

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

LILIANE GALLINDO DANTAS DE OLIVEIRA

**ANÁLISE FILOGEOGRÁFICA DE DUAS ESPÉCIES ARBÓREAS
OCORRENTES NO CERRADO: RELAÇÃO ENTRE OS CERRADOS
CENTRAL E MARGINAIS**

RECIFE

Junho de 2014

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

LILIANE GALLINDO DANTAS DE OLIVEIRA

**ANÁLISE FILOGEOGRÁFICA DE DUAS ESPÉCIES ARBÓREAS
OCORRENTES NO CERRADO: RELAÇÃO ENTRE OS CERRADOS
CENTRAL E MARGINAIS**

Tese apresentada por Liliane Gallindo Dantas de Oliveira como requisito para obtenção do grau de Doutora em Biologia Vegetal (área de concentração em Ecologia Vegetal) pelo curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFPE

Orientadora: Prof^a Andrea Pedrosa Harand
(Depto. de Botânica, UFPE)

RECIFE

Junho de 2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Oliveira, Liliane Gallindo Dantas de
Análise filogeográfica de duas espécies arbóreas ocorrentes no cerrado: relação entre os cerrados central e marginais/ Liliane Gallindo Dantas de Oliveira– Recife: O Autor, 2014.

101 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Andrea Pedrosa Harand

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas, Biologia Vegetal, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Árvores 2. Filogeografia 3. Cerrados- Brasil I. Harand, Andrea Pedrosa (orientadora) II. Título**

582.16

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-92

LILIANE GALLINDO DANTAS DE OLIVEIRA

**"ANÁLISE FILOGEOGRÁFICA DE DUAS ESPÉCIES ARBÓREAS
OCORRENTES NO CERRADO: RELAÇÃO ENTRE OS CERRADOS
CENTRAL E MARGINAIS"**

APROVADA EM 27/06/2014

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Andrea Pedrosa Harand (orientadora) - UFPE

Dr^a Maristerra Rodrigues Lemes - Jardim Botânico RJ

Dr^a Adna Cristina Barbosa de Sousa - UFPB

Dr^a Ana Maria Benko-Iseppon - UFPE

Dr^a Nívea Dias dos Santos - UFPE

Recife - PE

2014

"Sonho que se sonha junto...."

A todos que sonharam comigo

Dedico

AGRADECIMENTOS

“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem; a segunda é vivê-la como se tudo fosse um milagre.”

(Albert Einstein)

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, que me deu a oportunidade de concluir com sucesso mais essa etapa de minha vida.

Gostaria de agradecer aos meus pais, que sempre me apoiaram em minhas decisões científicas e não-científicas, e ao meu irmão, por estar constantemente me lembrando, através de suas perguntas, do conhecimento que um biólogo deve ter e da responsabilidade que isto traz. À minha família, por continuar ao meu lado me apoiando mesmo depois de tanta ausência, em especial à minha tia Valdice, por todo o apoio que recebi desde o começo de minha vida acadêmica. Amo todos vocês!

Ao meu marido, Júnior, que sabe como ninguém o quanto de suor e de lágrimas há por trás dessas páginas. Sem você elas simplesmente não existiriam. Obrigada por tudo, mais uma vez. Te amo! E à minha “família agregada”, que quer em Cupira, em Panelas ou mesmo em Recife, entenderam minha ausência e me incentivaram. Muito obrigada a todos!

À minha orientadora, Andrea Pedrosa Harand, por aceitar mais esse desafio (e que desafio!). Em muitos momentos foi difícil, eu sei, mas teria sido impossível sem você para me manter de pé.

Aos meus amigos de trabalho, que tornaram os momentos no laboratório divertidos e prazerosos, como todo trabalho deveria ser. Em especial aos companheiros da "velha geração", Artur, Magda, Sandra, Mariana, André, Lucas, Tiago E. e Tiago R., com quem já vivi tantos "causos" no lab que não caberiam nessa tese. E a Dani, por uma palavra bem escolhida e um abraço no momento certo. A Marcelo Guerra, que está sempre disposto a nos aconselhar e ajudar. Foi realmente um prazer conviver com o senhor nos últimos dez anos! E Ana Emília, que será, para mim, sempre do lab!

Às minhas eternas amigas Bella, Ju, Lia e Nanda. Uma vez eu vi alguém dizer que a vida trata de separar mesmo os bons amigos, mas que se alguém realmente, realmente vale a pena para você, você encontrará um jeito de mantê-lo por perto. Obrigada por manter minha sanidade!! ;) Amo vocês!

A todos que me ajudaram nas coletas, ou que realizaram alguma coleta por mim, mas em especial: Gustavo Maruyama Mori, Ana Paula Moraes, Felipe Amorim, Mariana Telles, Wolfgang Harand e aos gestores das Unidades de Conservação. A Luís Gustavo Rodrigues de Souza, Markus Ruhsam, Linda Neaves, Ana Maria Benko-Iseppon e João Pacífico Bezerra Neto pelo apoio na análise dos dados. E à curadora do nosso herbário, Marlene Barbosa, pelas inúmeras consultas e conversas.

A todos os professores que nos passaram um pouquinho de sua sabedoria durante as disciplinas. Vocês, nossos mestres, são peças-chave no futuro da ciência.

Aos funcionários da Pós-Graduação Hidelbrando (cazá, cazá! – brincadeira!), e Adriano: muito obrigada por todas as broncas quebradas, conselhos dados e ajudas em cima da hora. Vocês não têm idéia de quanto são importantes para nós!

