou submersas, crescendo no mesmo tipo de habitat que as do taxon anterior (Séneca 1999, 2003).

Este grupo de taxa tem sofrido diversos tratamentos taxonómicos que se traduzem num elevado número de nomes e sinónimos publicados (Warnstorf 1911, Andrews 1913, Åberg 1937, Andrews 1959, Isoviita 1966, Crum 1984 – in Shaw *et al.* 2005). Em geral todos os autores concordam que *S. subsecundum* tal como está definido raramente apresenta problemas de identificação. *S. auriculatum* é considerado como sendo o taxon mais variável do grupo e é particularmente influenciado na forma e na estrutura pelas condições ambientais, das quais se destaca submersão sazonal e dessecação. As formas *S. auriculatum* f. *obesum* e *S. auriculatum* f. *crassicladum* parecem relacionar-se com a influência que estes factores exercem na morfologia. *S. auriculatum* pode ainda confundir-se, nalguns casos, com *S. subsecundum* ssp. *inundatum*. Este taxon é muito problemático, foi já considerado como espécie independente (Russow 1894, Casares Gil 1925, Flatberg 1994, Krzakowa & Melosik 2000) como taxon infraespecífico subordinado tanto a *S. auriculatum* (Hill 1978) como a *S. subsecundum* (Nyholm 1969, Daniel & Eddy

1985). A proximidade a estas espécies parece depender dos caracteres analisados. Resultados obtidos por Krzakowa & Melosik (2000) não são conclusivos, sendo, por isso, mantida como espécie independente. Alguns dos sistemas enzimáticos analisados aproximam-no de *S. subsecundum* enquanto que outros, assim como determinados padrões fenólicos analisados o relacionam mais estreitamente com *S. auriculatum*, o que demonstra que as suas afinidades taxonómicas estão longe de estar estabelecidas, tal como estão por definir quais os caracteres que discriminam os taxa. Daniels & Eddy (1985) indicam que muito desta plasticidade pode dever-se a variabilidade genética, mas que a sua detecção é obscurecida por respostas induzidas por factores ambientais.

1.1.5 Taxonomia e nomenclatura

Sphagnum denticulatum Brid. é o nome mais antigo para *S. auriculatum* (Dirkse & Isoviita 1986, Duell 1992, in Séneca 2003). Contudo, neste trabalho optou-se por utilizar o segundo, uma vez que na revisão do tipo de *S. denticulatum*, Wanstorf (1911) incluiu-o em *S. obesum* Warnst., confirmando a natureza aglomerativa do nome *S. denticulatum*, que não permite a distinção entre as formas de *S. auriculatum* (Séneca 1999, 2003).

Corley et al (1981), Corley & Crundwell (1992) e Duell (1985) (in Séneca 1999, 2003) apontam como nome correcto para *S. auriculatum*, *S. lescurii* Sull. Contudo, *S. lescurii* foi descrito para a América do Norte, mas ainda hoje é duvidosa a sua existência na Europa (Dirkse & Isoviita 1986 in Séneca 1999, 2003) e estando ainda por investigar as suas afinidades com o material europeu (Séneca 1999, 2003). Além disso, este nome de tão aglomerativo que é reduz a sinónimos os taxa *S. subsecundum* ssp. *inundatum* e *S. auriculatum*, assim, as afinidades e diferenças entre estes taxa no complexo de de *S. subsecundum* não são tidas em consideração quando *S. lescurii* é utilizado (Séneca 1999, 2003).

As afinidades entre *S. inundatum* Russ., *S. auriculatum* e *S. subsecundum* têm sido objecto de inúmeros trabalhos com diferentes abordagens. Que *S. subsecundum* parece ser uma espécie bem individualizada das restantes é consensual, o mesmo não acontecendo com *S. auriculatum* e *S. inundatum* tratados ora como variedades do primeiro (Rahman, 1972), ora fazendo *S. inundatum* uma variedade de *S. auriculatum* ou considerando *S. inundatum* como subespécie de *S. subsecundum* (Eddy, 1977; Daniels & Eddy, 1985). A inexistência de registos de colónias mistas, parecem indicar que *S. auriculatum* é uma espécie geneticamente diferente, apesar de morfológicamente semelhante a *S. inundatum*. A distinção faz-se através de um conjunto de caracteres que, nalgumas regiões da sua área de distribuição, parecem consistentes enquanto que noutras alguns dos caracteres considerados como distintivos aparecem em estados intermédios, produzindo formas de delimitação difícil (Séneca 1999, 2003).

1.2 *Platyhypnidium* M. Fleisch

Os musgos pleurocárpicos incluem cerca de 5000 espécies, aproximadamente 50% de todos os musgos (Buck & Goffinet 2000). São bastante diversos nas florestas tropicais, apesar de também estarem bem representados nas regiões temperadas dos Hemisférios Norte e Sul (Shaw & Renzaglia 2004). Correspondem ao ramo mais recente da evolução dos musgos (Vitt 1984; Capesius & Stech 1998, Vanderpoorten *et al.* 2002), formando um grupo monofilético que evoluiu a partir de ancestrais acrocárpicos (De Luna *et al.* 2000; Newton *et al.*, 2000; Goffinet *et al.* 2001; Cox *et al.* 2004).

As espécies de musgos pleurocárpicos podem ser distinguidas pela posição das estruturas reprodutivas femininas. Os esporófitos desenvolvem-se em ramos laterais reduzidos, enquanto que na maior parte dos outros musgos crescem no ápice de ramos terminando assim o crescimento apical (La Farge-England 1996).

Tradicionalmente a classificação nos musgos tem-se baseado em poucos caracteres num contexto de falta de informação relativamente à evolução morfológica. Consequentemente, a relevância taxonómica de muitos destes caracteres tem sido questionada por dados moleculares recentes (Buck & Goffinet, 2000). O problema é ainda mais agudo em muitos musgos pleurocárpicos aquáticos, dado que partilham muitas características do esporófito do ancestral terrestre (Vitt 1981 *in* Vanderpoorten & Jacquemart 2004) e, portanto, a classificação é feita baseando-se em caracteres do gametófito, que é especialmente propenso a fenómenos de convergência e plasticidade (Vitt & Glime 1984; Hedenäs 1996 *in* Vanderpoorten & Jacquemart 2004).

A família BRACHYTECIACEAE é uma das maiores famílias de musgos pleurocárpicos, inclui cerca de 250 a 350 espécies e 41 géneros (Ignatov & Huttunen 2002) e é considerada um desafio taxonómico. A maioria das espécies cresce em habitats florestais, rochas, taludes, madeira em decomposição e solo, mas há também espécies epífitas e aquáticas. Apesar das inúmeras dificuldades em circunscrever esta família, é actualmente considerada uma das mais bem definidas dentro do grupo dos musgos pleurocárpicos (Hedenäs 1989, 1992; Ignatov 1998, 1999). A definição dos géneros, contudo, permanece controversa, devido a uma considerável variabilidade morfológica, provavelmente sujeita a fenómenos de homoplasia (Huttunen & Ignatov 2004). Ao longo de todo o século XX, foram efectuadas várias tentativas de melhorar a classificação genérica. Os géneros com maior número de espécies *Brachythecium* Schimp., *Rhynchostegium* Bruch & Schimp., *Rhynchostegiella* (Schimp.) Limpr. e *Eurhynchium* Bruch & Schimp. foram considerados bastante heterogéneos, e, por isso, divididos em secções (Kindberg 1897) ou separados em géneros mais pequenos (*eg.* Warnstorf 1905, Fleischer 1923, Grout 1928, Robinson 1962, 1967, 1987). Simultaneamente, o conhecimento de musgos tropicais até há pouco desconhecidos, fez aumentar o número de espécies e géneros nesta família, passando dos 20 géneros reconhecidos por Brotherrus (1925) para 34 por Vitt (1984).

Em 1923, Fleischer descreveu o género *Platyhypnidium* como um desenvolvimento da ideia de Loeske (1911) de colocar musgos pleurocárpicos aquáticos robustos de folhas grandes ou largas num género diferente, *Platyhypnum*. Contudo, este nome era ilegítimo dado que *Platyhypnum* Hampe já existia como nome válido. Fleischer

sugeriu então *Platyhypnidium* M. Fleisch.. Desde então, o número de espécies descritas no género foi variando consoante os diferentes tratamentos taxonómicos a este nível (Ignatov *et al.* 1999).

1.2.1 Taxonomia e nomenclatura de *Platyhypnidium*

O género *Platyhypnidium* é caracterizado por incluir plantas aquáticas, pouco ramificadas, com folhas muito largas com ápices obtusos ou agudos. Foi reconhecido em 1923, não tendo, contudo, sido unanimemente aceite e, por isso, algumas espécies têm sido colocadas nos géneros *Eurhynchium* ou *Rhynchostegium*. Contudo, recorrendo a marcadores moleculares, verificou-se que *P. riparioides* (Hedw.) Dixon é diferente de *Eurhynchium* e de *Rhynchostegium* (Stech & Frahm 1999), apesar de Huttunen & Ignatov (2004) sugerirem que *Platyhypnidium* é um género polifilético. As três espécies incluídas na análise, *P. riparioides*, *P. austrinum* (Hook. f. & Wilson) M. Fleisch. e *P. patulifolium* (Cardot & Thér.) Broth., nunca formaram um grupo monofilético. *P. riparioides* em todas árvores filogenéticas elaboradas parece estar mais próximo do grupo das espécies de *Rhynchostegium*. Contudo, a falta de dados de um dos marcadores moleculares utilizado no estudo e o facto de apenas um espécime ter sido amostrado pode ter interferido com estes resultados (Huttunen & Ignatov, 2004).

Estes três géneros formam um complexo que necessita de um cuidadoso estudo a nível mundial. *Platyhypnidium* parece ocupar uma posição intermédia entre os outros dois (Ochyra & Bednarek-Ochyra 1999). Difere anatomicamente de *Eurhynchium* nas células apicais curtas, restritas a uma pequena banda marginal em vez de uma área grande para além do ápice da nervura, e de *Rhynchostegium* por apresentar ápice da folha plano e não torcido.

1.2.2 *Platyhypnidium riparioides* e *P. lusitanicum* (Schimp.) Ochyra & Bednarek-Ochyra

Platyhypnidium lusitanicum e *P. riparioides* são duas espécies estreitamente relacionadas, tendo a primeira sido considerada uma variedade da segunda durante bastante tempo. Na Europa, são por vezes indistinguíveis dado que há várias formas intermédias, resultado de plasticidade fenotípica induzida por factores ambientais.

P. lusitanicum foi descrito em 1846 por Schimper como *Hypnum lusitanicum* Schimp. baseado num espécime do norte montanhoso e ácido de Portugal, colhido por Welwitsch. Foi submetido *a posteriori* a vários tratamentos nomenclaturais e taxonómicos, tendo sido incluído em diferentes géneros (*Hygrohypnum* Lindb., *Eurhynchium* e *Rhynchostegium*). *R. alopecuroides* (Brid.) A. J. E. Smith surgiu depois de se ter verificado que *Hypnum lusitanicum* Schimp era sinónimo de *Hypnum rusciforme* Weiss ex Brid. var. *alopecuroides* Brid. e que o restritivo específico *lusitanicum* já existia (Smith 1981). Para alguns briólogos *P. lusitanicum* é apenas mais uma variedade de *P. riparioides*, enquanto que outros discutem a possibilidade de todos os espécimes portugueses serem *P. lusitanicum*. A *P. riparioides* foram descritos muitos taxa infraespecíficos (Podpěra 1954 listou 23 variedades e formas) que necessitam de uma cuidadosa tipificação. Todos os dados indicam que este problema necessita de um estudo sistemático bastante extenso. *P. riparioides* é muito plástico e pode ser facilmente modificado, como indica o caso de *P. mutatum* ou *P. torrenticola* (Ochyra, pers. Com DATA.) As variações morfológicas podem estar relacionadas com

condições do microhabitat, como a qualidade e composição química da água. Num estudo de acumulação de metais pesados em populações de *P. riparioides* tornou-se evidente que esta espécie exibe uma grande plasticidade morfológica relacionada com diferentes tipos de habitat (Wehr & Whitton 1986). Correlações com variáveis ambientais mostraram que as plantas são significativamente menos robustas, com as folhas mais pequenas e com denticulação menos pronunciada quando colhidas em águas ricas em nutrientes. (Wehr & Whitton 1986).

1.2.2.1 Ecologia e descrição de *P. riparioides* e *P. lusitanicum*

Segundo Machado (1931), *Platyhypnidium rusciforme* (Neck.) Fleisch. (= *P. riparioides*) é uma planta extremamente polimorfa, com várias variedades, das quais a mais abundante no Norte do país seria a *P. rusciforme* var. *lusitanicum* (Schimp.) Mach..

Machado (1931). descreve *P. rusciforme* (Neck.) Fleisch como englobando plantas monóicas, frequentes em todo o país que cresce sobre pedras inundadas, e forma tufos *extensos*, \pm rígidos, laxos, verde-escuros, enegrecidos na base, com caules alongados, de 3-15 cm, prostrados ou pendentes, negros e desnudados na base, irregularmente ramificados, ramos erectos, arqueados, ou compridos e paralelos aos caules. As folhas são pendentes ou imbricadas, largamente ovadas, brevemente acuminadas, côncavas, de bordos planos, serrilhadas em toda a volta. A nervura é robusta, atingindo ou excedendo $\frac{3}{4}$ comprimento do limbo, as células das folhas no ápice são lineares-flexuosas, e na base mais largas, elípticas, sem aurículas distintas. No esporófito a seda é flexuosa de 4-6 mm, cápsula subhorizontal, ovado-oblonga, subarqueada com opérculo longamente rostrado, peristoma duplo.



Figura 2. *Platyhypnidium riparioides* (tufo).

P. lusitanicum é um taxon que circunscreve plantas que crescem em tufos densos, deprimidos, fortemente aderentes ao suporte, acastanhados ou oliváceos, com frequência manchados de púrpura. Os ramos são fasciculados, por vezes contorcidos, juláceos e atenuados na extremidade. As folhas são densas, muito côncavas, agudas ou subobtusas e estreitamente imbricadas. É a forma mais abundante em quase todo o norte de Portugal continental, sobretudo nas regiões montanhosas. Durante algum tempo foi considerado endêmico da Península Ibérica, mas há registos de França, Alemanha e Inglaterra. É um taxon de características atlânticas, que, na

Península Ibérica, parece preferir zonas montanhosas costeiras, sujeitas a ventos oceânicos moderados. No interior da península ocorre associado a florestas de *Prunus lusitanica* L. subsp. *lusitanica* ou *Alnus glutinosa* (L.) Gaertner. Estas florestas húmidas, ricas em elementos de Laurissilva pouco sujeitas a grandes variações da temperatura, apresentam as condições ambientais favoráveis à ocorrência de elementos atlânticos (Lara *et al.* 1994).

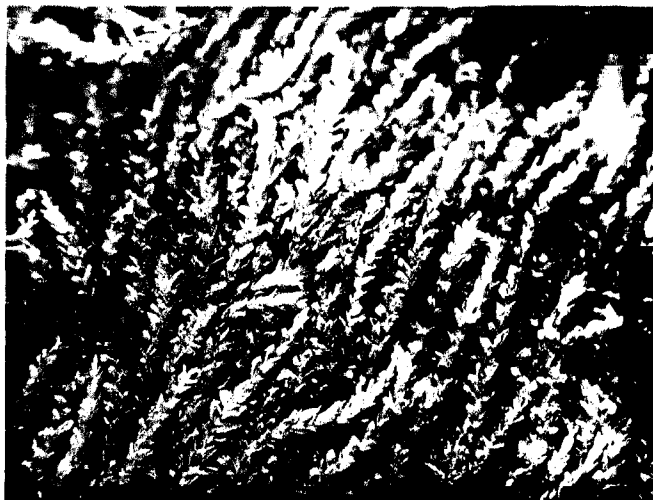


Figura 3. *Platyhypnidium lusitanicum* (tufo), colhido por Machado (PO) nº 1916.

A variação fenotípica nos musgos aquáticos é bem conhecida e atribuída fundamentalmente a influências ambientais directas (Vanderpoorten & Jacquemart 2004, Wher & Whitton 1986). A individualização de factores genéticos e não-genéticos subjacentes à variabilidade morfológica é frequentemente abordada recorrendo a experiências de cultivo. Em taxonomia, é axiomático que “bons” caracteres reflectem diferenças genéticas dos organismos (Vanderpoorten & Jacquemart 2004, Wher & Whitton 1986). Contudo, em Portugal Continental ocorrem um conjunto de formas intermédias entre as duas espécies, tornando a sua correcta identificação uma tarefa árdua, dado que não há estudos da influência de factores ecológicos no fenotipo destes *taxa*.

1.3 Utilização de marcadores moleculares em estudos populacionais e filogenéticos de briófitas

As relações entre as três linhagens das briófitas – Marchantiophyta; Anthoceroophyta; Bryophyta – continua como sendo uma das questões ainda não resolvidas da biologia da evolução das plantas (Goffinet 2000). As três linhagens são consideradas três clades monofiléticos, mas praticamente todas as hipóteses de relação entre estes foram já publicadas (exemplos em Goffinet 2000). Os resultados variam de acordo com os marcadores utilizados – por exemplo 18S, psbA, rbcL, 19S, psbD, rpoC2, psaA, 26S, 5S – e com os caracteres morfológicos analisados.

As relações filogenéticas de famílias de briófitas têm sido estudadas recorrendo principalmente à sequenciação de DNA, os marcadores mais utilizados são – nucleares 26S, ITS, cloroplastidiais *rps4*, *trnL-trnF*, e mitocondriais *nad4*. A variabilidade destes varia de família para família e, portanto, varia também a sua aplicabilidade. São bastante versáteis, uma vez que para além das zonas codificantes têm espaçadores intergênicos ou intrões, o que permite utilizá-los para resolver relações sistemáticas a diferentes níveis (revisão em Shaw & Renzaglia 2004).

Nos estudos de filogeografia a nível específico, infraespecífico ou em estudos populacionais os marcadores mais usados são isoenzimas, RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), microssatélites e sequências de DNA (nomeadamente ITS e *trnL-trnF*) (revisão em Shaw 2001). Os estudos populacionais são contudo muitas vezes travadas pelos baixos níveis de variação molecular destes marcadores em estudos infraespecíficos de briófitas (Vanderpoorten *et al.* 2003). Até à data publicado há apenas microssatélites desenvolvidos para *Polytrichum formosum* Hedw. que permitiram responder a questões ao nível populacional, quando isoenzimas testadas não apresentavam o nível de polimorfismo apropriado (van der Velde *et al.* 2001).

1.3.1 Marcadores ISSR

Os microssatélites são uma classe de sequências repetitivas de DNA presentes em todos os organismos, quer eucarióticos (Morgante *et al.* 2002) quer procarióticos (Gur-Arie *et al.* 2000). São arranjos repetidos de vários nucleotídeos, geralmente 2-6, distribuídos pelo genoma (apesar da distribuição variar de acordo com a espécie e o cromossoma) e são flanqueados por sequências conservadas (Chambers *et al.* 2000). Apesar de estarem presentes em zonas codificantes e não-codificantes, a sua frequência é mais elevada em regiões transcritas, especialmente UTR (Untranslated regions) (Morgante *et al.* 2002; Hongtrakul *et al.* 1998; Panaud *et al.* 1995).

As características particulares dos microssatélites, como a presença em todos organismos vivos, elevado nível de variação alélica, co-dominância e a facilidade de análise, transformam-nos em ótimas ferramentas de estudo para genotipagem e mapeação (Trojanowska & Bolibok 2004).

ISSR – Intersimple Sequence Repeats - são semelhantes a RAPD (Williams *et al.* 1990) uma vez que apenas se usa um primer na reacção de PCR (Polimerase Chain Reaction), contudo este primer não é aleatório mas sim desenhado para emparelhar com sequências de microssatélites.

Os marcadores ISSRs consistem em sequências repetitivas de 2, 3 ou 4 motivos, aos quais se adiciona uma base azotada diferente a 5' ou 3', para tornar o local de emparelhamento mais específico e reprodutível (há também

primers ISSR sem esta base). Obtém-se habitualmente como resultado de cada reacção de PCR, 25 a 50 produtos, que consistem em loci anónimos de SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Nybom 2004).

Se dois microssatélites se encontram perto um do outro no genoma em orientações opostas, o primer ISSR amplifica a região entre eles, e inserções ou deleções nesta região ou a perda ou ganho serão detectadas como polimorfismos de bandas (Yang *et al.* 1996).

Os dados obtidos com esta técnica produzem, presumivelmente, uma imagem aleatória de todo o genoma. Esta técnica, introduzida por Gupta *et al.* (1994) e Zietkiewicz *et al.* (1994), é bastante utilizada no estudo de cultivares e de variedades de plantas, tendo apenas recentemente adoptada para estudo de genética populacional ou de taxonomia (Wolfe and Liston 1998). Werner *et al.* (2003) é o primeiro trabalho publicado em que se esta técnica é aplicada à genética populacional de musgos.

Considera-se que é preferível usar marcadores *mapped* como RFLPs, CAPS, SSRs em vez de marcadores *unmapped*, uma vez que se podem escolher os loci adequados ao estudo. No entanto, marcadores não mapeados, como ISSRs são amplamente usados em estudos de diversidade genética, com as seguintes vantagens: não é necessário ter informação prévia sobre o genoma, os custos de desenvolvimento são relativamente baixos e os procedimentos laboratoriais podem ser facilmente aplicados a várias espécies vegetais.

Em briófitas estes marcadores foram já utilizados para em estudos de genética populacional – *Sphagnum angermanicum* Melin (Gunnarsson *et al.* 2005), e em estudos de diferenciação genética entre espécies do género *Rhytidiadelphus* (Limpr.) Warnst. (Vanderpoorten *et al.* 2003), *Anacolia* Schimp. (Werner *et al.* 2003), *Weissia* Hedw. (Werner *et al.* 2004) e *Amblystegium* Schimp. (Vanderpoorten & Jacquemar 2004).

1.4 Objectivos

Pretendeu-se com este trabalho estudar a diversidade genética de populações do *S. subsecundum* agg em Portugal, nomeadamente compreender a relação entre elas.

Relativamente a *P. riparioides* e *P. lusitanicum* o objectivo era compreender qual a relação genética entre estes taxa e averiguar a possibilidade de associar um padrão genético a cada um.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

2.1.1 *Sphagnum*

Foram utilizadas plantas frescas e de herbário (PO) de *Sphagnum* pertencentes ao grupo dos unicorticados da secção *Subsecunda* que ocorrem em Portugal (os exemplares mais antigos datam de 1990), de 25 populações, um total de 59 amostras (nº total de plantas), distribuídas de forma desigual pelas populações (Anexo I). Foi colhido material de diversos locais do Gerês, da Serra de Argã, Serra de Montemuro, Serra de São Mamede, Valongo, Serra da Freita, Serra da Lousã, Serra da Estrela. Todo o material colhido foi referenciado com as coordenadas UTM (1x1 km) do local. Em cada local de amostragem avaliou-se o padrão de distribuição das plantas, a morfologia, a abundância e o micro-habitat de modo que todas as condições fossem amostradas. Foram recolhidas pelo menos cinco plantas em cada mochão, de mochões afastados 10 a 50 cm.

A determinação do *taxon* do material colhido foi feita de acordo com Daniels & Eddy (1985).

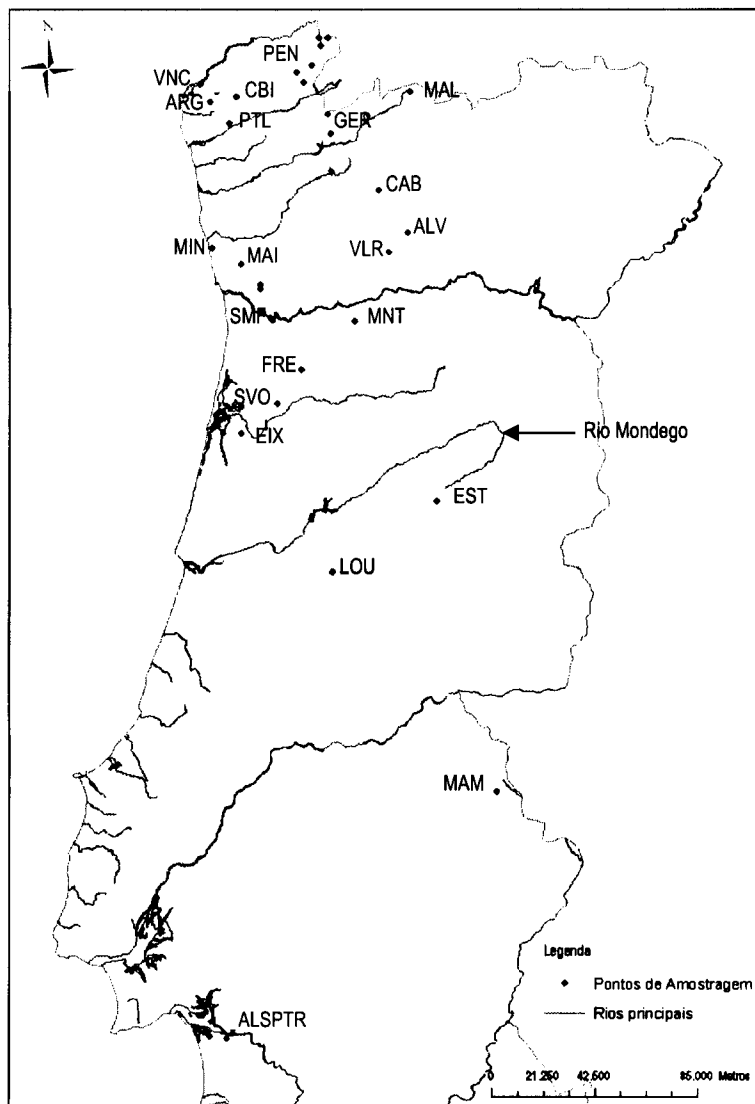


Figura 4. Mapa com a localização e códigos (ver Anexo I) das populações do complexo de *Sphagnum subsecundum* analisadas.

2.1.2 *Platyhypnidium*

Foi utilizado material de herbário de *P. riparioides* e *P. lusitanicum* de diversos locais do país, mas também da Alemanha, França, Inglaterra, Sérvia, Espanha, Finlândia, um total de 41 amostras, 16 de material identificado como *P. riparioides* e 25 *P. lusitanicum*, de acordo com o anexo II e com as figuras 5, 6 e 7.

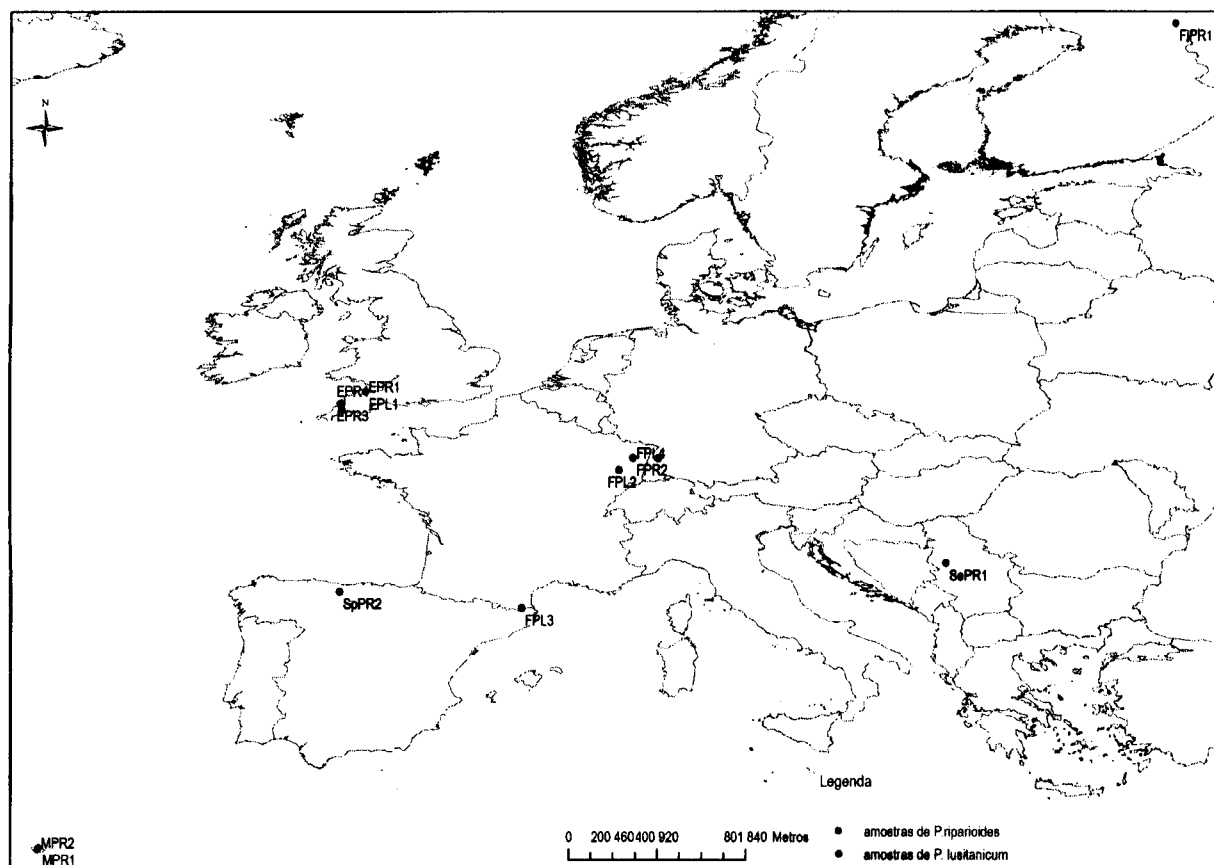


Figura 5. Mapa da Europa com a localização e códigos (ver Anexo II) das amostras analisadas de *Platyhypnidium riparioides* (a azul) e *P. lusitanicum* (a vermelho).

2.2 Extracção de DNA

O DNA total foi extraído a partir de um ou dois capítulos do gametófito de *Sphagnum* e de um ou dois ramos de *Platyhypnidium*, correspondente a tecidos jovens para maximizar a produtividade da extracção e a qualidade do DNA extraído. O DNA foi extraído utilizando um kit de extracção apropriado – NucleoSpin® Plant Kit (Macherey-Nagel) ou DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen) – tendo-se procedido de acordo com as instruções do fabricante.

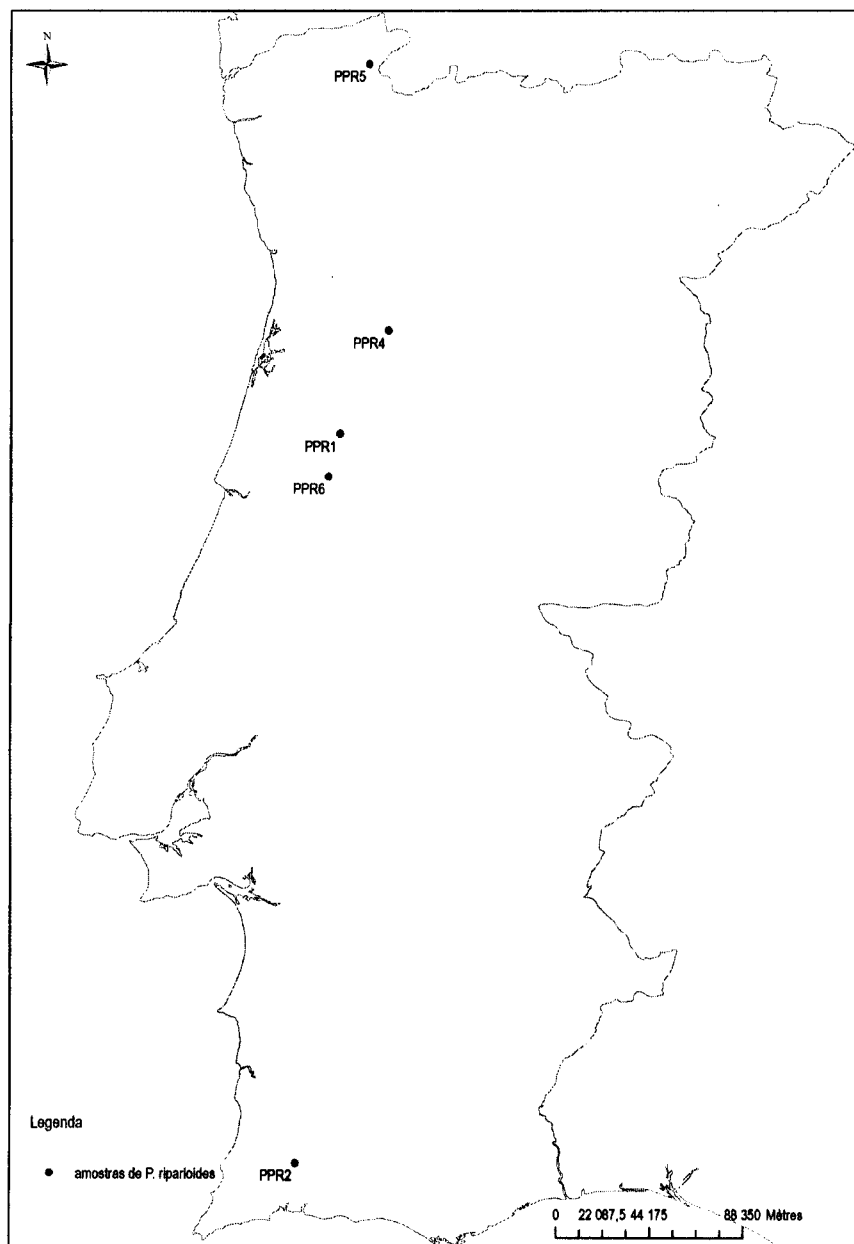


Figura 6. Mapa de Portugal Continental com a localização e códigos (ver Anexo II) das amostras analisadas de *Platyhypnidium riparioides*.

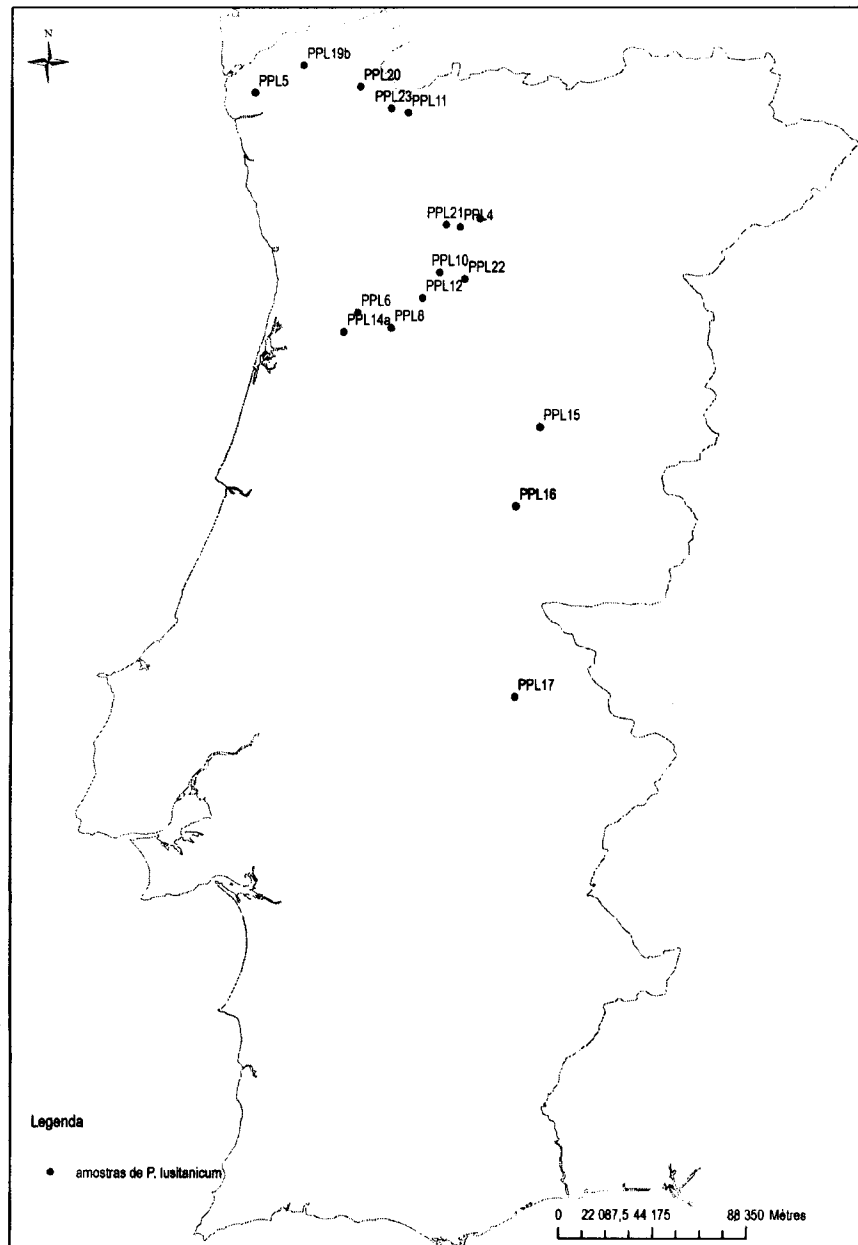


Figura 7. Mapa de Portugal Continental com a localização e códigos (ver Anexo II) das amostras analisadas de *Platyhypnidium lusitanicum*. As amostras PPL18 – Rio Douro – e PPL19 – Rio Vouga – não estão representadas por falta de informação sobre sua localização precisa na etiqueta de herbário.