Às agências de financiamento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através da qual recebi minha bolsa de doutorado, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através da qual recebi minha bolsa de doutorado-sanduíche, e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e a Fundação Grupo Boticário de Proteção à Natureza pelo suporte financeiro, que financiaram este projeto.

Por fim, a todos os brasileiros que, ao pagarem seus impostos, garantem que a educação PÚBLICA e de QUALIDADE continue sendo fornecida pela Universidade.

Muito obrigada!

RESUMO

O Cerrado é o segundo maior domínio fitogeográfico do Brasil e apresenta uma distribuição descontínua com diferentes composições florísticas e fisionomias. É rico em endemismos, mas vem sofrendo forte degradação, sendo considerado um dos 34 *hotspots* mundiais para conservação. O presente estudo analisou populações de duas espécies arbóreas de ampla distribuição no Cerrado, a fim de compreender suas relações filogeográficas e contribuir para sua conservação. As espécies analisadas, *Alibertia edulis* (Rubiaceae) e *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae), mostraram diferenciação significativa entre as populações quando analisadas por sequenciamento de três regiões plastidiais (*matK*, *psbA-trnH* e *ndhF*). As populações de *A. edulis* foram divididas por uma barreira norte-sul mais a oeste que a previamente proposta para o Cerrado, sugerindo um gradiente leste-oeste na distribuição da diversidade genética. Para ambas as espécies, as populações de Cerrados considerados "marginais" não são uma expansão recente do Cerrado central, com haplótipos compartilhados ou derivados do mesmo, mas apresentaram haplótipos exclusivos, por vezes ancestrais. Para evitar a perda irreparável de parte da diversidade do Cerrado, é recomendada a implantação de UCs nos Cerrados do Piauí e Pará, mais diferenciados e sob maior risco de degradação. Adicionalmente, o presente estudo desenvolveu microssatélites (SSR) nucleares para a espécie *A. edulis*, a fim de fornecer marcadores polimórficos para auxiliar em estudos populacionais. Para testes de polimorfismo, indivíduos do Piauí e Mato Grosso foram utilizados, revelando valores mais altos de endocruzamento na primeira população, os quais podem estar associados ao seu longo isolamento. Tais marcadores serão importantes ferramentas para análises populacionais e filogeográficas em *A. edulis*.

Palavras-chave: cpDNA, *Qualea grandiflora*, *Alibertia edulis*, isolamento, Pleistoceno

ABSTRACT

The Cerrado is the second largest fitogeographic Brazilian domain and presents a discontinuous distribution, with different floristic compositions and physiognomies. It is rich in endemic species, but has been suffering strong degradation, being considered one of the 34 hotspots for world conservation. The present study has analyzed populations of two tree species widely distributed in the Cerrado, in order to better understand their phylogeographic relationships and contribute to the Cerrado conservation. The analyzed species, *Alibertia edulis* (Rubiaceae) and *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae), showed significant differentiation among populations by plastid DNA sequencing (*matK*, *psbA-trnH* and *ndhF*). *Alibertia edulis* populations were separated by a north-south barrier, which was further west than previously proposed for the Cerrado, suggesting an east-west gradient in the genetic diversity distribution. For both species, “marginal” Cerrado populations were not just a recent expansion of central Cerrado, with haplotypes shared with or derived from those found in the latter one, but they showed exclusive haplotypes, occasionally ancestral ones. In order to avoid an irreparable loss of part of the Cerrado diversity, the implementation of conservation units within the Cerrados of Piauí and Pará, more differentiated and under greater degradation risk, is highly recommended. Additionally, nuclear microsatellites (SSR) were developed for *A. edulis* in order to provide polymorphic markers to aid population analyses. For the polymorphism tests, individuals from Piauí and Mato Grosso were analyzed, revealing higher inbreeding values for the former population, what can be related to its long isolation. Such markers represent important tools for population and phylogeographic analyses of *A. edulis*.

Key words: cpDNA, *Qualea grandiflora*, *Alibertia edulis*, isolation, Pleistocene

LISTA DE SIGLAS

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism* (polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados)

AMOVA - *Analysis of Molecular Variance* (análise da variância molecular)

cpDNA - DNA cloroplastidial

ISSR - *Inter-Simple Sequence Repeat*

ITS - *Internal Transcribed Spacer* (espaçador transcrito interno)

LGM - *Last Glacial Maximum* (último máximo glacial)

mtDNA - DNA mitocondrial

NGS – *Next Generation Sequencing* (sequenciamento de nova geração)

PCR - Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)

RAPD - *Randomly Amplified Polymorphic DNA*

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism* (polimorfismo de fragmentos de restrição)

SDTF - *Seasonally Dry Tropical Forests* (florestas tropicais sazonais secas)

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único)

SSR - *Simple Sequence Repeat* (microsatélites)

UTO - unidade taxonômica operacional

LISTA DE FIGURAS

Fundamentação teórica

Figura 1. A filogeografia se encontra numa junção crítica de diversos campos bem estabelecidos. Adaptado de Avise, 2000..... 17

Figura 2. Relações filogenéticas de populações ou espécies espacialmente disjuntas sob vicariância ou dispersão. Letras minúsculas representam taxa, enquanto letras maiúsculas representam áreas geográficas. Adaptado de Avise, 2000..... 18