2.3 Reacção de amplificação

As amplificações foram efectuadas utilizando tubos de PCR de 200 μ L num termociclador T3 Thermocycler da BiometraTM. As temperaturas de hibridação dos primers, escolhidas para o estabelecimento do programa de amplificação, foram determinadas com base na literatura (Gunnarsson *et al.* 2005, Hassel & Gunnarsson 2003, Werner *et al.* 2003, Werner *et al.* 2004, Vanderpoorten *et al.* 2003), com ligeiros ajustes adequados ao material e às condições laboratoriais.

2.3.1 Primers utilizados

Todos os *primers* utilizados foram já descritos e utilizados em briófitas (Tabela 3). Foi preparada uma solução de trabalho em água ultra pura a 10 μ M.

Tabela 3. Descrição dos *primers* utilizados.

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'13')
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
818	CAC ACA CAC ACA CAC AG
823	TCT CTC TCT CTC TCT CC
825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
840	GAG AGA GAG AGA GAG ACT
841	GAG AGA GAG AGA GAG ACC
853	ACA CAC ACA CAC ACA CTG
873	GAC AGA CAG ACA GAC A

2.3.2 Reacção

A composição básica das reacções preparadas para PCR está descrita na tabela 4.

No sentido de otimizar a reacção de PCR foram testados: diferentes concentrações de DNA-molde, temperaturas (desnaturação e emparelhamento) e duração dos ciclos. O DNA molde foi diluído 1:10.

Tabela 4. Resumo da composição básica das reacções de PCR com a enzima EcoTaq (Ecogen®) para um volume final de 20 μ L. * Ecogen™. **Fermentas™

Reagente	Concentração <i>stock</i>	Concentração final	Volume
Água ultra pura			Completar até 20 μ L
Tampão de Enzima*	10x	1x	2 μ L
Mistura de nucleotídeos**	10mM	0,1mM	0,2 μ L
<i>Primer</i>	10 μ M	0,5 μ M	1 μ L
MgCl ₂ *	50mM	2,5mM	1 μ L
BSA**	20mg/mL	0,25 μ M	0,25 μ L
DNA polimerase*	5U/ μ L	0,01U/ μ L	0,04 μ L
DNA-molde	-	-	1 a 5 μ L

Para qualquer das reacções, a temperatura de hibridação e o tempo de extensão utilizados eram adequados aos *primers* da reacção utilizados e o número de ciclos à quantidade de produto que se desejava obter, sem exceder os 35 ciclos. Em todas as experiências foi preparado também um controlo negativo com água ultra pura. A sequência de ciclos está generalizada na tabela 5.

Tabela 5. Programa geral do programa PCR.

Número de ciclos	Temperatura	Tempo
1x	94°C	4 minutos
30x	94°C	1 minuto
	55-60°C	2 minutos
	72°C	45 s
1x	72°C	7 minutos
1x	4°C	∞

2.4 Electroforese em gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida nativo obteve-se pela solidificação de uma solução comercial de poliacrilamida a 40% (37,5 acrilamida:1 bisacrilamida) (Merck) com TBE 1x, PSA 0,1%, TEMED 0,031% e água. Previamente à aplicação das amostras no gel, adicionou-se a 10 µL µL de produto de PCR 1,6 µL tampão de amostra *6X Loading Dye Solution* #R0611 (Fermentas™) (10 mM Tris-HCl – pH 7.6, 60% de glicerol; 0,03% de azul de bromofenol; 0,03% de cianol xileno FF e 60 mM EDTA). Procedeu-se à separação electroforética do resultado das amplificações num gel de poliacrilamida nativo 8%, sujeito a um campo eléctrico de 300 V, numa unidade vertical Hoefer SE 600. O gel foi preparado sem brometo de etídio, pois este impede a polimerização da acrilamida (Sambrook & Russel 2001). O marcador utilizado foi o SM0403 (Fermentas™) e SM0371 (Fermentas™). Uma vez finalizada a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL durante 10 minutos e os resultados visualizados com radiação UV e fotografados com o sistema de captação de imagem Kodak™ EDAS 290.

2.5 Análise dos dados

No caso de *Sphagnum*, as bandas polimórficas foram assinaladas como presentes/ausentes e a matriz resultante foi introduzida no programa Arlequin ver. 2.000 (Schneider *et al.*, 2000), que se utilizou para todos os cálculos e análises descritos em seguida. Para cada população foram calculadas as seguintes medidas de diversidade: frequência de loci polimórficos, diversidade génica (hs, Nei 1987 in Gunnarsson *et al.* 2005) e diversidade genética média dos loci (Hs, Nei 1987 in Gunnarsson *et al.* 2005). Efectuou-se a análise da variância molecular (AMOVA), os valores de pairwise genetic distances entre populações foram estimados pelos valores de Fst e pelo número médio de pairwise differences entre populações.

De modo a diminuir o efeito possível que o número de indivíduos amostrados por população poderia ter nos resultados anteriormente descritos (especialmente porque para algumas populações foi apenas analisado um único indivíduo), agruparam-se as amostras de acordo com características geográficas e climáticas dos locais de ocorrência (Tabela 6 e Figura 8).

Igualmente, nos resultados de *Platyhypnidium*, as bandas polimórficas foram assinaladas como presentes/ausentes e a matriz resultante foi introduzida no programa PAUP*4.08b (Swofford, 2000). A distância genética foi calculada usando o índice de Nei & Li (1979). A partir da matriz de distâncias genéticas resultante foram

inferidas árvores fenéticas por Neighbour-Joining (NJ) e UPGMA. O grau de confiança de cada um dos ramos da árvore foi obtido por NJ bootstrapping, para o qual se usaram 10000 réplicas. A análise da variância molecular (AMOVA) foi efectuada utilizando o software Arlequin ver. 2.000 (Schneider *et al.* 2000).

Tabela 6. Lista e composição do agrupamento por região geográfica das amostras do complexo de *Sphagnum subsecundum*.

Nome	Composição	Nº de indivíduos/região geográfica
Região 1	PTRALS (Península de Tróia, Alcacer do Sal)	2
Região2	CBA+ALV+VLR (Cabeceira Basto, Alvão, Vila Real)	4
Região3	PTL+VNC+CBI+ARG+SGO (Ponte de Lima, Vila Nova de Cerveira, Corno do Bico, Serra d' Arga, Serra de Góis)	10
Região4	EST (Serra da Estrela)	3
Região5	GER+MAL (Serra do Gerês, Montalegre)	3
Região6	MIN+MAI+VAL+SMF (Mindelo, Maia, Valongo, Sta Mª Feira)	7
Região7	EIX +SVO (Eixo, Sever de Vouga)	5
Região8	MAM (Serra de S Mamede)	4
Região9	PEN (Peneda)	8
Região10	LOU (Lousã)	3
Região11	FRE+MNT (Serra da Freita, Serra de Montemuro)	5

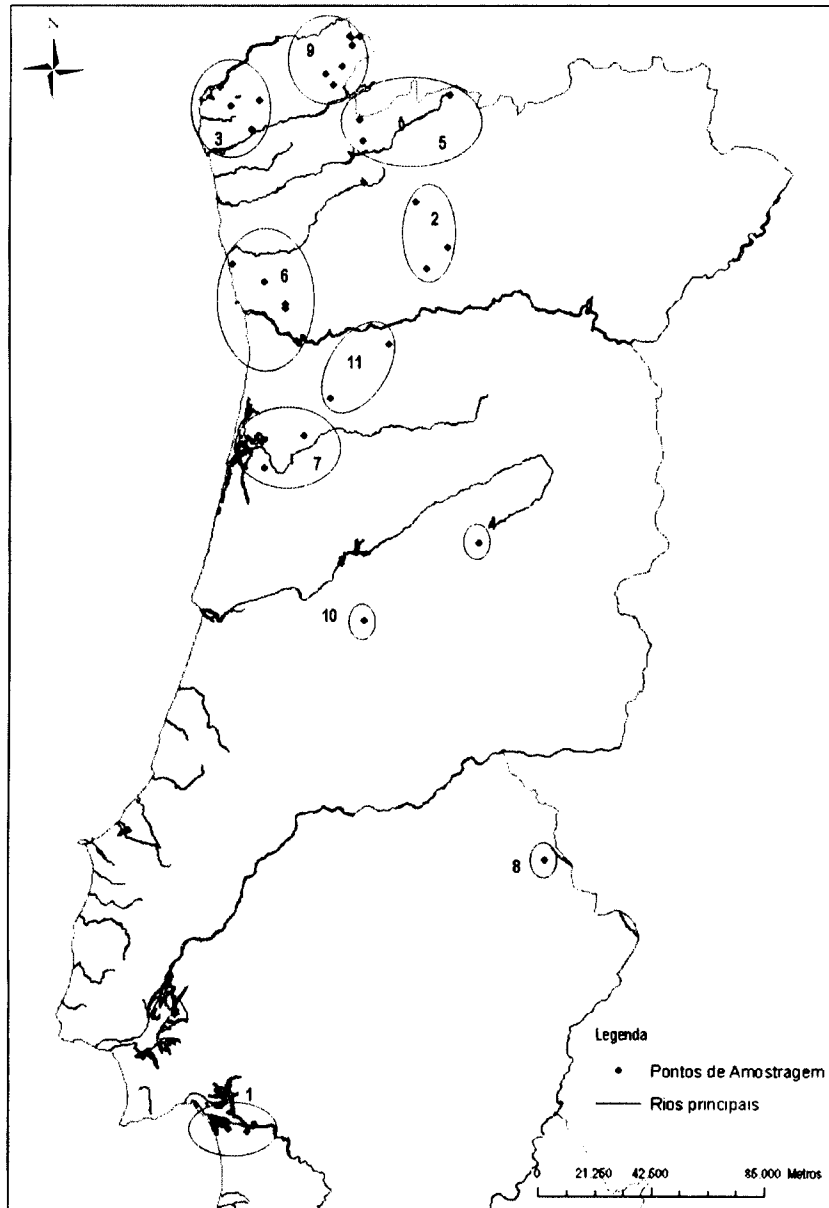


Figura 8. Mapa com o agrupamento das populações do complexo de *Sphagnum subsecundum* por áreas, delimitadas a vermelho.

3. RESULTADOS

3.1 Diversidade genética de populações do complexo de *Sphagnum subsecundum*

De todos os marcadores testados apenas se obtiveram resultados consistentes de PCR com os primers 808 e 873 Gunnarsson *et al.* (2005). Analisaram-se no total 13 loci todos polimórficos (tabela 7) e foram distinguidos 43 haplótipos (exemplos de resultados no Anexo III).

Tabela 7. Resultado da amplificação com os primers ISSR 808 e 873 de amostras analisadas do complexo de *Sphagnum subsecundum*.

Primer	Nº de loci	Nº de loci polimórficos	Bp	Temperatura de emparelhamento
808	6	6	750-350	57°C
873	7	7	700-400	58°C

Os resultados obtidos com os restantes revelaram-se difíceis de analisar, dado que se obtinham muitas bandas que apenas se tornavam mais ténues com os aumentos sucessivos da temperatura de emparelhamento.

Obtiveram-se vários padrões de bandas para cada um dos marcadores, que se revelaram muito polimórficos, permitindo apenas esboçar traços gerais de relação entre estes com a sua distribuição geográfica.

3.1.1 Resultados do marcador 808

Há padrões amplamente distribuídos (ex: 11, 13, 10, 2), ocorrendo desde áreas termófilas até montanhas no NW do país, outros como 6, 7, 8, 12, 25 são únicos no centro e NW do (Figura 9). Os padrões 15 e 16 ocorrem apenas na Serra de Estrela (1600 – 2000 m). Observa-se uma maior diversidade de padrões em áreas com um clima com marcadas tendências atlânticas.

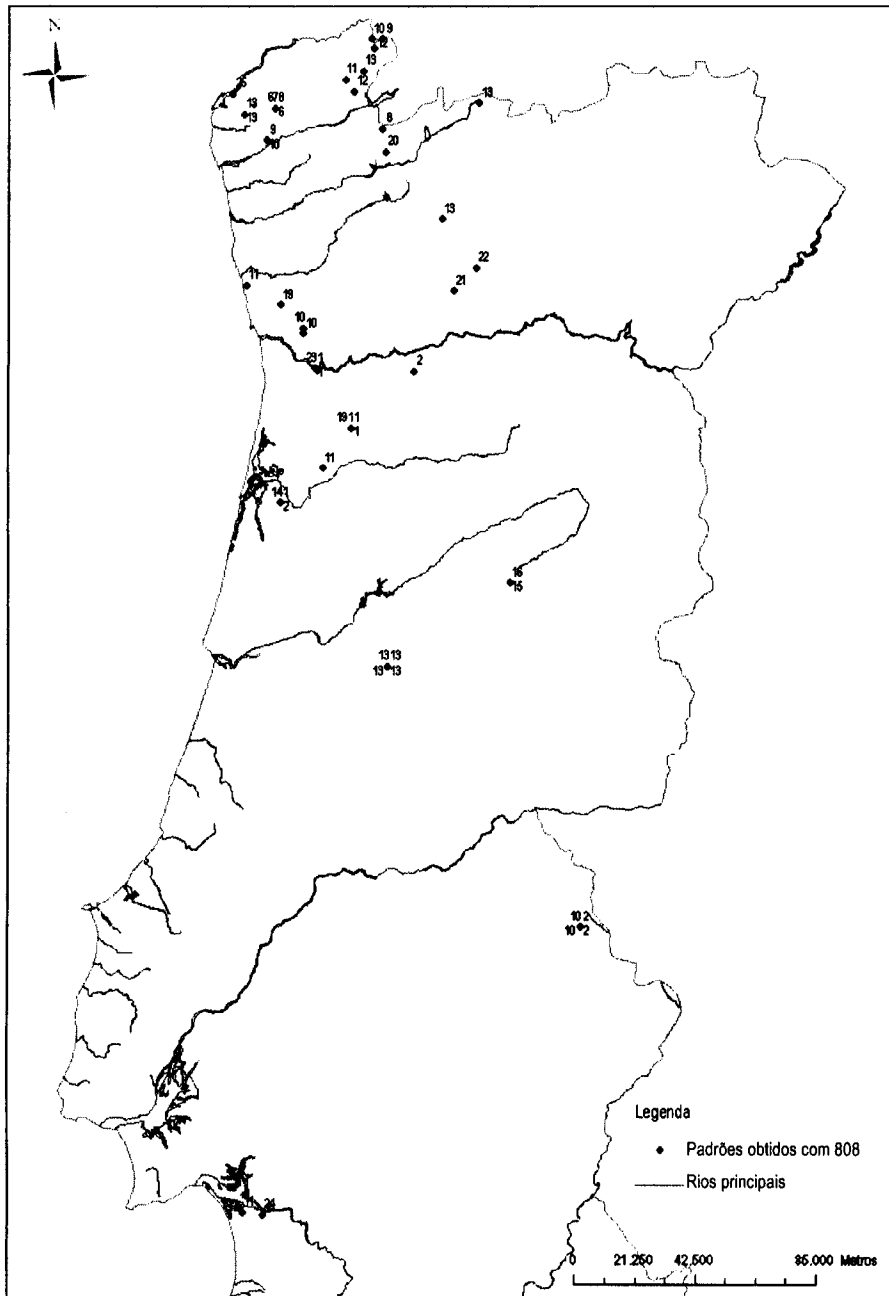


Figura 9. Distribuição geográfica dos padrões de bandas obtidos com o marcador 808 nas amostras analisadas do complexo de *Sphagnum subsecundum*.

3.1.2 Resultados do marcador 873

Vários padrões de bandas parecem ter também uma distribuição bastante alargada, mas neste caso, as população mais a sul apresenta padrões únicos (19, 25). O 15 aparece apenas na Serra da Estrela. De uma maneira geral, com este marcador obteve-se um maior número de padrões não partilhados do que com o anterior. A maior diversidade encontra-se igualmente no NW do país (Figura 10).

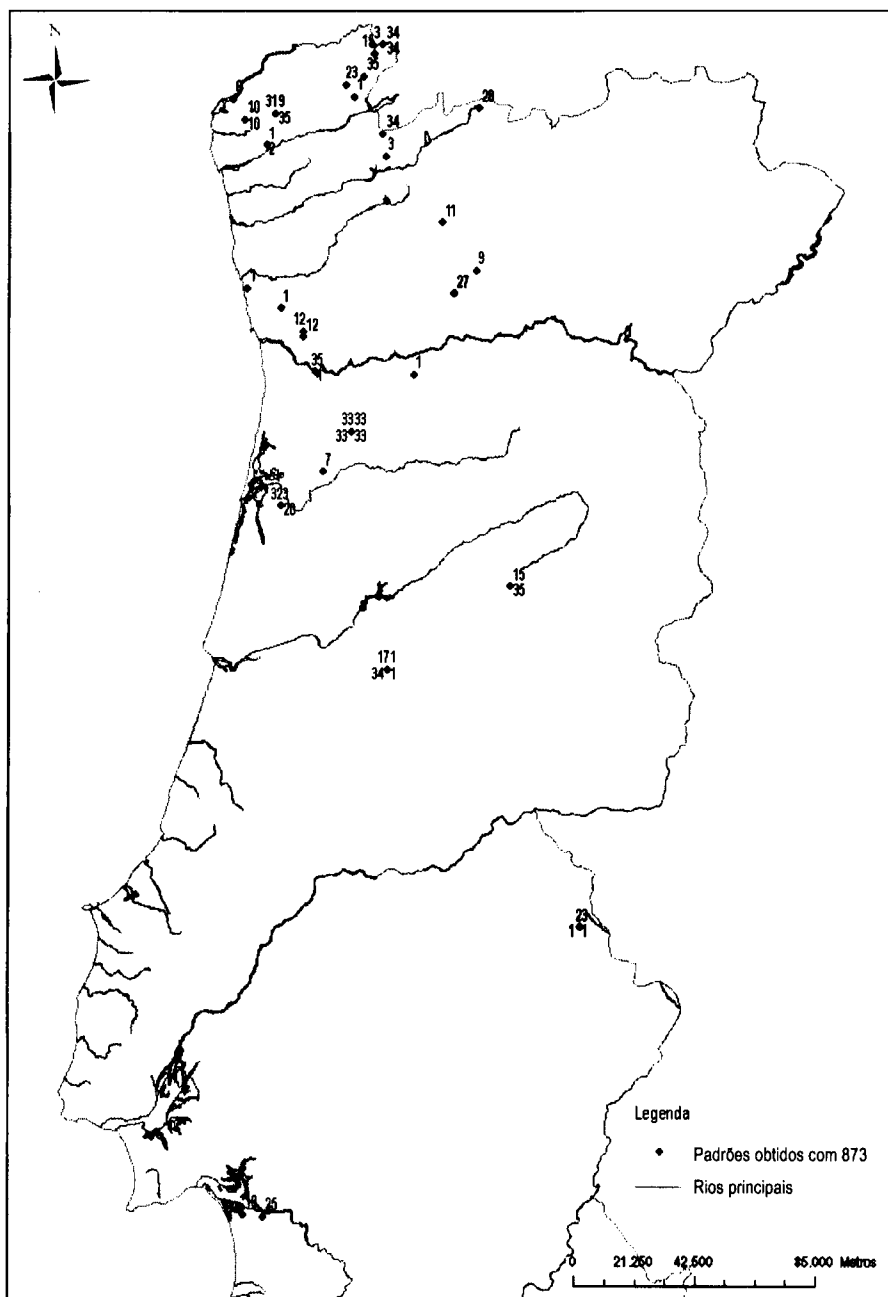


Figura 10. Distribuição geográfica dos padrões de bandas obtidos com o marcador 873 nas amostras analisadas do complexo de *Sphagnum subsecundum*.

3.1.3 Composição haplotípica das amostras quando agrupadas por região

Da combinação dos padrões obtidos para cada marcador definiram-se os haplótipos obtidos. Na figura 11 está representada a proporção de haplótipos para cada região geográfica descrita na secção 2.5.

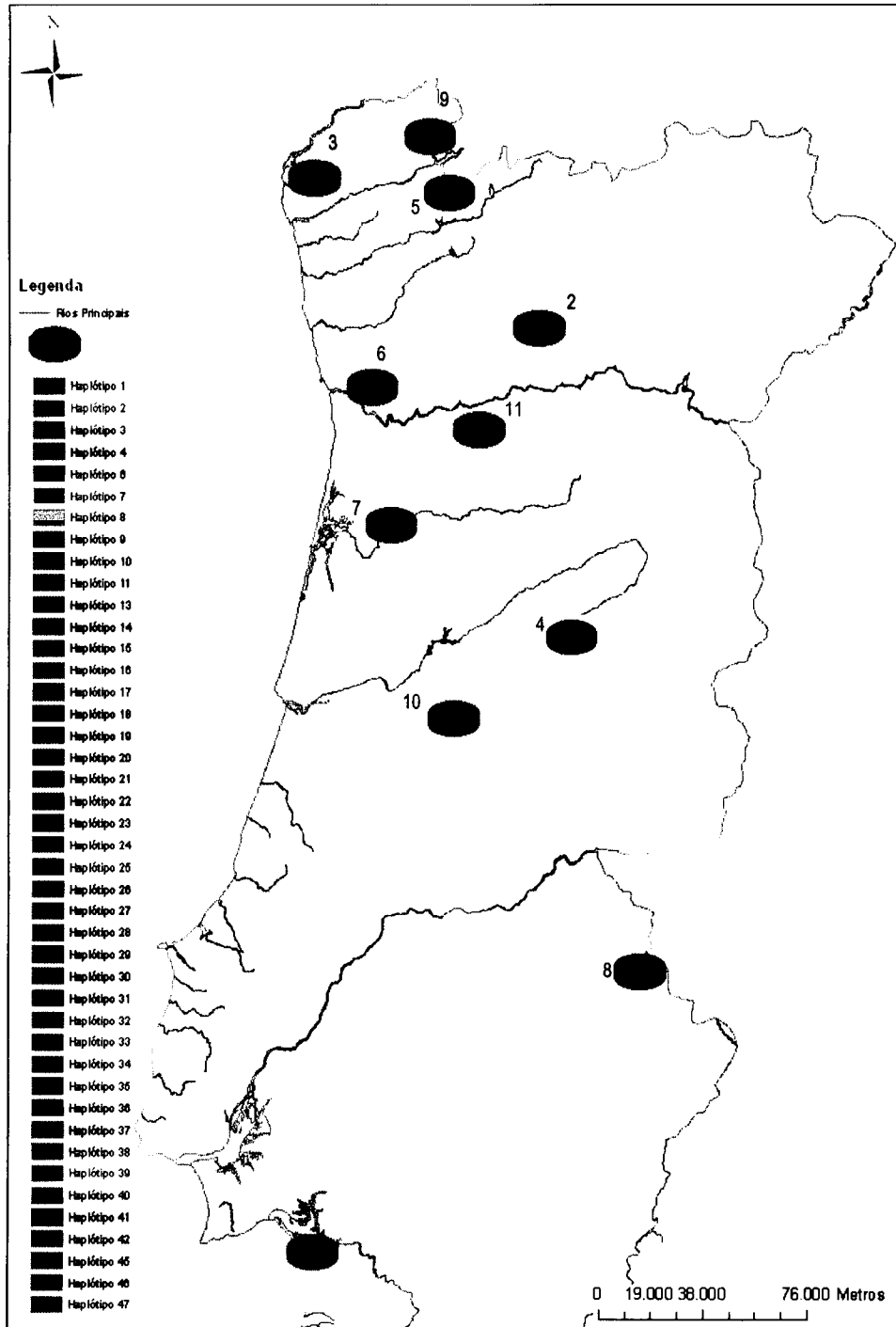


Figura 11. Frequência haplotípica de cada região geográfica das amostras analisadas do complexo de *Sphagnum subsecundum*.

3.1.3 Resultados de AMOVA

A análise revelou que 69% da variação é intrapopulacional e que 31% interpopulacional. O valor de F_{st} é significativamente diferente de zero ($p < 0,001$; $g.l = 53$), o que indica diferenciação (estruturação) genética entre as populações (tabela 8).

Os valores de *pairwise Fst* variaram entre -0,55 e 1 e as populações da Corno do Bico, Serra da Estrela, da Freita, da Lousã, de S. Mamede e da Peneda (CBI, EST, FRE, LOU, MAM e PEN respectivamente) apresentam dois ou mais valores de *pairwise Fst* estatisticamente significativos (tabela 9).

Tabela 8. Resultado da análise AMOVA de 23 populações de Portugal do complexo de *Sphagnum subsecundum*: 69% of da variação observada corresponde a diferenças ao nível intrapopulacional. A probabilidade de obter aleatoriamente valores de F_{st} iguais ou superiores aos encontrados é inferior a 0,001; n.s³ $p > 0,05$.

Fonte de variação	G.I	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Percentagem de variação
Interpopulacional	22	91,120	0,91150 va	30,82
Intrapopulacional	31	63,417	2,04570 vb	69,18
Total	53	154,537	2,95720	
<i>Fixation index</i>	$F_{st} = 0,30823$			

³ Não significativo

Tabela 9. Análise interpopulacional das populações de *S. subsecundum* agg. estudadas: número médio de *pairwise differences* entre populações (acima da diagonal), *pairwise Fst values* (abaixo da diagonal). Números em negrito correspondem a valores significativamente diferentes de 0 ($p < 0,05$).

	ALSPTR	ALV	ARG	CAB	CBI	EIX	EST	FRE	GER	LOU	MAI	MAM	MIN	MNT	MAL	PEN	PTL	SMF	SGO	SVO	VAL	VLR	VNC
ALSPTR		7,5	7,5	7,5	7,5	5,83	6,17	6,75	6,5	6,83	6,5	7,5	6,5	6,5	5,5	6,5	8	6,17	4,5	7	8,5	4,5	6,5
ALV	0,33		3,5	4,5	5	7,17	6,17	6,5	7,5	7,5	6,5	8	8,5	8,5	7,5	6,62	8	7,5	7,5	6	5,5	6,5	7,5
ARG	0,8	0		2	5,25	8	6,33	7,25	7,5	4,33	3	9,5	9	11	4	7	10	8,67	6	4,5	7	4	10
CAB	0,6	-0,56	1		5,25	8	7	7,25	7,5	3,67	3	8	7	9	4	7,25	8	7,33	8	4,5	5	6	8
CBI	0,31	-0,30	0,21	-0,17		6,42	6,88	6,5	7,5	7,25	6,75	7,63	8,75	7,75	7,25	6,69	7,5	7,08	8,25	6,5	6,25	8,25	7,25
EIX	0,17	0,11	0,52	0,25	0,05		5,67	3,75	5,16	7	7	4,67	5,67	4,33	6,67	5,25	5,33	4,67	6,67	5,17	5,67	8	4,67
EST	0,21	-0,04	0,4	0,14	0,07	-0,06		5,88	5,5	6,44	5,33	6,83	7,33	6,67	7	5,92	7	6,11	5,67	6,17	6	5,67	5,67
FRE	0,72	0,52	0,85	0,79	0,41	0,06	0,38		4	6,25	6,25	3,38	4,75	3,75	7,25	4,44	4,25	4,25	5,75	4	3,25	9,25	4,75
GER	0,54	0,33	0,8	0,6	0,31	0,06	0,12	0,51		5,17	5,5	4,5	3,5	5,5	5,5	5	4	4,83	6,5	4	5,5	7,5	6,5
LOU	0,66	0,49	0,7	0,45	0,40	0,43	0,38	0,73	0,54		1,33	6,33	4,67	6,67	2,33	6,33	6,67	6,33	5	4,83	6,67	5,67	7
MAI	0,54	-0,08	1	1	0,09	0,14	-0,13	0,76	0,45	-0,5		7,5	6	8	3	6,25	8	7	5	4,5	6	5	7
MAM	0,73	0,6	0,87	0,79	0,49	0,24	0,49	0,53	0,54	0,72	0,78		2	1,5	6,5	4,625	1,5	3,67	8	5	3	8,5	2,5
MIN	0,54	0,18	1	1	0,30	-0,06	0,18	0,68	0,14	0,57	1	0,17		2	5	5,25	2	3,67	7	4,5	4	7	3
MNT	0,54	0,18	1	1	0,20	-0,38	0,1	0,6	0,45	0,7	1	-0,11	1		7	5	2	3	7	6,5	4	9	1
MAL	0,45	0,07	1	1	0,15	0,1	0,14	0,79	0,45	0,14	1	0,74	1	1		6,25	7	6,67	6	4,5	9	4	8
PEN	0,20	0,06	0,35	0,18	0,10	-0,13	-0,01	0,08	-0,01	0,27	0,05	0,10	-0,13	-0,19	0,05		4,89	5,58	7	5,25	5	7,25	5,25
PTL	0,69	0,44	0,9	0,75	0,35	0,16	0,35	0,61	0,38	0,7	0,75	-0,19	0	0	0,71	0,01		4	9	5,5	3	9	3
SMF	0,34	0,26	0,65	0,36	0,22	-0,14	0,13	0,32	0,17	0,47	0,33	0,18	-0,27	-0,56	0,3	0,02	0,10		6,67	5,5	5	8	3,33
SGO	0,33	0,07	1	1	0,25	0,1	-0,06	0,74	0,54	0,6	1	0,79	1	1	1	0,15	0,78	0,3		7,5	9	4	8
SVO	0,43	0	0,44	-0,11	0,11	-0,09	0,09	0,35	0	0,35	-0,11	0,47	-0,11	0,23	-0,11	-0,08	0,36	0,13	0,33		4,5	6,5	6,5
VAL	0,82	0,36	1	1	0,32	0,33	0,37	0,67	0,73	0,80	1	0,60	1	1	1	0,13	0,67	0,41	1	0,44		9	3
VLR	0,33	-0,08	1	1	0,25	0,25	-0,06	0,89	0,6	0,65	1	0,80	1	1	1	0,18	0,78	0,42	1	0,23	1		8
VNC	0,54	0,07	1	1	0,15	-0,29	-0,06	0,68	0,54	0,71	1	0,33	1	1	1	-0,13	0,33	-0,4	1	0,23	1	1	

3.1.4 Resultados da AMOVA das amostras agrupadas por região geográfica

O resultado desta análise foi semelhante ao anterior, 84% da variação é intrapopulacional e apenas 16% interpopulacional, o valor de F_{st} é significativamente diferente de zero ($p < 0,001$; $g.l.=53$), indicando diferenciação genética entre os grupos populações analisados (tabela 10).

Tabela 10. Resultado da análise AMOVA de 11 regiões de Portugal do complexo de *Sphagnum subsecundum*: 84% of da variação observada corresponde a diferenças ao nível intrapopulacional. A probabilidade de obter aleatoriamente valores de F_{st} iguais ou superiores aos encontrados é inferior a 0,001; n.s $p > 0,05$.

Fonte de variação	G.l	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Interpopulacional	10	47,499	0,47133 va	15,92
Intrapopulacional	43	107,038	2,48926 vb	84,08
Total	53	154,537	2,96059	
Fixation index	$F_{st} = 0,15920$			

A diversidade génica variou entre 0,7 e 1 e a média de todas as populações foi de $1,0608 \pm 0,22325$. A diversidade genética média dos loci variou entre 0,13 e 0,52 e a média de todas as populações foi $0,37 \pm 0,28$. As regiões 3 e 4 apresentam a maior variabilidade genética de cada loci e algumas das regiões marginais apresentam os valores mais baixos (região 8 – Serra da Estrela – e 10 – Serra de S. Mamede). O número médio de *pairwise differences* variou entre 0,58 para a região 2 e 6,82 na região 3 (tabela 11).

Tabela 11. Índices de diversidade para cada uma das populações do complexo de *Sphagnum subsecundum*.

	<i>n</i>	No. de haplótipos	No. de loci polimórficos	Diversidade génica	Diversidade genética média dos loci	No. médio de <i>pairwise differences</i>
Região1	2	2	3	$1,00 \pm 0,50$	$0,23 \pm 0,27$	$3,00 \pm 2,45$
Região2	4	4	11	$1,00 \pm 0,18$	$0,45 \pm 0,32$	$0,58 \pm 3,53$
Região3	10	8	13	$0,96 \pm 0,06$	$0,52 \pm 0,30$	$6,82 \pm 3,51$
Região4	3	3	9	$1,00 \pm 0,27$	$0,46 \pm 0,38$	$6,00 \pm 3,93$
Região5	3	3	7	$1,00 \pm 0,27$	$0,36 \pm 0,30$	$4,67 \pm 3,13$
Região6	7	6	10	$0,95 \pm 0,10$	$0,37 \pm 0,24$	$4,86 \pm 2,69$
Região7	5	5	10	$1,00 \pm 0,13$	$0,42 \pm 0,28$	$5,40 \pm 3,13$
Região8	4	4	3	$1,00 \pm 0,18$	$0,13 \pm 0,11$	$1,67 \pm 1,22$
Região9	8	8	13	$1,00 \pm 0,06$	$0,45 \pm 0,28$	$5,93 \pm 3,17$
Região10	3	3	3	$1,00 \pm 0,27$	$0,15 \pm 0,16$	$2,00 \pm 1,51$
Região11	5	5	6	$0,70 \pm 0,22$	$0,18 \pm 0,14$	$2,40 \pm 1,56$

Os valores de *pairwise Fst* variaram entre -0,08 e 0,73 e as regiões 2, 8, 10 e 11 têm três ou mais valores de *Fst* significativos (tabela 12).

Tabela 12. Análise interpopulacional das regiões do complexo de *Sphagnum subsecundum* estudadas: número médio de *pairwise differences* entre populações (acima da diagonal), *pairwise Fst values* (abaixo da diagonal). Números em negrito correspondem a valores significativamente diferentes de 0 (n.s $p>0,05$).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		6,75	7,2	6,17	6,17	6,93	6,3	7,5	6,5	6,83	6,7
2	0,27		6,1	6,25	6,92	6,89	6,85	8,13	6,94	6,08	7,65
3	0,18	-0,05		6,43	6,57	6,19	6,22	6,3	6,28	6,3	6,06
4	0,21	0,05	-0,01		6	6,14	5,87	6,83	5,92	6,44	5,8
5	0,34	0,23	0,08	0,11		5,48	5,07	5,17	5,42	4,22	5,27
6	0,36	0,24	0,05	0,14	0,13		5,23	3,79	5,46	5,48	4,23
7	0,25	0,18	0,01	0,04	-0,01	0,02		4,8	5,25	6,13	4,12
8	0,73	0,54	0,23	0,49	0,43	0,08	0,23		4,63	6,33	3
9	0,20	0,15	-0,018	-0,01	-0,01	0,01	-0,08	0,10		6,33	4,55
10	0,66	0,314	0,18	0,38	0,21	0,30	0,34	0,72	0,27		6,33
11	0,61	0,48	0,18	0,34	0,37	0,12	0,05	0,31	0,05	0,64	

3.2 Diversidade genética de *Platyhypnidium lusitanicum* e *P. riparioides*

De todos os marcadores testados apenas se obtiveram resultados consistentes com os 825 e 873. No total foram analisados 9 loci, 8 polimórficos (tabela 13) e distinguiram-se 27 haplótipos, um dos quais presentes nos dois taxa (haplótipo 5) presente nas amostras EPL1 e PPR5 (exemplos de resultados no Anexo IV). Seis amostras de *Platyhypnidium lusitanicum* de Portugal (PPL5, PPL12, PPL18, PPL19a, PPL20 e PPL21) partilham o mesmo haplótipo – 19 – sendo este o mais comum (figuras 12, 13 e 14).

Tabela 13. Resultado da amplificação com os primers ISSR 825 e 873.

Primer	Nº de loci	Nº de loci polimórficos	Bp	Temperatura de emparelhamento
825	5	4	790-400	57°C
873	4	4	800-700	58°C

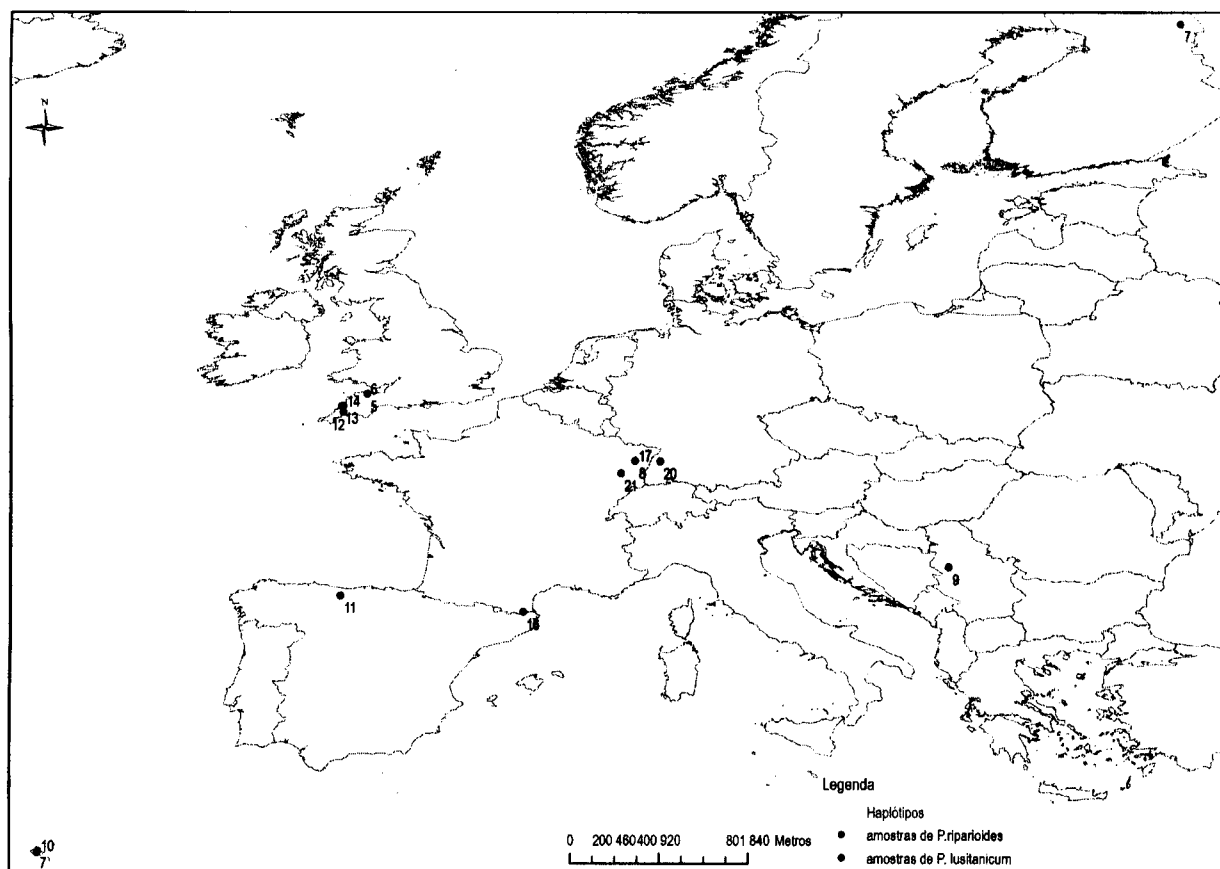


Figura 12. Distribuição geográfica dos haplótipos na Europa de *Platyhypnidium riparioides* (a azul) e *P. lusitanicum* (a vermelho).