Figura 3. Processo de separação das linhagens ("*lineage sorting*") devido ao surgimento de uma barreira ao fluxo gênico em uma população originalmente panmítica. À medida que o tempo passa, as populações passam por estágios de parafiletismos ($T = 1$ e 2), até se tornarem monofiléticas ($T = 3$), por causa da extinção de algumas linhagens. Se a amostragem é, portanto, feita nos tempos 1 e 2, não será detectado o isolamento genético. A separação das linhagens está completa quando as populações atingem o monofiletismo recíproco. Adaptado de Cunha e Solé-Cava, 2012.....19

Fig. 4. Visão subjetiva da mudança relativa na popularidade dos principais marcadores moleculares em genética da conservação. O eixo horizontal indica o tempo. AFLP, amplified fragment length polymorphism; RAPD, randomly amplified polymorphic DNA; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SNP, single nucleotide polymorphism. Gráfico adaptado de Allendorf *et al.*, 2013.....24

Figura 5. Distribuição dos principais biomas na América do Sul, com ênfase para as principais savanas sul-americanas (indicadas em cinza escuro). Modificado de da Silva e Bates, 2002..... 32

Figura 6. Localização das seis regiões florísticas de Cerrado de acordo com Ratter *et al.* (2003). S, Sul; C & SE, Central e Sudeste; CW, Centro-oeste; N & NE, Norte e Nordeste; DA, grupos disjuntos das savanas amazônicas; FWM, oeste. Retirado de Ratter *et al.* (2003)..... 35

Figura 7. Espécies analisadas. (A) Indivíduo de *Alibertia edulis* de Uruçuí (Piauí); (B) Detalhe da inflorescência de *A. edulis*, mostrando uma flor de cor branca, com destaque também para as nervuras na face adaxial das folhas; (C) Fruto imaturo de *A. edulis*, com destaque também para a filotaxia oposta cruzada; (D) Indivíduo de *Q. grandiflora* de Uruçuí (Piauí) em floração; (E) Detalhe da inflorescência de *Q. grandiflora*, destacando

a pétala única de cor amarela; (F) Fruto de *Q. grandiflora*, após a deiscência, com detalhe para semente alada no interior do fruto. Fotos A-E - da autora; foto F - <http://www.kew.org/>.....43

Capítulo 1

Figura 1. Distribuição dos haplótipos e redes de haplótipos encontrados para *A. edulis* (a e b) e *Q. grandiflora* (c e d). (a e c) Mapa das localidades de coleta, destacando a área de Cerrado em branco de acordo com o IBGE, com a distribuição dos haplótipos de acordo com o tamanho amostral para a análise concatenada dos locos *matK*, *ndhF* e *psbA-trnH* em *Alibertia edulis* (a) e *Q. grandiflora* (c). (b e d) Redes de haplótipos geradas para os dados concatenados das sequências *matK*, *ndhF* e *psbA-trnH* para as espécies *Alibertia edulis* (b) e *Qualea grandiflora* (d). O comprimento das linhas nas redes de haplótipos são proporcionais ao número de passos mutacionais, e para aquelas onde houve mais de um passo mutacional o número de passos está indicado. As siglas indicadas na legenda identificam os nomes das populações amostradas, de acordo com a Tab. 1; PA, PI1 e SP - populações do Cerrado marginais; demais populações - Cerrado Central.....67

Figura 2. Análise de NJ das sequências concatenadas de *A. edulis* (a) e *Q. grandiflora* (b). Apenas os valores de bootstrap acima de 70 são indicados 69

Figura S1. Mapa das localidades de coleta, destacando a área de Cerrado em branco de acordo com o IBGE, redes de haplótipos gerados para *A. edulis* e distribuição dos mesmos de acordo com o tamanho amostral. a, *matK*; b, *ndhF*; c, *psbA-trnH*. O comprimento das linhas nas redes de haplótipos são proporcionais ao número de passos mutacionais, e haplótipos intermediários não amostrados são indicados em preto. As siglas identificam os nomes das populações amostradas, de acordo com a Tab 1 83

Figura S2. Mapa das localidades de coleta, destacando a área de Cerrado em branco de acordo com o IBGE (2005), redes de haplótipos gerados para *Q. grandiflora* e distribuição dos mesmos de acordo com o tamanho amostral. a, *matK*; b, *ndhF*; c, *psbA-trnH*. Estrela em rede de haplótipos em c equivale a duplicação de 24 pb em sete indivíduos da população SP. O comprimento das linhas nas redes de haplótipos são proporcionais ao número de passos mutacionais, e haplótipos intermediários não amostrados são indicados em preto. As siglas identificam os nomes das populações amostradas, de acordo com a Tab 1..... 84

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Localização das áreas de coleta no Cerrado.....	64
Tabela 2. Resumo dos dados dos indivíduos analisados, com número de haplótipos e número de locos polimórficos.....	66
Tabela 3. Resultados da AMOVA por espécie por loco.....	68
Tabela 4. Valores de F_{ST} par-a-par para as populações de <i>A. edulis</i> . Valores em negrito indicam populações com $p < 0,05$. Códigos das populações de acordo com a Tabela 1.....	70
Tabela 5. Valores de F_{ST} par-a-par para as populações de <i>Q. grandiflora</i> . Valores em negrito indicam populações com $p < 0,05$. Códigos das populações de acordo com a Tabela 1.....	70
Tabela S 1. Índices de diversidade das amostras analisadas. Diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica (π) e riqueza alélica após a rarefação (H_r) para <i>A. edulis</i> e <i>Q. grandiflora</i>	82