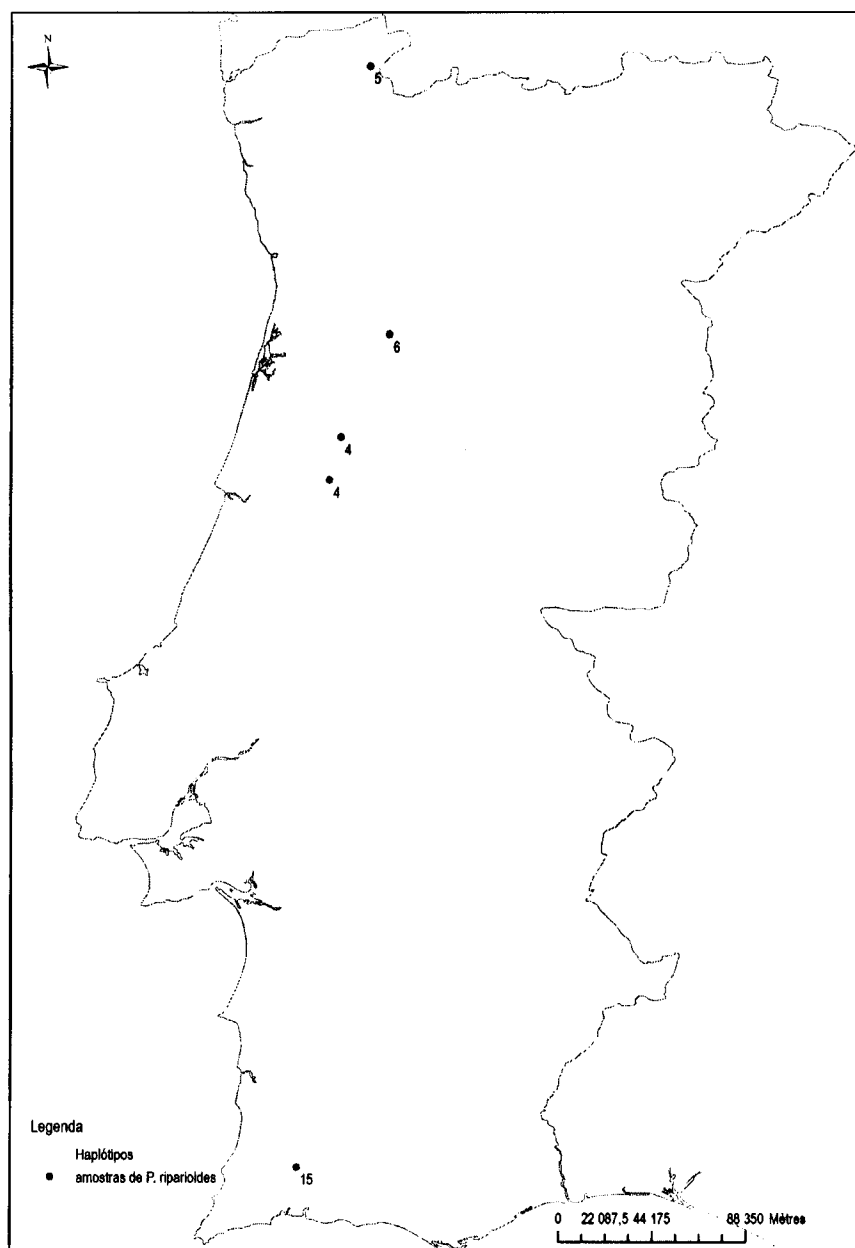


Figura 13. Distribuição geográfica dos haplótipos em Portugal Continental de *Platyhypnidium riparioides*.

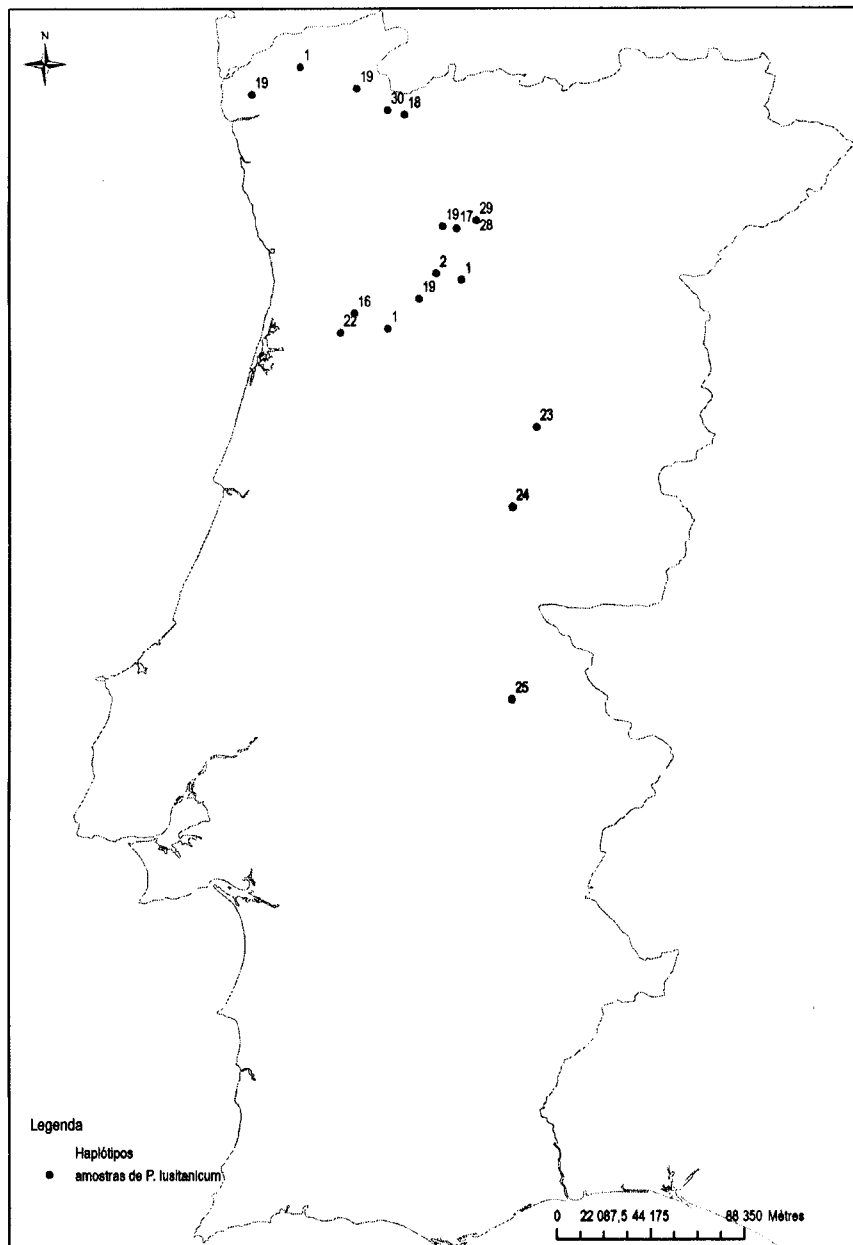


Figura 14. Distribuição geográfica dos haplótipos em Portugal Continental de *Platyhypnidium lusitanicum*. As amostras PPL18 e PPL19 (não representadas) apresentam o haplótipo 19.

3.2.1 Resultados da análise fenética

As análises por *Neighbour Joining* (NJ) e *UPGMA* usando o índice de distância de Nei & Li (1979) não separam os dois *taxa* e os valores de *bootstrap* são muito baixos. Os resultados diferem, com NJ as amostras PPR1 e PPR6 são as mais distintas, já com *UPGMA* a amostra PPL23 é a mais diferente. A análise fenética – *UPGMA*, NJ – também não permite uma distinção clara entre as espécies (Figuras 15 e 16). Com os dois métodos, obtiveram-se valores de *bootstrap* acima dos 50% para os clades que agrupam as amostras PPR5 e EPL1, PPR4 e EPR1, FIPR1 e MPR2. À exceção do primeiro, todos associam amostras de *Platyhypnidium riparioides* de diferentes locais (Portugal, Inglaterra e Finlândia) mas aparecem dentro de clades com amostras de *P. lusitanicum*. PPR5 e EPL1 são amostras de *P. riparioides* de Portugal e *P. lusitanicum* de Inglaterra. Não é possível visualizar grupos distintos

dos dois taxa, nem agrupamentos pela proximidade geográfica ou semelhança de habitat, antes uma mistura das amostras evidenciando a sua elevada variabilidade genética (Figuras 15 e 16).

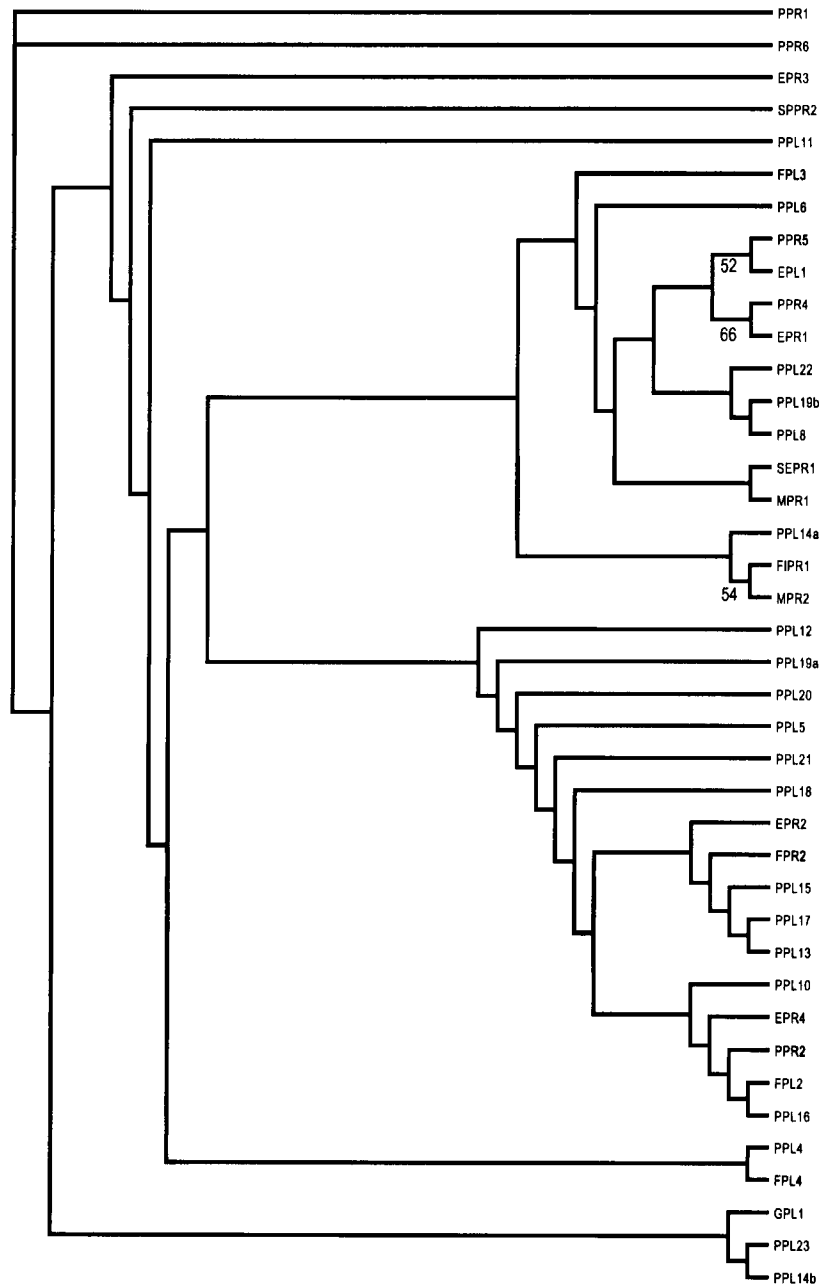


Figura 15. Árvore resultante da análise por NJ dos dados de ISSR de *Platyhypnidium riparioides* e *P. lusitanicum*. Valores de *bootstrap* acima dos 50% apresentados nos clades.

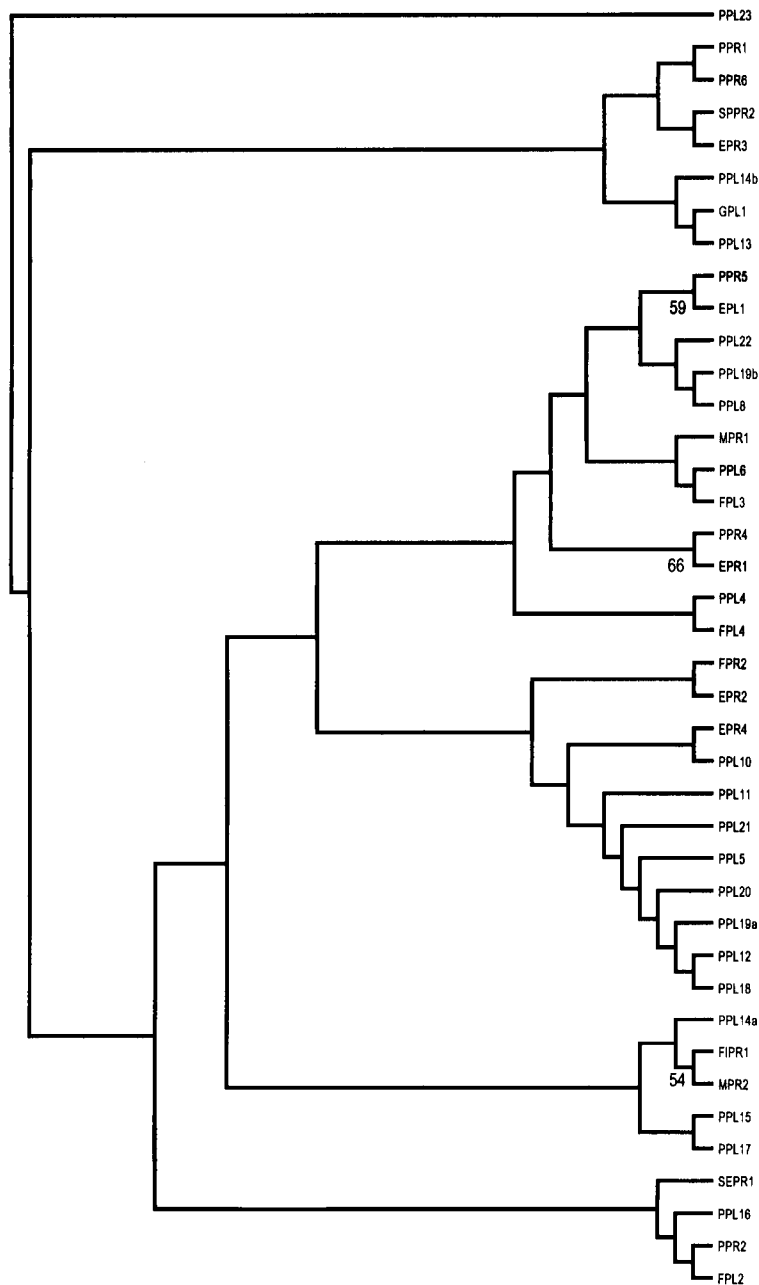


Figura 16. Árvore resultante da análise por UPGMA dos dados de ISSR de *Platyhypnidium riparioides* e *P. lusitanicum*. Valores de *bootstrap* acima dos 50% apresentados nos clades.

3.2.2 Resultados de AMOVA

A análise AMOVA revelou que cerca de 94,15% da variação se deve a variação intraspecífica, e o valor de F_{st} obtido é significativo apenas a um nível de significância de 0,05 ($p=0,04$; $g.l.=39$) (tabela 14). Estes marcadores indicam que estas duas espécies formam dois sistemas diferenciados, com elevados valores de variabilidade genética.

Tabela 14. Resultado da AMOVA baseado nos dados ISSR obtidos para *Platyhypnidium riparioides* e *P. lusitanicum*. Cerca de 94% da variação observada corresponde a diferenças intra específicas. A probabilidade de obter aleatoriamente valores de F_{st} iguais ou superiores aos encontrados é inferior a 0,05; n.s $p > 0,05$.

Fonte de variação	G.I	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Percentagem de variação
Entre taxa	1	3,433	0,09853 va	5,85
Inter taxa	38	60,267	1,58596 vb	94,15
Total	39	63,70	1,68449	
Fixation index	$F_{st} = 0,05849$			

4. DISCUSSÃO

4.1 *Sphagnum*

4.1.1 Diversidade genética de populações do complexo de *Sphagnum subsecundum*

Os resultados obtidos com os marcadores utilizados revelaram um número elevado de padrões de bandas. Utilizados em técnicas de DNA *fingerprinting*, o uso destes marcadores neste estudo justifica-se, à partida, pelo facto de estas plantas raramente apresentarem reprodução sexual o presumiria que indivíduos de determinada área apresentassem muito pouca variabilidade genética, o que não se verificou. Esta variabilidade pode estar relacionada com o facto de serem utilizados em técnicas de DNA *fingerprinting* e com as diferentes qualidades de DNA extraído a partir de material fresco e de herbário, o que pode contribuir para haver muito ruído nos resultados. Obtiveram-se quase tantos padrões de bandas como indivíduos estudados.