Capítulo 2

Tabela 1. Características dos 11 locos SSR polimórficos e respectivos pares de <i>primers</i> desenvolvidos para <i>A. edulis</i>	90
Tabela 2. Parâmetros genéticos populacionais determinados em duas populações de <i>A. edulis</i> (Mato Grosso - MT e Piauí - PI) para onze locos polimórficos de microssatélites.....	92
Tabela 3. Características dos demais locos SSR que não apresentaram amplificação ou apresentaram amplificação inespecífica e respectivos pares de <i>primers</i> desenvolvidos para <i>Alibertia edulis</i>	96

Sumário

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE SIGLAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
APRESENTAÇÃO.....	13
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
1. Filogeografia.....	16
2. Marcadores moleculares	22
3. Genética de populações e conservação.....	28
4. O Cerrado	31
4.1. Caracterização do Cerrado brasileiro	33
4.2. Divisões do Cerrado.....	34
4.3. Conservação do Cerrado	37
5. <i>Alibertia edulis</i> (Rich.) A.Rich. ex D.C. e <i>Qualea grandiflora</i> Mart.....	38
5.1. <i>Alibertia edulis</i>	39
5.2. <i>Qualea grandiflora</i>	40
Referências	44
CAPÍTULO 1 - Análise filogeográfica de duas espécies arbóreas revela diferenciação longitudinal dos Cerrados marginais e central	57
CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo SSR nucleares para <i>Alibertia edulis</i> (Rubiaceae)	85
CONCLUSÕES	99
ANEXOS - NORMAS DAS REVISTAS	100
Manuscrito 1. Applications in Plant Sciences	100
Manuscrito 2. Molecular Ecology	100

APRESENTAÇÃO

A filogeografia é uma disciplina integrativa, que procura entender a história evolutiva de uma espécie no espaço e no tempo, utilizando para isso dados de genética molecular, genética de populações, etologia, demografia, biologia filogenética, paleontologia, geologia e geografia histórica, a fim de compreender os princípios e processos históricos e contemporâneos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente aqueles entre e dentro de espécies intimamente relacionadas (Avise, 2000; Gutierrez-Rodriguez *et al.*, 2011; Cunha e Solé-Cava, 2012).

Para os estudos de filogeografia e filogenia, o sequenciamento do DNA extra-nuclear também vem sendo particularmente útil (Avise, 2000). No caso do estudo de populações naturais de plantas, diversas regiões foram identificadas para o cpDNA, tais como íntrons ou espaçadores intergênicos, que são variáveis em uma ampla gama de taxa (Taberlet *et al.*, 1991; Small *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 2005; Shaw *et al.*, 2007), sendo que a maioria dessa variação se deve a inserções e deleções, os *indels* (Lowe *et al.*, 2004). Os dados gerados pela análise do cpDNA permitem a estimativa de diversos parâmetros, tais quais diversidade, diferenciação e distâncias genéticas, além da análise de processos históricos.

Há cinco anos a filogeografia vem contando com uma nova ferramenta, a qual vem revolucionando o campo do estudo de espécies nativas, o sequenciamento de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*) e todos os programas de análises estatísticas relacionados que vêm sendo continuamente desenvolvidos (Holsinger, 2010; McCormack e Faircloth, 2013). As tecnologias de NGS oferecem a habilidade de gerar grandes quantidades de dados de sequências a partir dos quais é possível isolar e caracterizar numerosos loci SSR ao longo de todo o genoma e inclusive aqueles baseados em genes (Saarinen e Austin, 2010; Zalapa *et al.*, 2012), sendo utilizada para um número cada vez maior de espécies (Zane *et al.*, 2002; Angeloni *et al.*, 2011; Guichoux *et al.*, 2011; Crichton *et al.*, 2012; Ritter *et al.*, 2012; Wöhrmann *et al.*, 2013).

Estes marcadores vêm sendo utilizados em uma ampla gama de taxa Neotropicais, revelando padrões interessantes. Uma revisão recente que tratou dos padrões filogeográficos na América do Sul identificou que a associação das oscilações climáticas ocorridas no Pleistoceno com os eventos orogênicos do Plioceno/Mioceno contribuíram para moldar a diversidade e a distribuição atual das linhagens modernas

tanto nas regiões tropicais quanto nas regiões temperadas da América do Sul (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013).

Dentre os maiores domínios fitogeográficos Neotropicais está o Cerrado, um tipo de savana composta por formações vegetacionais abertas com um estrato herbáceo sempre presente e estratos arbustivos e/ou arbóreos mais ou menos desenvolvidos, sujeitos a queimadas (Coutinho, 1978; da Silva e Bates, 2002; Klink e Machado, 2005; Batalha e Martins, 2007; Magnusson *et al.*, 2008). O Cerrado possui alto nível de endemismo, mas também elevadas taxas de degradação, o que o torna um dos 34 *hotspots* de conservação mundiais (Mittermeier *et al.*, 2005). Possui uma grande diferenciação florística, a qual levou Ratter *et al.* (2003) a subdividir a área do Cerrado em seis regiões de acordo com o padrão geográfico de distribuição da flora. Essa subdivisão também parece ser corroborada por dados biogeográficos e filogeográficos (Ramos *et al.*, 2007; Collevatti *et al.*, 2009; Fiaschi e Pirani, 2009; Collevatti *et al.*, 2012).

O Cerrado abrange ainda o Cerrado central, que ocupa o planalto central do Brasil, estendendo-se até o Piauí e o Maranhão e ocupando cerca de 1,5 milhão de Km², e áreas disjuntas, conhecidas como Cerrados marginais, que são encontradas nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste, localizadas em outros domínios fitogeográficos, como a Caatinga e a Amazônia. Muito embora possuam menor riqueza que as savanas do Brasil Central, as savanas amazônicas possuem várias espécies em comum com as primeiras, com cerca de metade das espécies encontradas em ambas as áreas (Ratter *et al.*, 2003; Magnusson *et al.*, 2008).

Assim, a origem dos Cerrados marginais, bem como a distribuição da diversidade genética nas populações do Cerrado, ainda permanecem pouco compreendidas. Um estudo que vise compreender as relações filogeográficas do Cerrado deveria, idealmente, incluir espécies amplamente distribuídas no Cerrado, pertencentes a famílias distintas, a fim de não incorrer no erro de detectar as relações da família e não do domínio, e preferencialmente incluir espécies com características ecológicas e de distribuição distintas, a fim de evitar a detecção das relações ecológicas e não do domínio. Dentre as espécies que se enquadram nessa categoria se encontram *Alibertia edulis* (Rich.) A.Rich. ex DC. (Rubiaceae) e *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae).

O presente trabalho teve como objetivo geral analisar as relações biogeográficas entre o Cerrado central e os enclaves de Cerrado encontrados nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil. De forma mais específica, o trabalho objetivou analisar as

relações filogeográficas de duas espécies amplamente distribuídas no Cerrado, *A. edulis* e *Q. grandiflora*, através dos marcadores de DNA cloroplastidial *matK*, *ndhF* e *psbA-trnH*, analisando também a diversidade intrapopulacional, a fim de identificar áreas prioritárias para conservação. Por fim, para melhor contribuir para os estudos populacionais e filogeográficos do Cerrado, o presente trabalho objetivou desenvolver marcadores moleculares polimórficos do tipo microssatélite para a espécie *A. edulis*, através do sequenciamento de nova geração 454.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Filogeografia

A filogeografia é uma disciplina integrativa, que incorpora dados de genética molecular, genética de populações, etologia, demografia, biologia filogenética, paleontologia, geologia e geografia histórica, a fim de entender os princípios e processos históricos e contemporâneos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente aqueles entre e dentro de espécies relacionadas (Avise, 2000; Gutierrez-Rodriguez *et al.*, 2011; Cunha e Solé-Cava, 2012). A filogeografia alia, dessa forma, disciplinas microevolutivas e macroevolutivas (Fig. 1, Avise, 2000). Assim como os mecanismos evolutivos, tais como mutação, deriva genética, fluxo gênico e seleção natural, os eventos demográficos (como colonização ou extinção de populações locais, expansão ou declínio populacional e migração) também deixam marcas na história genealógica das populações (Lowe *et al.*, 2004; Ho e Shapiro, 2011; Cunha e Solé-Cava, 2012).

Filogeógrafos procuram interpretar como e quando os processos históricos que ocorreram na demografia das populações deixaram marcas nas distribuições geográficas atuais de características organizacionais baseadas em genes (Avise, 2000; Gutierrez-Rodriguez *et al.*, 2011). O principal foco de diversos estudos filogeográficos tem sido examinar a distribuição de linhagens genealógicas a fim de acessar a importância relativa de diferentes eventos históricos, tais quais expansão/retração, fragmentação, migração de refúgios, etc. (Gutierrez-Rodriguez *et al.*, 2011). Em síntese, a filogeografia procura entender a história evolutiva de uma espécie, no espaço e no tempo (Cunha e Solé-Cava, 2012).

Os primeiros estudos com uma abordagem filogeográfica utilizaram o polimorfismo de DNA mitocondrial (mtDNA) em populações de camundongo e do gênero *Geomys*, um pequeno roedor endêmico da América do Norte, ainda nos anos de 1970 (Avise, 2000). Inicialmente, os estudos foram dificultados pela ausência de uma metodologia que possibilitasse a análise de marcadores haplóides. Entretanto Avise, usando uma abordagem semelhante à usada pelos antropólogos no estudo da herança dos sobrenomes humanos, passou a tratar cada indivíduo com uma unidade taxonômica operacional (UTO) independente, revolucionando os estudos populacionais desde então (Cunha e Solé-Cava, 2012).

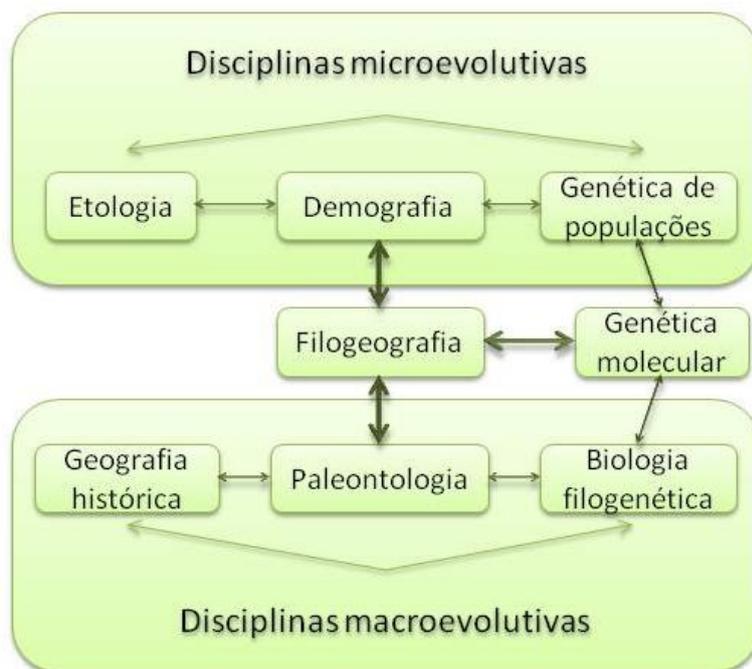


Figura 1. A filogeografia se encontra numa junção crítica de diversos campos bem estabelecidos. Adaptado de Avise, 2000