Com o *primer* 808 (Figura 9) obtiveram-se cinco padrões de bandas que aparecem unicamente no centro e NW do país e confirmam a extrema fragmentação destas populações que têm sido sistematicamente sujeitas a pressão antropogénica. Os padrões 15 e 16 ocorrem apenas na Serra de Estrela (1600 – 2000 m), que sofreu efeito das glaciações do Quaternário (van der Knaap & van Leeuwen 1995).

De uma maneira geral, com o *primer* 873 (Figura 10) obteve-se um maior número de padrões não partilhados do que com o anterior. A população mais a sul apresenta padrões únicos (19, 25), o que se pode dever ao isolamento prolongado destas. O padrão 15 aparece apenas na Serra da Estrela, provavelmente pelas razões expostas anteriormente.

4.1.2 Diferenciação de populações

Os resultados da AMOVA indicam elevados valores de variabilidade intrapopulacional e diferenciação entre as populações. Analisando as *pairwise differences* (tabela 9) verifica-se que três das populações geograficamente mais isoladas – Serra da Estrela, Serra da Lousã e Serra de S. Mamede – apresentam valores significativamente diferentes de F_{st} , indiciando alguma diferenciação.

O que parece observar-se actualmente através dos resultados obtidos, é uma “paisagem fragmentada” do que terá sido, então, uma distribuição mais alargada destas espécies. Assim, parecem evidentes dois factores importantes na história destas populações, por um lado, a filogeografia relacionada com as alterações climáticas e re-colonização (aquando as glaciações do Quaternário o limite de distribuição destas plantas ser mais a sul, mas após o aquecimento do Holoceno (10000 anos até presente) esse limite recuou para Norte – Séneca *et al.* 1992), e por outro, a fragmentação e a diminuição de habitats disponíveis no último século. O padrão de diferenciação que observamos pode estar relacionado com estes dois factores, mas é difícil perceber qual deles é que, para cada local, é mais influente em cada população.

A Serra da Estrela, é o único local em Portugal continental onde se acumulam depósitos de turfa e a abundância de plantas deste complexo é menor relativamente a outras espécies de *Sphagnum* (Séneca *et al.* 1992). O resultado obtido, indica que a dispersão a partir e para esta área deve ser bastante limitada, o que é corroborado pelo facto de não haver registo de reprodução sexuada destas plantas nesta área. No final da era glacial, há evidências palinológicas que a vegetação na Serra da Estrela era caracterizada por diferentes zonas: deserto polar, nas zonas de elevada altitude, vegetação rasteira, numa zona intermédia das montanhas, e, nos vales abrigados nas zonas baixas, florestas de formação aberta; o clima deveria ser bastante frio e seco (van der Knaap & van Leeuwen 1995). Nestas condições as populações de *Sphagnum* poderiam ter sobrevivido em pequenos refúgios, onde as condições topográficas e climáticas permitissem manter, durante a maior parte do ano, água com drenagem lenta. Assim sendo, as populações na Serra da Estrela poderão ser o resultado da dispersão a partir de pequenas refúgios locais (nunataks) após o recuo do gelo e/ou resultado de uma recolonização posterior a partir de outras populações de áreas próximas actualmente extintas.

Na Serra de S. Mamede (Figura 4) estas plantas ocorrem junto a uma linha de água, mas dado que é bastante isolada, é pouco provável a ocorrência de trocas genéticas frequentes com plantas de outros locais. A ocorrência de *Sphagnum* nesta área está restringida devido a limitações climáticas (Invernos frios e Verões quentes e secos) e topográficas (poucos locais que permitam drenagens suficientemente lentas), apenas localmente é possível o estabelecimento de áreas higróturfosas. A população da Serra da Lousã (Figura 4) aparece numa ressumância junto a um caminho, não havendo mais registos de *Sphagnum* para aquela zona (as populações mais próximas são na Serra da Estrela) possivelmente pelas mesmas razões. Verifica-se, portanto, um padrão de diferenciação, em que a bacia do Rio Mondego (Figura 4) parece funcionar como charneira entre populações diferenciadas a sul e um conjunto mais homogéneo a norte. Este tipo de padrão filogeográfico foi já verificado em outros organismos de distribuição atlântica, que ocorrem em áreas de floresta de caducifólia - que também desapareceram com as alterações climáticas decorrentes das glaciações - nomeadamente para anfíbios (*Chioglossa lusitanica* Bocage, Alexandrino *et al.* 2000), répteis (*Lacerta schreiberi* Bedriaga, Paulo *et al.* 2002) e plantas vasculares (e.g. *Quercus robur* L., Petit *et al.* 2002). É dado adquirido a importância dos refúgios do Sul da Europa na recolonização após a contracção do gelo do Quaternário, será interessante estudar com maior pormenor a dinâmica destes micro-refúgios, à semelhança do que tem sido feito para os organismos supra-citados, em espécies de briófitas, no sentido de cimentar o conhecimento sobre padrões filogeográficos nestas regiões. O mais provável é que estas populações sejam relíquias do Holoceno de uma anterior distribuição, que se tornaram isoladas pela diminuição de habitats disponíveis causados pelas alterações climáticas e por pressão antropogénica.

Curiosamente a população mais a SW Tróia e Alcácer do Sal (Figura 4) não apresenta valores de pairwise differences significativamente diferentes (tabela 9). Nesta área, as populações de *Sphagnum* ocorriam em pequenas, e por vezes temporárias, lagoas, onde as plantas viviam completamente submersas no Inverno e sobrevivendo em média, a 6 meses de escassa precipitação, graças à sua capacidade de retenção de água e à humidade do solo, sendo por isso, populações bastante vulneráveis a alterações, quer climáticas quer antropogénicas. O material analisado foi colhido em 1991/92, e actualmente, no local, há uma exploração agrícola o que levou à extinção da população. Pode-se questionar se em 91/92 haveria suficiente fluxo genético com populações mais a norte e a sul [há registos para taxa deste complexo em Palmela (Setúbal) (Séneca 1999,

Séneca 2003) e registos de zonas turfosas na Serra de Monchique⁴ (Algarve) (Beliz 1982)], e efectivos populacionais grandes que impedissem o isolamento genético destas. Este resultado pode estar relacionado com o facto de apenas se terem analisados dois indivíduos. Seria interessante re-analisar esta população uma vez que é provavelmente uma relíquia da distribuição destas plantas durante a glaciação do Quaternário. Num estudo de perfis de turfa no Litoral do Alentejo (Mateus 88-89; Mateus 1991 in Séneca *et al.*, 1992) foram identificados esporos de *Sphagnum auriculatum*, que no período correspondente de 5500 a 4900 anos eram bastante comuns, revelando que ao contrário do que se verifica na actualidade populações deste taxa eram comuns no SW do país, que corresponde ao limite sul da sua distribuição na Europa (Séneca *et al.*, 1992).

4.1.3 Diferenciação de populações entre regiões geográficas

Os resultados obtidos na AMOVA repartem a variação da mesma maneira do caso anterior e indicam, igualmente, que há alguma subestruturação destas populações. É curioso notar que para todas as populações há dois ou mais valores estatisticamente significativos de pairwise differences, o que demonstra como o número de indivíduos por população pode influenciar os resultados. São as regiões 2 (Cabeceira Basto, Alvão, Vila Real), 8 (Serra de S Mamede), 10 (Serra da Lousã) e 11 (Serra da Freita e Serra de Montemuro) as que apresentam mais valores estatisticamente significativos, dessas a 8 e a 10 correspondem a populações isoladas e que representam os limites da distribuição mais a sul (tabela 12, Figura 8). As outras regiões (2 e 11) podem ter sido também refúgios, que após o aquecimento, colonizaram novas áreas, à semelhança do que observado para *C. lusitanica*, em que entre o rio Mondego e Douro parecem ter existido pequenos refúgios, nomeadamente na Serra de Montemuro (Alexandrino *et al.*, 2000).

Contudo, contrariamente ao observado para *C. lusitanica* e *L. schreiberi*, analisando os dados dos índices de diversidade intrapopulacional (tabela 11) não se verifica uma diminuição da variabilidade genética (média de diversidade genética entre *loci*) em direcção ao norte, sugerindo que não há grandes barreiras de dispersão nem de cruzamento no Norte do país. São as populações mais a sul que apresentam valores mais baixos de variabilidade, provavelmente dado o seu isolamento e diminuição progressiva de habitats disponíveis e efectivos populacionais, enquanto que no Norte há um maior número de populações e a probabilidade de cruzamento/dispersão é maior. Porém, os resultados obtidos para a análise intrapopulacional estão certamente desviados dado que, mesmo agrupando as as populações, o número de amostras por região varia, enviesando os resultados, principalmente a estimativa de diversidade genética (tabela 12).

A utilização de outros marcadores, como microssatélites ou testando mais primers de ISSR ou RAPDs provavelmente permitiria uma maior resolução dos resultados e os mesmos marcadores poderiam ser ainda utilizados para esclarecer as complexas relações filogenéticas entre os diferentes taxa do complexo.

⁴ Actualmente na suposta área turfosa não há *Sphagnum* devido a nitrificação do solo.

4.2 Diversidade genética de *Platyhypnidium riparioides* e *P. lusitanicum*

Estes marcadores indicam que estas duas espécies formam dois sistemas diferenciados (o resultado de AMOVA – tabela 14 – é significativo para 0,05), com elevados valores de variabilidade genética intra taxa (cerca de 94%), sugerindo que a delimitação morfológica dos taxa não é acompanhada de variação genética entre os dois taxa. Os resultados das análises fenéticas (UPGMA e NJ) não separam os dois taxa em dois grupos diferentes nem se consegue também deslindar um padrão geográfico (Figuras 1 e 15).

Tendo em conta, a plasticidade morfológica destas plantas e a presença de formas intermédias entre os taxa, estes resultados não são surpreendentes. Alguns espécimes de *P. lusitanicum* apresentam largos espectros de variabilidade morfológica e, em Portugal, há diversas formas especialmente em áreas montanhosas com folhas mais côncavas e imbricadas que o tipo.

A variação molecular obtida pode explicar outros factores, como por exemplo a filogeografia, e não acompanhar as variações de morfologia, e estes taxa corresponderem a apenas uma espécie. Experiências de cultivo e transplantes recíprocos poderiam ajudar a clarificar se a variação morfológica destes taxa é fixada geneticamente ou se é induzida por factores ambientais. Recorrendo a microsatélites também se poderá obter uma melhor informação acerca da variabilidade genética destes taxa, principalmente da dinâmica populacional.

Há vários casos em briófitas de padrões morfológicos que não são acompanhados por padrões genéticos e vice-versa, resultando, por um lado, em especiações crípticas (por exemplo, Shaw 2000, Shaw & Allen 2000) e, por outro lado, em baixos níveis de variabilidade genética em taxa com elevada variabilidade morfológica.

Foram já revelados casos de especiação críptica em espécies de musgos e de hepáticas (exemplos em Shaw 2001), sugerindo que a uma uniformidade morfológica corresponde uma complexa estrutura genética, que evolui mais rapidamente que a morfologia. Noutros casos, verificou-se que morfoespécies reconhecidas tradicionalmente resultam como sendo polifiléticas em análises filogenéticas, o que pode ser explicado por plasticidade morfológica das espécies ao meio ou por fenómenos de convergência genética (por exemplo, em taxa aquáticos: Vanderpoorten *et al.* 2004, Vanderpoorten & Jacquemart 2004 e em taxa terrestres Stech & Wagner 2005, Werner *et al.* 2005a e Werner *et al.* 2005b).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos apontam que à variabilidade morfológica corresponde uma variabilidade genética. No caso do complexo de *Sphagnum subsecundum* apenas perceber que as populações mais a sul do país além de geograficamente isoladas, são também geneticamente diferenciadas. No norte há também populações diferenciadas, como na Serra da Peneda, Serra de Montemuro e Serra da Freita. Estas populações têm interesse de conservação, uma vez que poderão ter sido refúgios – sendo, por isso, populações antigas e ricas em termos de variabilidade genética – e sujeitas a elevada pressão antropogénica.

Quanto ao problema taxonómico entre *Platyhypnidium riparioides* e *P. lusitanicum* não se mostraram entidades taxonómicas distintas nesta análise. Os resultados apontam apenas para uma diferenciação genética entre as amostras, que com outros marcadores poderá ser resolvida. Essa diferenciação poderá estar relacionada com a existência de variantes filogeográficos.

6. BIBLIOGRAFIA

6.1 Bibliografia consultada

- Alexandrino, J., Froufe, E., Arntzen, J. W. & Ferrand, N. (2000) – Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Molecular Ecology* **9**: 771-781.
- Beliz, J. M. (1982) – A Serra de Monchique: flora e vegetação. Serviço Nacional de Parques, Reservas e Património Paisagístico (Ed.). Lisboa
- Brugués, M.; Muñoz, J.; Ruiz, E. & Heras, P. (2004) – *Sphagnaceae: Sphagnum*. In: Guerra, J & Cros, R. M. (eds), Flora Briofítica Ibérica, vol 12. Sociedade Espanhola de Briología (SEB), Murcia.
- Brotherus, V. F. (1925) – Musci (Laubmoose) II. — In: Engler, A. and Prantl, K. (eds.), *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, pp. 1–522. W. Engelmann, Leipzig.
- Buck, W. R. (1991) – The basis for familial classification of pleurocarpous mosses. *Advances in Bryology* **4**: 169–185.
- Buck, W. R. & Vitt, D. H. (1986) – Suggestions for a new familial classification of pleurocarpous mosses. *Taxon* **35**: 21–60.
- Buck, W. R. & Goffinet, B. (2000) – Morphology and classification of mosses. — In: Shaw, A. J. & Goffinet, B. (eds.), *Bryophyte Biology*, pp. 71–123. Cambridge University Press, Cambridge.
- Buck, W. R., Goffinet, B. & Shaw, A. J. (2000) – Testing morphological concepts of orders of pleurocarpous mosses (Bryophyta) using phylogenetic reconstructions based on *trnL-trnF* and *rps4* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **16** (2): 180-198.
- Chambers, G.K. & MacAvoy, E.S. (2000) – Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology* **126**: 455-476.
- Clymo, R. S. & Hayward, P. M. (1982) – The ecology of *Sphagnum*. In AJE Smith (Ed.). *Bryophyte Ecology*, 229-289. Chapman & Hall, London, UK.

- Cox, C. J., Goffinet, B., Shaw, A. J. & S. Boles. (2004) – Phylogenetic relationships among the mosses based on heterogeneous Bayesian analysis of multiple genes from multiple genomic compartments. *Systematic Botany* **29**: 234–250.
- Cronberg, N. (1996) – Isozyme evidence of relationships within *Sphagnum* section *Acutifolia* (Sphagnaceae, Bryophyta). *Plant Systematics and Evolution* **203**: 41-64.
- Cronberg, N (2004) – Genetic differentiation between populations of the moss *Hylocomium splendens* from low versus high elevation in Scandinavian mountain range. *Lindbergia* **29**: 64-72.
- Crum, H. A. (2001) – The structural diversity of bryophytes. University of Michigan Herbarium. Ann Arbor. Michigan, USA.
- Daniels, R. E. & Eddy, A. (1985) – Handbook of European Sphagna. Public Institute of Terrestrial Ecology, Doseit, UK.
- De Luna, E., Buck, W. R., Akiyama, H., Arikawa, T., Tsubota, H., Gonzalez, D., Newton, A. E. & Shaw, A. J. (2000) – Ordinal phylogeny within the hypnobryalean pleurocarpous mosses inferred from cladistic analyses of three chloroplast DNA sequence data sets: trnL-F, rps4, and rbcL. *The Bryologist* **103**: 242–256
- Eddy, A. (1977) – *Sphagnum subsecundum* agg. in Britain. *Journal of Bryology* **9**: 309-319.
- Eddy, A. (1985) – A revision of African Sphagnales. Bulletin of the British Museum, Natural History (Botany) **12**: 77-172.
- Goffinet, B. (2000) – Origin and phylogenetic relationships of bryophytes. In J. Shaw & B. Goffinet [eds.], *The Biology of Bryophytes*, 124–149. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Goffinet, B., Cox, C. J., Shaw, A. J. & Hedderson, T. A. J. (2001) – The Bryophyta (mosses): systematic and evolutionary inferences from an rps4 gene (cpDNA) phylogeny. *Annals of Botany* **87**: 191–208.
- Gunnarsson, U., Hassel, K., Söderström, L. (2005) – Genetic structure of the endangered peat moss *Sphagnum angermanicum* in Sweden: a result of historic or contemporary processes? *The Bryologist* **108(2)**: 194-203.
- Gur-Arie, R., Cohen, C. J., Eitan, Y., Shelef, L., Hallerman, E. M. & Kashi, Y. (2000) – Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. *Genome Research*. **10**: 62-71.

- Hassel, K. & Gunnarsson, U. (2003) – The use of inter simple repeats (ISSR) in bryophyte population studies. *Lindbergia* **28**: 152-157.
- Hill, M. O. (1978) – Sphagnopsida. In: A.J.E. Smith (ed.), *The moss flora of Britain and Ireland*, pp. 30-78. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hongtrakul, V., Slabauch, M.B. & Knapp, J. (1998) – DFLP, SSCP, and SSR markers for 9-stearoyl-acyl carrier protein desaturases strongly expressed in developing seeds of sunflower: intron lengths are polymorphic among elite inbred lines. *Molecular Breeding*. **4**: 195-203.
- Huttunen, S. & Ignatov, M. S. (2004) – Phylogenetic analyses of Brachytheciaceae (Bryophyta) based on morphology, and sequence level data. *Cladistics* **20**: 151–183.
- Ignatov, M. S. Koponen, T. & Norris, D. H. (1999) – Bryophyte flora of the Huon Peninsula, Papua New Guinea. LXII. Brachytheciaceae (Musci), excluding *Homolothecium* and *Palamocladium*. *Acta Botanica Fennica* **165**: 23-72.
- Ignatov, M. S. & Huttunen, S. (2002) [2003] – Brachytheciaceae (Bryophyta) – family of sibling genera. *Arctoa* **11**: 229–244.
- Lara, F., Garilleti, R. & Mazimpaka, V. (1994) – New localities for *Rhynchostegium alopecuroides* (Brid.) A. J. E. Smith in the Iberian Peninsula. *Journal of Bryology* **18**: 200-202.
- Loeske, L. (1911) – Zur Moosflora von Füssen und Hohenschwangau. *Hedwigia* **50**: 210-248.
- Morgante, M., Hanafer, M. & Powell, W. (2002) – Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* **30**: 194-200.
- Newton, A. E., Cox, C. J., Duckett, J. G., Wheeler, J., Goffinet, B., Hedderson, T. A. J. & Mishler, B. D. (2000) – Evolution of the major moss lineages: phylogenetic analyses based on multiple gene sequences and morphology. *The Bryologist* **103**: 187–211.
- Nybom, H. (2004) – Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* **13**: 1143–1155.
- Panaud, O., Chen, X. & McCouch, S.R. (1995) – Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome* **38**: 1170-1176.