Além disso, ainda de acordo com Cunha e Solé-Cavá (2012), Avise revolucionou também a forma de representar os resultados. Até então, os resultados de trabalhos de genética populacional eram visualizados na forma de árvores em que cada população ocupava uma posição terminal. Avise representou as relações entre os diferentes indivíduos nas populações através de redes de haplótipos interconectados, onde linhas ligam os haplótipos mais semelhantes e as mutações que separam esses haplótipos são indicadas nessas linhas. Por fim, Avise fez a sobreposição da rede de haplótipos em um mapa com os locais de coleta dos indivíduos analisados, incorporando, dessa forma, dados das relações genéticas entre os indivíduos com os seus posicionamentos geográficos (Cunha e Solé-Cava, 2012).

Muito embora tenha sido inicialmente usada para examinar os padrões de distribuição geográfica de linhagens gênicas dentro de uma única ou de várias espécies, com o advento de novas abordagens estatísticas a filogeografia pode prover a fundamentação metodológica para testar hipóteses alternativas sobre a história demográfica de populações, assim como o tempo e os padrões de divergência das linhagens e os processos microevolutivos relacionados à sua estrutura (Collevatti *et al.*, 2012b).

Através da filogeografia, avaliações genealógicas apropriadas podem ajudar a pesar as influências da dispersão *versus* vicariância (assim como outros processos

evolutivos históricos) na modelagem das distribuições geográficas de características genéticas (Avise, 2000). Sob o ponto de vista da vicariância, populações ou taxa relacionados se tornam separados quando a distribuição mais ou menos contínua de formas ancestrais foi separada por uma separação espaço-temporal, como o soergimento de montanhas ou a separação de continentes. Sob o ponto de vista da dispersão, um determinado grupo taxonômico atingiu sua distribuição atual através de dispersão ativa ou passiva a partir de um ou mais centros de origem ancestrais (Fig. 2). Além disso, é possível ter uma idéia das relações de ancestralidade, pois, dentre outras características, espera-se que o haplótipo mais comum seja o ancestral de todos da população (Cunha e Solé-Cava, 2012).

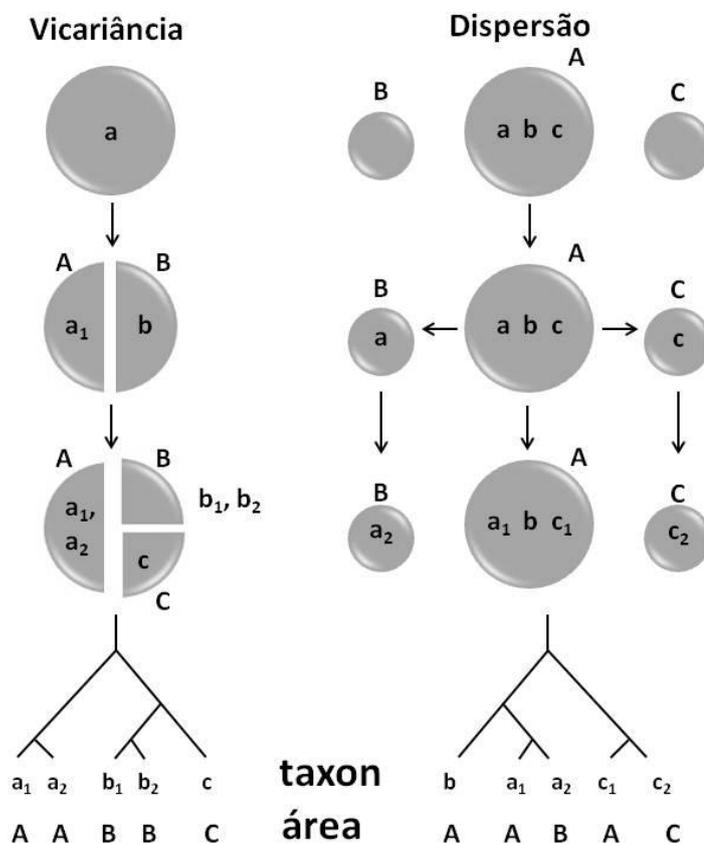


Figura 2. Relações filogenéticas de populações ou espécies espacialmente disjuntas sob vicariância ou dispersão. Letras minúsculas representam taxa, enquanto letras maiúsculas representam áreas geográficas. Adaptado de Avise, 2000

Ao reconstruir as relações evolutivas das linhagens e estimar seus tempos de divergência, os métodos filogeográficos modernos tornaram possível inferir o papel de eventos passados na modelagem dos padrões atuais de biodiversidade (Excoffier, 2004). Aliadas a dados sobre o paleoclima e a paleogeologia, as avaliações genealógicas podem oferecer *insights* sobre a história evolutiva dos taxa. O desenvolvimento de ferramentas analíticas mais robustas baseadas em modelos de coalescência, além do

poder computacional das abordagens Bayesianas, tornou possível inferir a história demográfica mesmo quando a amostragem é pequena, o que é particularmente importante para espécies não-modelo, como é o caso das árvores de florestas tropicais (Scotti-Saintagne *et al.*, 2013).

Entretanto, nem sempre é possível detectar padrões filogeográficos ou estruturação genética, mesmo em populações que apresentem diferenças nas frequências haplotípicas. Isso se deve ao fato de que, quando uma população é isolada, formando duas subpopulações, as mesmas serão parafiléticas, porque alguns dos indivíduos presentes nelas serão mais próximos geneticamente aos da outra população do que dos da própria população. Com o tempo, algumas linhagens primitivas se extinguirão, e os indivíduos de cada uma das populações filhas irão compartilhar um ancestral mais recente do que o ancestral que compartilham com a outra população, num processo denominado separação das linhagens ("*lineage sorting*"), culminando na separação completa das linhagens (populações) monofiléticas (Avice, 2000). Se as populações em estudo forem amostradas antes do tempo necessário para essa separação, as mesmas não serão monofiléticas, devido ao compartilhamento de polimorfismos ancestrais (Cunha e Solé-Cava, 2012) (Fig. 3).

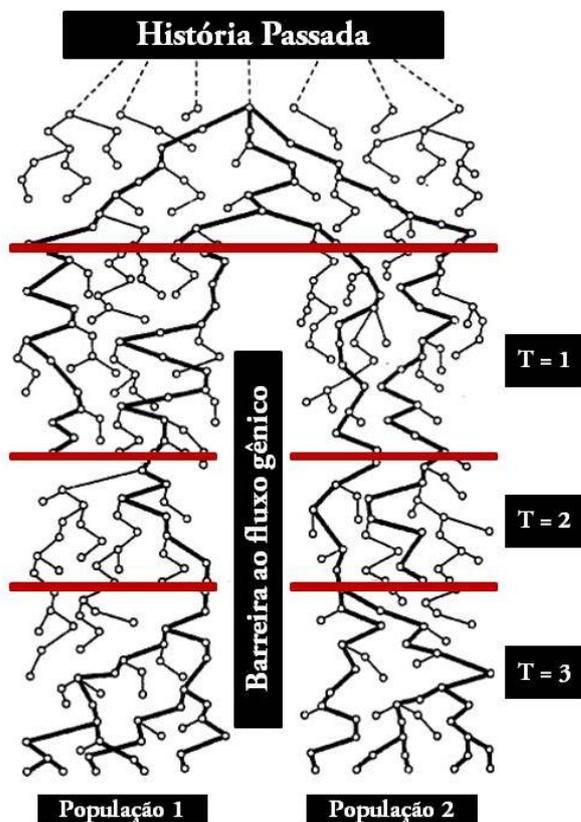


Figura 3. Processo de separação das linhagens ("*lineage sorting*") devido ao surgimento de uma barreira ao fluxo gênico em uma população originalmente panmítica. À medida que o tempo passa, as populações passam por estágios de parafiléticos (T = 1 e 2), até se tornarem monofiléticas (T = 3), por causa da extinção de algumas linhagens. Se a amostragem é, portanto, feita nos tempos 1 e 2, não será detectado o isolamento genético. A separação das linhagens está completa quando as populações atingem o monofilétismo recíproco. Adaptado de Cunha e Solé-Cava, 2012

Além disso, a genealogia obtida depende de quais linhagens persistiram ao longo do tempo e, dessa forma, diferentes amostras e diferentes marcadores podem dar distintas respostas (Avice, 2004). A forma de minimizar esse efeito é ampliar a amostragem de locos, pois cada um funciona como uma réplica independente do processo de coalescência. No caso de marcadores citoplasmáticos (mitocondrial e cloroplastidial), isso implica na análise de algum marcador nuclear, pois os primeiros não apresentam recombinação e, dessa forma, todos os seus locos evoluem como um loco único (Cunha e Solé-Cava, 2012).

A filogeografia também vem sendo utilizada para identificar o limite geográfico entre as populações, o qual até recentemente era um dos maiores desafios no estudo da estruturação genética, pois os métodos tradicionais requerem a definição *a priori* das populações (Cunha e Solé-Cava, 2012). Para tanto, a caracterização de genótipos obtidos através de marcadores multiloco, como, por exemplo, os microssatélites, são necessários. Esses métodos, denominados "métodos de atribuição", usam estratégias de Máxima-Verossimilhança ou Inferência Bayesiana para calcular a probabilidade de observar os diferentes genótipos em cada população e atribuem os indivíduos às populações de acordo com a probabilidade de seus genótipos pertencerem a ela, independentemente do seu local de coleta (Cunha e Solé-Cava, 2012). Dentre os métodos mais conhecidos, o mais popular é o *Structure*, que utiliza análise Bayesiana para atribuir indivíduos a k grupos, sem informações *a priori* de suas relações (Pritchard *et al.*, 2000).

Há cinco anos, a filogeografia vem contando com uma nova ferramenta, a qual vem revolucionando o campo do estudo de espécies nativas, o sequenciamento de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*) e todos os programas de análises estatísticas relacionados que vêm sendo continuamente desenvolvidos (Holsinger, 2010; McCormack e Faircloth, 2013). Entretanto, mesmo com os avanços nessas ferramentas, milhares de espécies de árvores tropicais jamais foram sequenciadas sequer para um gene, e mesmo espécies relativamente comuns de árvores possuem altos níveis de variação geográfica que permanecem não caracterizados (Dick, 2010). Enquanto muitos estudos analisaram a influência das glaciações do Pleistoceno na estruturação genética de espécies de árvores de regiões temperadas do Neártico, poucos estudos analisaram a região neotropical (Gutierrez-Rodriguez *et al.*, 2011; Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). Para as primeiras, foi identificado que o nível de estruturação genética e, portanto, o potencial para refletir isolamento populacional histórico, é determinado parcialmente

pela história de vida: espécies com ampla distribuição geográfica e ampla dispersão apresentam pouca diferenciação em marcadores maternalmente herdados (como o DNA cloroplastidial - cpDNA), enquanto espécies de vida longa e de polinização cruzada apresentam pouca estruturação com marcadores biparentais (Duminil *et al.* 2007). Se processos similares moldam os padrões genéticos nos trópicos, haplótipos endêmicos e linhagens vicariantes deveriam ser interpretados como um legado de refúgios florestais (Dainou *et al.*, 2010).