- Paulo, O. S., Jordan, W. C., Bruford, M. W. & Nichols, R. A. (2002) – Using Nested Clade Analysis to assess the history of colonization and the persistence of populations of an Iberian Lizard. *Molecular Ecology* **11**: 809–819
- Petit, R. J., Bordács, S., Csaikl, U. M., Burg, K., Coart, E., Cottrell, J., Dam, B., Deans, J. D., Dumolin-Lapègue, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Gillies, A., Glaz, I., Goicoechea, P. G., Jensen, J. S., König, A. O., Lowe, A. J., Madsen, S. F., Mátyás, G., Munro, R. C., Olalde, M., Pemongue, M-H., Popescu, F., Slade, D., Tabbener, H., Turchini, D., Vries, S. G. M., Ziegenhagen, B. & Kremer, A. (2002) – Chloroplast DNA Variation In European White Oaks Phylogeography And Patterns Of Diversity Based On Data From Over 2600 Populations. *Forest Ecology And Management* **156**: 5-26.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001) – *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Såstad, S. M. (1998) – Species delimitation and phylogenetic relationships within the *S. recurvum* complex (Bryophyta): genetic variation and phenotypic plasticity. Ph. D. dissertation. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology.
- Schneider, S.; Roessli, D. & Excoffier, L. (2000) – Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometric Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Séneca, A. (1999) – Estudo ecológico e biosistemático do género *Sphagnum* L. em Portugal. Dissertação de doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Séneca, A. (2003) – The genus *Sphagnum* L. in Portugal. *Cryptogamie Bryologie* **24**(2): 103-126.
- Séneca, A., Sérgio, C., Queiróz, P. & Mateus, J. (1992) – *Sphagnum auriculatum* Schimp. in Portugal with late Quaternary occurrences. *Orsis* **7**: 11-20.
- Shaw, A. J. (2000) – Molecular phylogeography and cryptic speciation in the mosses, *Mielichhoferia elongata* and *M. mielichhoferiana* (Bryaceae). *Molecular Ecology* **9**: 595-608.
- Shaw, A. J. (2000a) - Phylogeny of the Sphagnopsida based on chloroplast and nuclear DNA sequences. *The Bryologist* **103** (2): 277-306.
- Shaw, A. J. (2001) – Biogeographic patterns and cryptic speciation in bryophytes. *Journal of Biogeography* **28**: 253-261

- Shaw, A. J. & Allen, B. (2000) – Phylogenetic relationships, morphological incongruence, and geographic speciation in the *Fontinalaceae* (Bryophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **16** (2): 225-237.
- Shaw, A. J. & Goffinet, B. (2000) – Molecular evidence of reticulate evolution in the peatmosses (*Sphagnum*), including *S. ehyalinum*, *sp nov.*. *The Bryologist* **103** (2): 357-374.
- Shaw, A. J.; Cox, C. J. & Boles, S. B. (2003) – Global patterns in peatmoss biodiversity. *Molecular Ecology* **12**: 2553-2570.
- Shaw, J.; Cox, C. J. & Boles, S. B. (2004) – Phylogenetic relationships among *Sphagnum* sections, *Hemitheca*, *Isocladus*, and *Subsecunda*. *The Bryologist* **107**(2):189-196.
- Shaw, J. & Renzaglia, K. (2004) – Phylogeny and diversification of bryophytes. *American Journal of Botany* **91**(10): 1557–1581.
- Shaw, A. J.; Melosik, I.; Cox, C. J. & Boles, S. B. (2005) – Divergent and Reticulate Evolution in Closely Related Species of *Sphagnum* Section *Subsecunda*. *The Bryologist* **108**(3): 363-376
- Stech, M. & Wagner, D. (2005) – Molecular relationships, biogeography, and evolution of Gondwanan *Campylopus* species (Dicranaceae, Bryopsida). *Taxon* **54**, 377-382.
- Stenøien, H. K. (2002) – Bryophyte species and population concepts in relation to molecular markers. *Lindbergia* **27**: 134-140
- Stenøien, H. K & Sæstad, S. M. (1999) – Genetic structure in three haploid peat mosses (*Sphagnum*). *Heredity* **82**: 391-400.
- Swofford, D. L. (2000) – PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Sundberg, S. (2000) – The ecological significance of sexual reproduction in peat mosses (*Sphagnum*). Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 581, 37 pp. Uppsala.
- Trojanowska, M. R. & Bolibok H. (2004) – Characteristics and a Comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in Plants. *Cellular & Molecular Biology Letters* **9**: 221-238

- van der Knaap, W. O. & van Leeuwen, J. F. N. (1995) – Holocene vegetation succession and degradation as responses to climate change and human activity in the Serra de Estrela, Portugal. *Review of Paleobotany and Palynology* **3**: 153-211.
- Van der Velde M, Van de Zande L, Bijlsma R. (2001) – Genetic structure of *Polytrichum formosum* in relation to the breeding system as revealed by microsatellites. *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 288–295.
- Vanderpoorten, A., Hedenäs, L., Cox, C. J. and Shaw, A. J. (2002) – Circumscription, classification, and taxonomy of the *Amblystegiaceae* (Bryopsida) inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data and morphology. *Taxon* **51**: 115–122.
- Vanderpoorten, A., Hedenäs, L. & Jacquemart, A. (2003) - Differentiation in DNA fingerprinting and morphology among species of the pleurocarpous moss genus, *Rhytidiadelphus* (Hylocomiaceae). *Taxon* **52**: 229-236.
- Vanderpoorten, A., Cox, C. J., Shaw, A. J. (2004) – Evolution of multiple paralogous adenosine kinase genes in the moss genus *Hygroamblystegium*: phylogenetic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**: 505-516
- Vanderpoorten, A. & Jacquemart, A. L. (2004) – Evolutionary mode, tempo, and phylogenetic association of continuous morphological traits in the aquatic moss genus *Amblystegium*. *Journal of Evolutionary Biology* **17** (2): 279-287.
- Warnstorf, C. (1911) – Sphagnales-Sphagnaceae (Sphagnologia Universalis). In Engler, H. G. A (Ed.), *Das Pflanzenreich Regni vegetabilis conspectus* **51**: 1-546. Leipzig.
- Wehr, J. D. & Whitton, B. A. (1986) – Ecological factors relating to morphological variation in the aquatica moss *Rhynchostegium riparioides* (Hedw.) C. Jens. *Journal of Bryology* n: 269-280.
- Werner, O., Ros, R. M., Guerra, J. & Shaw, J. (2003) – Molecular data confirm the presence of *Anacolia menziesii* (Bartramiaceae, Musci) in Southern Europe and its separation from *Anacolia webbii*. *Systematic Botany* **28** (3): 483-489
- Werner, O., Ros, R. M., Guerra, J & Cano, M. (2004) – Inter-Simple Repeat (ISSR) markers support the species status of *Weissia wimmeriana* (Sendtn.) Bruch & Schimp. (Pottiaceae, Bryopsida). *Cryptogamie Bryologie* **25**(2): 137-146.

- Werner, O., Ros, R.M. & Grundmann, M. (2005a) – Molecular phylogeny of Trichostomoideae (Pottiaceae, Bryophyta) based on nrITS sequence data. *Taxon* **54**: 361-368.
- Werner, O., Jimenez, J.A., Ros, R.M., Cano, M.J. & Guerra, J. (2005b) – Preliminary investigation of the systematics of *Didymodon* (Pottiaceae, Musci) based on nrITS sequence data. *Systematic Botany* **30**:461-470.
- Willerslev, E., Hansen, A. J., Binladen, J., Brand, T. B., Gilbert, M. T. P., Shapiro, B., Bunce, M., Wiuf, C., Gilichinsky, D. A. & Cooper, A. (2003) – Diverse Plant and Animal Genetic Records from Holocene and Pleistocene Sediments. *Science* **300**: 791-795 .

6.2 Bibliografia secundária

- Andrews, A. L. (1913) – Order Sphagnales. *North American Flora* **15**: 1-31.
- Andrews, A. L. (1959) – Notes on North American *Sphagnum*. XI. *Sphagnum subsecundum*. *The Bryologist* **62**: 87-96.
- Capesius, I. & Stech, M. (1997) –. Molecular relationships within mosses based on 18S rDNA gene sequences. *Nova Hedwigia* **64**: 525-533.
- Casares-Gil, A. (1925) - Los Esfagnales de la Península Ibérica. Madrid : Museo nacional de ciencias naturales.
- Corley, M. F. V.; Crundwell, A. C.; Duell, R.; Hill, M. O. & Smith, A. J. E. (1981) – Mosses of Europe and the Azores: an annotated list of species with synonyms from the recent literature. *Journal of Bryology* **1**: 609-689.
- Corley, M. F. V. & Crundwell, A. C. (1992) – Additions and amendments of the mosses of Europe and Azores.
- Crum, H. A. (1984) – Sphagnopsida, Sphagnaceae. *North American Flora Ser. II, Part 11*: 1-180.
- Dirkse, G. M. & Isoviita, P. (1986). *Sphagnum denticulatum* an older name for *S. auriculatum*. *Bryol. Notes. Journal of Bryology* **14**(2): 388-389.
- Duell, R. (1985) – Distribution of the European and Macaronesian mosses (Bryophytina). II. *Bryologische beitrage*. Ed. I. Duell Hermanns, Rheurdt.

- Flatberg, K. I. (1985) – Taxonomy of crispate morphotypes in *Sphagnum* Sect. *Subsecunda*. *Lindbergia* 11: 99-113.
- Flatberg, K. I. (1986) – Taxonomy, morphovariation, distribution and ecology of the *Sphagnum imbricatum* complex with main reference to Norway. *Gunneria* 54: 1- 118 pp.
- Flatberg, K. I. (1994) – *Sphagnum tundrae*, a new species in Sect. *Squarrosa* from the Arctic. *Lindbergia* 19: 3-10.
- Fleischer, M. (1923) – Die Musci der Flora von Buitenzorg (Zugleich Laubmoosflora von Java), 4: 1536–1566. Ed. J. Brill, Leiden.
- Goossens, M. & De Sloover, J. (1981) – Étude taxonomique et synécologique des espèces du genre *Sphagnum* section *Subsecunda* dans une tourbière de Haute Ardenne. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belgique* 114: 89-105.
- Grout, A. J. (1928) - Moss flora of North America and North of Mexico, vol. II part 1. Published by author, New York.
- Gupta, V. S.; Ramakrishna, W.; Rawat, S. R. & Ranjekar, P. K. (1994) – (CAC)5 detects DNA fingerprints and sequences homologous to gene transcripts in rice. *Biochemistry Genetics* 32:1-8 .
- Hedenäs, L. (1989) – Some neglected character distribution patterns among the pleurocarpous mosses. *The Bryologist* 92: 157-163.
- Hedenäs, L. (1996) – On the interdependence of some leaf characters within the *Drepanocladus aduncus-polycarpus* complex. *Journal of Bryology* 19: 311-324.
- Hill, M. O. (1975) – *Sphagnum subsecundum* Nees and *S. auriculatum* Schimp. in Britain. *Journal of Bryology* 8: 435-441.
- Ignatov, M. S. (1999) – On pseudoparaphyllia in Brachytheciaceae and Meteoriaceae (Musci). *Acta Botanica Fennica* 165: 73-84.
- Isoviita, P. (1966) - Studies on *Sphagnum* L. I. Nomenclatural revisions of the European taxa. *Ann. Bot. Fenn.* 7: 157-162.
- Kindberg, N. C. (1897) – Species of European and Northamerican Bryinae (Mosses). Part 1. *Pleurocarpous*. Linköping Lithografiska Aktiebolag, Linköping.

Loeske, L. (1911) – Zur Moosflora von Füssen und Hohenschwangau. *Hedwigia* **50**: 210-248.

Krzakowa, M. & I. Melosik (eds.). (2000) - The variability in Polish populations of *Sphagnum taxa* (Subsecunda section), according to morphological, anatomical and biochemical traits. Krzakowa, M. & I. Melosik (Eds.). Poznan, Poland: Bogucki Wydawnictwo Naukowe S.C.

La Farge-England, C. (1996) – Growth form, branching pattern, and perichaetial position in mosses: cladocarp and pleurocarpy redefined. *The Bryologist* **99**: 170–186.

McQueen, C. B. (1989) – A biosystematic study of *Sphagnum capillifolium sensu lato*. *The Bryologist* **92**: 1-24.

Melosik, I. (2000) – Morphological and anatomical variation of *taxa* belonging to the *Subsecunda* section of the *Sphagnum* genus, as presented by materials collected in Poland, pp. 61–109. In M. Krzakowa & I. Melosik (eds.) 2000. *The Variability in Polish Populations of Sphagnum Taxa (Subsecunda section), according to Morphological, Anatomical and Biochemical Traits*. Bogucki Wydawnictwo Naukowe S.C., Poznan, Poland.

Nei, M. & Li, W. H. (1979) – Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A* **76**: 5269–5273.

Nyholm, E. (1969) – Illustrated Moss Flora of Fennoscandia II. Musci Fasc. 6. National Science Research Council, Stockholm. Pp. 647-799.

Podpěra J. (1954) – *Conspectus Muscorum Europeaeorum*. Československé Akademie, Praha.

Rahman, S. M. A. (1972) – Taxonomic investigations on some british Sphagna.I.- *Sphagnum subsecundum sensu lato*. *Journal of Bryology* **7**: 169-179.

Russow (1894) – Archiv für die Naturkunde Liv-, Ehst- und Kurlands, Serie 2, *Biologische Naturkunde* **10**: 509

Robinson, H. (1962) – Generic revisions of North American Brachytheciaceae. *The Bryologist* **65**(2): 73–146.

Robinson, H. (1967) – Preliminary studies on the bryophytes of Colombia. *The Bryologist* **70**: 1–61.

Robinson, H. (1987) – Notes on generic concepts in the Brachytheciaceae and the new genus *Steeerucleus*. *Memoirs of The New York Botanical Garden* **45**: 678–681.

- Schimper, W. P. (1876) – Synopsis Muscorum Europaeorum, praemissa introductione de elementis bryologicis tractante. Ed. 2. Sumptibus Librariae E. Schweizerbart (E. Koch), Stuttgart.
- Vitt, D. H. (1984) – *Classification of the Bryopsida*. In: Schuster, R. M. (ed.), New manual on bryology, vol. 2: 696–759. Hattori Botanical Laboratory, Nichinan.
- Vitt, D. H. & Glime, J. (1984) – The structural adaptations of aquatic Musci. *Lindbergia* **10**: 95–110.
- Vitt, D. H. & Andrus, R. E. (1997) – The genus *Sphagnum* in Alberta. *Canadian Journal of Botany* **55**: 331-357.
- Warnstorf, C. (1905) – Kryptogamenflora der Mark Brandenburg. Laubmoose. 2. Bontraeger, Berlin.

ANEXO I

Lista do material de *Sphagnum* utilizado. Depois de atribuído um código a cada local, as amostras foram referidas como a combinação de uma sigla para o local, população e amostra.

Código da população	Localidade	Habitat	U.T.M.	Data de coleção	Colector	Herbário	Determinado por:	Especie	Código da amostra
ALSPTR	Alcácer do Sal, Estrada Alcácer do Sal - Comporta, 6 Km de Cachopo	Margem de linha de água que sai da lagoa, Solo de pinhal com areia	29SNC2250	01.04.1992	A. Séneca	LISU 151(a)		<i>S. auriculatum f. obesum</i>	ALS1a
	Península de Tróia - Entre Comporta e Herdade dos Cachopos		29SNC2949	01.04.1992	A. Séneca	LISU 151	A. Séneca	<i>S. auriculatum</i>	ALS1b
ALV	Serra do Alvão - Regato do Cabril	Parede ressumante na margem do ribeiro	29TPF0479	12.07.2003	C. C. Vieira	PO 5383	M. Ricca & A. Séneca	<i>S. auriculatum</i>	ALV1a
ARG	Serra da Arga - Rib. Corguinha	Parede ressumante na margem do ribeiro	29TNG2232	20.08.2003	C. C. Vieira & H. Hespanhol	PO 5400 PO 5405	M. Ricca & A. Séneca	<i>S. auriculatum f. obesum</i> <i>S. subsecundum</i> ssp. <i>inundatum</i>	ARG1a ARG1b
CBA	Serra da Cabreira - Chã do Breiro	Zona turfosa	29TNG7910	08.10.2003	H. Hespanhol, M.	PO 5409	M. Ricca & A. Séneca	<i>S. auriculatum</i>	CBA1a
CBI	Paredes de Coura - Corno do Bico - Ric Mau	Solo turfoso	29TNE3594	05.06.2003	A. Séneca, C. C. Vieira & H. Hespanhol	PO 4575		<i>S. auriculatum f. obesum</i>	CBI1a
						PO 4576		<i>S. auriculatum f. crassiciadum</i>	CBI1b
						PO 4578		<i>S. auriculatum</i>	CBI1c
			PO 4800a				<i>S. auriculatum f. crassiciadum</i>	CBI1d	
EIX	Eixo Vale da Azurva	Turfeira muito degradada	29TNE3597	25.02.2004	A. Séneca & M. Ricca	PO			EIX1a
						PO			EIX1r
EST	Serra da Estrela - Fonte da Cananiza	"Carril" de Alnus e Myrica no solo, associado a <i>Molinia</i> muito abundante	29TPE1669	24.09.2004	F. Alves & Azevedo	PO	A. Séneca	<i>S. subsecundum</i> ssp. <i>inundatum</i>	EIX2a
						PO	M. Ricca & A. Séneca	<i>S. auriculatum</i>	EST1r
						PO		<i>S. auriculatum</i>	EST2b

Código da população	Localidade	Habitat	UTM	Data de colecção	Colector	Herbário	Determinado por	Especie	Códigos da amostra
						PO		<i>S. auriculatum</i>	EST2c
	Serra da Freita - Rio Teixeira		29TNG6619	24.09.2003	C. C. Vieira	PO 5398		<i>S. auriculatum</i>	FRE 3
						PO	M. Ricca & A. Seneca	<i>S. auriculatum</i>	FRE 4a
FRE	Serra da Freita - Portela da Anta	Linha de água temporária muito calma	29TNG6023	25.02.2004	A. Seneca & M. Ricca	PO		<i>S. auriculatum</i>	FRE 4j
						PO		<i>S. auriculatum</i>	FRE 5a
						PO		<i>S. auriculatum</i>	FRE 5j
GER	Serra do Gerês - Fonte das Letras		29TNG7219	03.04.2003	A. Seneca, C. C. Vieira & H. Hespagnol	PO 4320	M. Ricca & A. Seneca	<i>S. subsecundum</i>	GER1a
	Serra do Gerês - Mata da Albergaria		29TNG7127	08.10.2003		PO 5367	Seneca	<i>S. auriculatum</i>	GER2a
						PO		<i>S. subsecundum ssp. inundatum</i>	LOU1a
LOU	Serra da Lousã - Caminho para Pena	Linha de água junto à ressumância	29TNE7340	25.05.2004	P. Alves, T. Azevedo, M. Ricca & I. Rocha	PO	M. Ricca & A. Seneca	<i>S. auriculatum</i>	LOU1m
						PO		<i>S. auriculatum</i>	LOU2a
						PO		<i>S. auriculatum</i>	LOU2j
MAL	Maia - Siva Escura	Saigueiral palustre	29TNF3566	20.06.2004	P. Alves	PO	M. Ricca & A. Seneca	<i>S. auriculatum</i>	MAL1a
	Montalegre - S. do Larouco	Área alagada junto a um bosque de <i>Quercus pyrenaica</i> e de um lameiro	29TPG03	10.05.1989	A. Seneca	PO 224	A. Seneca	<i>S. subsecundum ssp. inundatum</i>	MAL1a
MAM	Serra S. Mamede - Feteirinha	Turfeira com <i>Molinia</i> , <i>Erica tetralix</i> e <i>Pinguicula lusitanica</i>	29TPD4150	30.05.2004	P. Alves, T. Azevedo, M. Ricca & I. Rocha	PO	M. Ricca & A. Seneca	<i>S. auriculatum</i>	MAM1a
						PO	Seneca	<i>S. auriculatum</i>	MAM1r
						PO		<i>S. auriculatum</i>	MAM1s

Código da população	Localidade	Habitat	Data de colectação	Colector	Herbário	Determinado por	Especie	Códigos da amostra
MIN	Mindeio	Lagoa	29TIN2373	A. Lomba	PO	M. Ricca & A. Seneca	<i>S. auriculatum</i>	MIN11
	Moleiro do Minho, Azevedo	Nos taludes rochosos da beira da estrada florestal, junto a encosta queimada	29TING13	A. Seneca	PO 292 (dupl)	A. Seneca	<i>S. auriculatum</i>	MIN1a
MNT	Serra de Montemuro, Cinfães	Pimeiró	29TIN8243		PO	M. Ricca & A. Seneca	<i>S. auriculatum f. obtusum</i>	MNT1a
	Serra da Peneda, Ponte, Adrião	Vale	29TING8140	H. Hespanhol	PO 4338		<i>S. auriculatum f. crassicaudum</i>	PEN1a
PEN	Serra da Peneda, S. ^a da Peneda	Pedras junto a um ribeiro	29TING6447	H. Hespanhol	PO 4662		<i>S. auriculatum</i>	PEN2a
	Serra da Peneda, Ponte da Minhoiteira, Entre Cella e Parada do Monte		29TING6155		PO	M. Ricca & A. Seneca	<i>S. auriculatum</i>	PEN3a
PEN	Serra da Peneda, Entre Azureira e Lapela		29TING6758		PO		<i>S. auriculatum</i>	PEN4a
	Serra da Peneda, Casiro Laboreiro	Turfeira da coiga das Banhas	29TING5871	A. Seneca, C. Vieira, H. Hespanhol	PO 5344		<i>S. auriculatum</i>	PEN5a
PEN	Serra da Peneda, Arcos de Valdevez, Lamas do Vez		29TING5844	A. Seneca	PO 637	A. Seneca	<i>S. auriculatum</i>	PEN6a
	Serra da Peneda, Casiro Laboreiro, Lamas de Mour, Chã da Coutada		29TING6655	A. Seneca	PO 643	A. Seneca	<i>S. subsecundum ssp. inundatum</i>	PEN7a

Código da população	Localidade	Habitat	UTM	Data de colectação	Colector	Herbário	Determinado por	Especie	Códigos da amostra
PTL	Ponte de Lima	Lagoa de Bertandós	29TNG3023	06.06.2004	T. Azevedo	PO	M. Ricca & A. Seneca	<i>S. auriculatum</i> f. <i>obesum</i>	PTL1a PTL1g
SMF	Sª Mª da Feia	Ponte Carvoeiro	29TNF4744	22.06.2004	P. Alves, T. Azevedo & M. Ricca	PO	M. Ricca & A. Seneca	<i>S. auriculatum</i> <i>S. auriculatum</i>	SMF1a SMF1h SMF1v
SGO	Serra de Gois	Lanhelas	29TNG13	10.01.1990	A. Seneca	PO 306 (dupl.)	A. Seneca	<i>S. auriculatum</i>	SGO1a
SVO	Sever de Vouga	Mãinas do Braçal	29TNF5009	26.07.2003	C. C. Vieira	PO 5388 PO 5390	M. Ricca & A. Seneca	<i>S. auriculatum</i> <i>S. auriculatum</i>	SVO1a SVO1b
VAL	Valongo	Caminho para Couce	29TNF4358	16.03.2004	T. Azevedo, J. Marques, M. Ricca, C. C. Vieira	PO			VAL2a VAL2j VAL4d
VLR	Vila Real	Vale Campeã	29TNF5671	20.06.1994	A. Seneca	PO 606	M. Ricca & A. Seneca	<i>S. auriculatum</i>	VLR1a
VNC	Vila Nova de Cerveira	Cerveira	29TNG3343	2002		PO	M. Ricca & A. Seneca	<i>S. auriculatum</i>	VNC1a

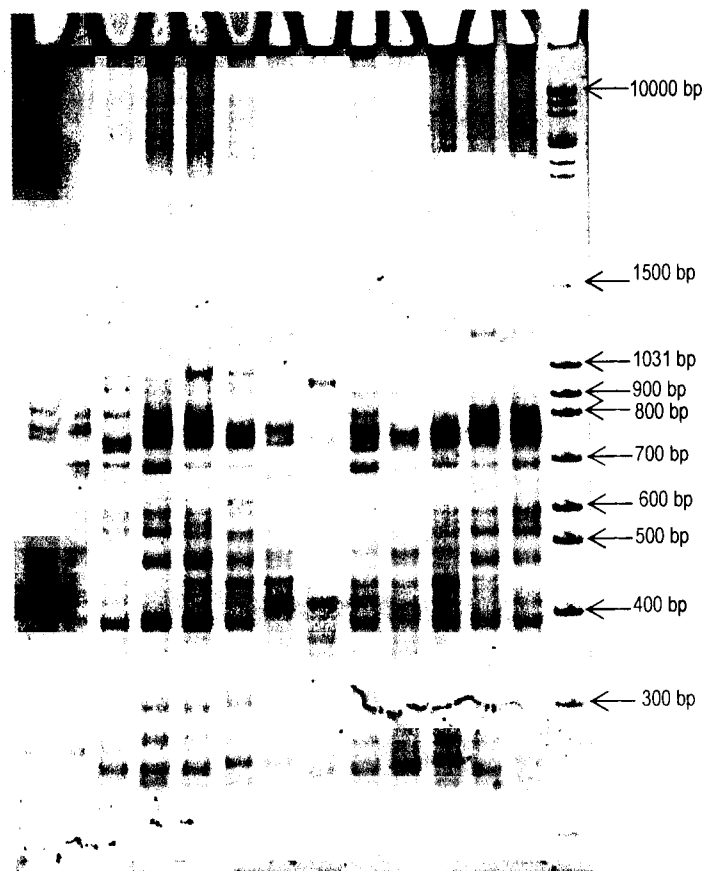
Código do espécime	Localidade	Ecologia	Data da coleção	Colector	Herbário	Nº de coleção	Determinado por	Identificação do herbário (sinónimos descritos em baixo)
		ribeiro				Collection		A. J. E. Smith
PPL18	Portugal, Douro, Ermida		2004	M. I. Silva	(LISU)	RHS Collection	M. I. Silva	<i>Rhynchosstegium alopecurooides</i> (Brid.) A. J. E. Smith
PPL19a	Portugal, Rio Vouga, Prata da Vau		08.08.2004	M. I. Silva	(LISU)	RHS Collection	M. I. Silva	<i>Rhynchosstegium alopecurooides</i> (Brid.) A. J. E. Smith
PPL20	Portugal, Serra do Gerês, Rio Froufe	Ribeiro Pedregoso	06.05.2003	C. C. Vieira	(PO)	4387-CIBIO	C. C. Vieira	<i>Rhynchosstegium Bruch & Schimp.</i>
PPL21	Portugal, Serra do Alvão, Rio Marão	Pedras na ribeira	21.07.2004	C. C. Vieira	(PO)	6685-CIBIO	C. C. Vieira	<i>Rhynchosstegium alopecurooides</i> (Brid.) A. J. E. Smith
PPL22	Portugal, Serra de Montemuro, Rio das Poldras	Rochas de ribeiro	23.08.2004	C. C. Vieira	(PO)	7229a-CIBIO	C. C. Vieira	<i>Rhynchosstegium alopecurooides</i> (Brid.) A. J. E. Smith
PPL23	Portugal, Serra do Gerês, Caldas do Gerês	Sobre as pedras do rio	08.1920	A. Machado	(PO)	1900-B	A. Machado	<i>Rhynchosstegium alopecurooides</i> (Brid.) A. J. E. Smith
SEPR1	Sérvia, Valjevo, Petnica surrounding	Rocha calcária, sombra, numa floresta de <i>Quercus</i> spp.	29.06.1996	M.Sabovljevic	(LISU)	134	C. Sérgio & M.Sabovljevic	<i>Rhynchosstegium alopecurooides</i> (Brid.) A. J. E. Smith
SPR2	Espanha, Santander, Camaleño, Invernes de Mato, Las Ilces	Rocha calcária do rio	08.06.1994	C. Sérgio	(LISU)	9238	C. Sérgio & Casas Jens	<i>Rhynchosstegium riparioides</i> (Hedw.) C.

(Sinónimos de *Platyhypnidium lusitanicum* (Schimp.) Ochyra & Bednarek-Ochyra: *Rhynchosstegium lusitanicum* (Schimp.) A. J. E. Smith, *Eurhynchium rusciforme* Milde var. *alopecuroides* Brid., *Hygrohypnum lusitanicum* (Schimp.) Corb., *Hygrohypnum lusitanicum* (Schimp.) Corb., *Platyhypnidium rusciforme* (Neck.) Fleisch. var. *alopecuroides*, *Rhynchosstegium lusitanicum* (Schimp.) A. J. E. Smith, *Rhynchosstegium alopecurooides*(Brid.), *Platyhypnidium riparioides* (Hedw.) Dix. var. *alopecuroides* (Brid.), *Rhynchosstegium rusciforme* Br. et Schp. var. *lusitanicum*. Sinónimos de *Platyhypnidium riparioides* (Hedw.) Dixon: *Rhynchosstegium riparioides* (Hedw.) (Hedw.) Card., *Eurhynchium riparioides* (Hedw.) Jennings., *Rhynchosstegium riparioides* (Hedw.) C. Jens, *Platyhypnidium rusciforme*, *Rhynchosstegium riparioides* (Hedw.) Card.).

ANEXO III

Fotografias de electroforese dos produtos de PCR em amostras do complexo de *Sphagnum subsecundum*.

Primer 808:



Gel de poliacrilamida corado com brometo de etídeo, representando uma electroforese dos produtos obtidos a partir do PCR do primer 808 em amostras de *Sphagnum*. As bandas cujo peso molecular está assinalado correspondem ao marcador de pesos moleculares (SM0403 Fermentas™), que correu na pista da direita.

As bandas consideradas neste trabalho tinham os seguintes pesos moleculares:

Banda 1: ~760 bp

Banda 2: ~740 bp

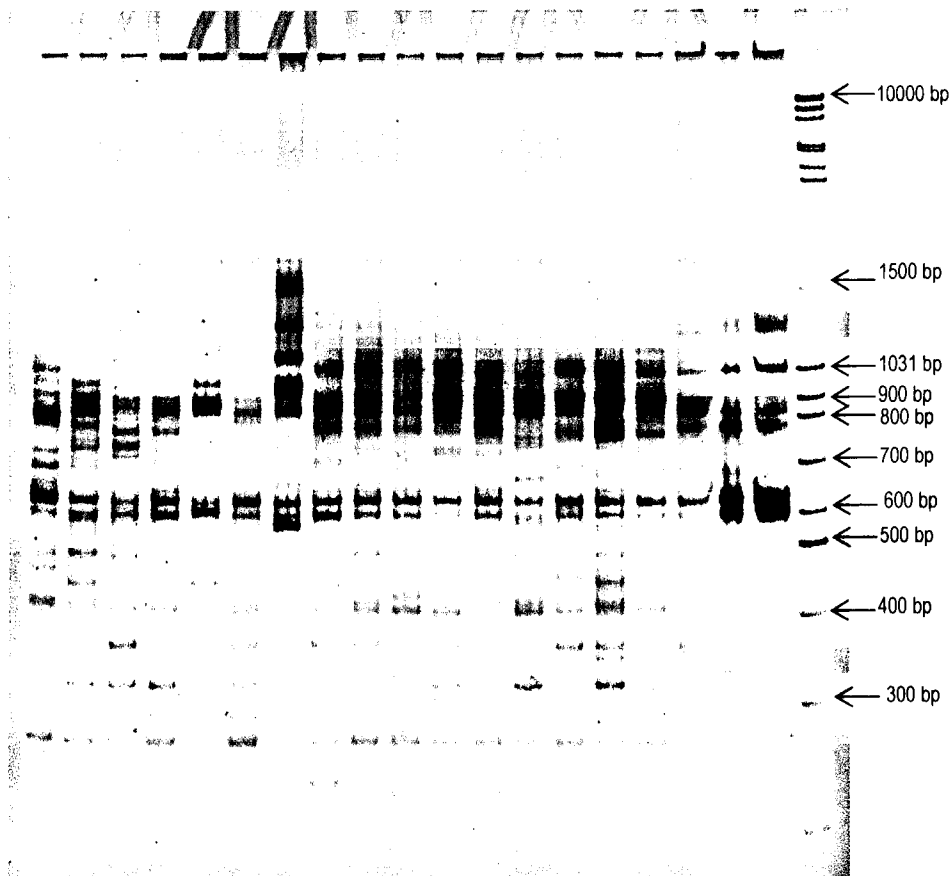
Banda 3: ~690 bp

Banda 4: ~390 bp

Banda 5: ~370 bp

Banda 6: ~350 bp

Primer 873:



Gel de poliacrilamida corado com brometo de etídeo, representando uma electroforese dos produtos obtidos a partir do PCR do primer 873 em amostras de *Sphagnum*. As bandas cujo peso molecular está assinalado correspondem ao marcador de pesos moleculares (SM0403 Fermentas™), que correu na pista da direita.

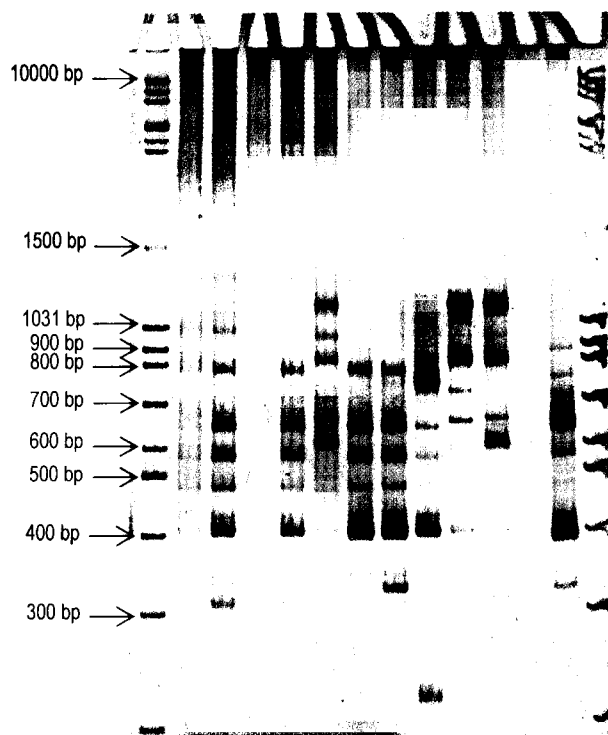
As bandas consideradas neste trabalho tinham os seguintes pesos moleculares:

- Banda 1: ~680 bp
- Banda 2: ~640 bp
- Banda 3: ~610 bp
- Banda 4: ~580 bp
- Banda 5: ~430 bp
- Banda 6: ~420 bp
- Banda 7: ~400bp

ANEXO IV

Fotografias de electroforese dos produtos de PCR em amostras de *Platyhypnidium lusitanicum* e *P. riparioides*.

Primer 825:



Gel de poliacrilamida corado com brometo de etideo, representando uma electroforese dos produtos obtidos a partir do PCR do primer 825 em amostras de *Platyhypnidium*. As bandas cujo peso molecular está assinalado correspondem ao marcador de pesos moleculares (SM0403 Fermentas™), que correu nas pistas da esquerda e direita.

As bandas consideradas neste trabalho tinham os seguintes pesos moleculares:

Banda 1: ~780 bp

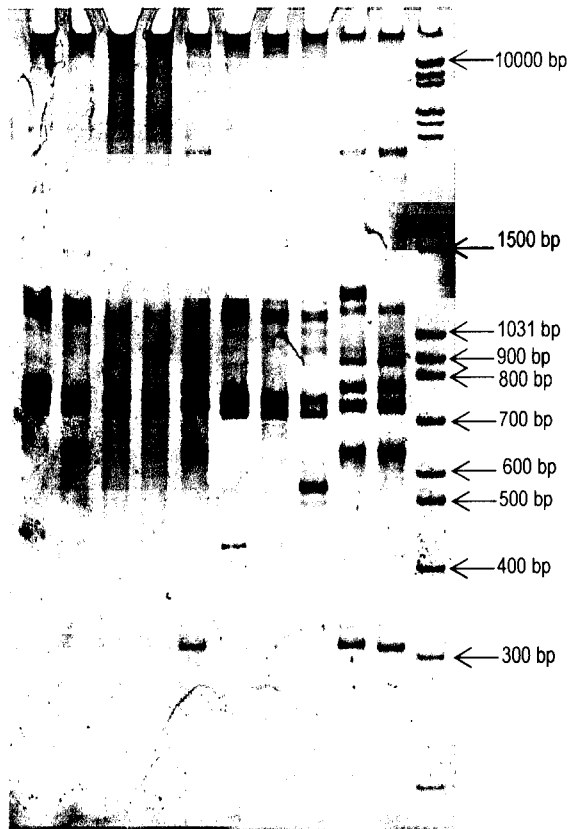
Banda 2: ~640 bp

Banda 3: ~560 bp

Banda 4: ~475 bp

Banda 5: ~400 bp

Primer 873:



Gel de poliacrilamida corado com brometo de etídeo, representando uma electroforese dos produtos obtidos a partir do PCR do primer 873 em amostras de *Playthyridium*. As bandas cujo peso molecular está assinalado correspondem ao marcador de pesos moleculares (SM0403 Fermentas™), que correu na pista da direita.

As bandas consideradas neste trabalho tinham os seguintes pesos moleculares:

Banda 1: ~777 bp

Banda 2: ~750 bp

Banda 3: ~732 bp

Banda 4: ~720 bp