Em uma revisão recente que tratou dos padrões filogeográficos da América do Sul, Turchetto-Zolet *et al.* (2013) observaram que, em geral, as distribuições geográficas de espécies associadas a habitats de floresta foram reduzidas durante os ciclos glaciais do Pleistoceno, que os rios frequentemente funcionam como barreiras para espécies amazônicas terrestres e que muitas espécies de animais e vegetais possuem um padrão de diversificação por vicariância ao longo dos Andes, muito embora outros trabalhos também suportem eventos de dispersão a longa distância para outros grupos com distribuição ao longo dos Andes. Ao final, os autores concluem que a associação das oscilações climáticas do Pleistoceno com os eventos orogênicos do Plioceno/Mioceno contribuíram para moldar a diversidade e a distribuição atual das linhagens modernas tanto nas regiões tropicais quanto nas regiões temperadas da América do Sul (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). Em outro estudo filogeográfico recente, foi detectada para a espécie *Tabebuia impertiginosa* uma alta diferenciação entre as populações, com a maior parte das divergências entre as populações datando do final do Pleistoceno (Collevatti *et al.*, 2012b). Além disso, os autores dataram uma expansão da sua paleodistribuição no último máximo glacial (LGM), sugerindo que a distribuição atual reflita uma distribuição relictual de uma anteriormente mais ampla.

Entretanto, de acordo com Dick (2010), estudos com espécies de árvores tropicais de ampla distribuição possuem diversos problemas logísticos, como obter amostras de florestas que estão sendo rapidamente degradadas em países que colocam restrições ao acesso de pesquisadores às florestas e às pesquisas genéticas. Apesar dessas dificuldades, a expectativa é um aumento no número de estudos filogeográficos e de genética de populações, como relatado por Holsinger (2010). O autor conclui falando que estamos no limiar de uma transformação no campo da genética evolutiva, similar ao ocorrido 40 anos atrás, com a introdução das análises de eletroforese de proteína. Resta a nós, biólogos, contribuir ativamente para disseminar nosso conhecimento sobre a biodiversidade, como ela evoluiu, e como esse conhecimento pode nos ajudar a escolher

as medidas mais efetivas para sua conservação (Hendry *et al.*, 2010; Antonelli e Sanmartin, 2011).

2. Marcadores moleculares

As principais ferramentas moleculares utilizadas na atualidade pela genética da conservação são os marcadores moleculares, os quais são baseados em alterações na cadeia de DNA, não são influenciados pelo ambiente e possuem fácil reconhecimento. Os marcadores moleculares podem ser usados para avaliar as diferenças genéticas entre indivíduos, sendo capazes de detectar mudanças tanto nas porções codificantes quanto nas não-codificantes do genoma, mesmo aquelas que resultam em alterações sinônimas (Lowe *et al.*, 2004; Menezes, 2007). Por acessar o conteúdo genotípico e não fenotípico, os marcadores moleculares podem ser utilizados na identificação de espécies e formas adaptadas sem, contudo, estarem sujeitos a erros provocados por variações ambientais (O'Hanlon *et al.*, 1999).

O uso de marcadores moleculares em análises populacionais apenas se iniciou a partir de 1966, com o advento da técnica de análise de isoenzimas, através da qual os indivíduos passaram a ser analisados como homozigotos ou heterozigotos para um dado loco (Parker *et al.*, 1998; Miyaki e Alves, 2006; Allendorf *et al.*, 2013). Entretanto, as isoenzimas acessam de forma indireta o conteúdo genético, pois se trata da análise da migração diferencial de proteínas que possuam alteração mesmo em um único aminoácido (Schlotterer, 2004; Solferini e Selivon, 2004; Miyaki e Alves, 2006). Algumas limitações vêm sendo associadas a essa técnica, como a necessidade de grande quantidade de material inicial (a qual muitas vezes leva à necessidade de sacrifício dos indivíduos analisados), o fato de que apenas enzimas solúveis em água podem ser analisadas (e, conseqüentemente, apenas o produto de seus genes) e o fato de que substituições silenciosas ou em regiões não-codificantes não são detectadas pela técnica (Allendorf *et al.*, 2013). Ainda assim, por ter uma aplicabilidade imediata em várias áreas da biologia, como a análise da estrutura da variabilidade genética de populações naturais, do fluxo gênico entre populações e, de forma mais limitada, em filogenias, a técnica se difundiu rapidamente (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Parker *et al.*, 1998), sendo utilizada até os dias atuais (Franceschinelli *et al.*, 2006; Hardy *et al.*, 2006; Allendorf *et al.*, 2013).

Posteriormente outras técnicas foram desenvolvidas, como a análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* -

RFLP), baseado em *Southern blot*, o que o torna caro e demorado. Entretanto, a grande revolução se deu com o advento das análises baseadas em amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia da polimerase) (Ouborg *et al.*, 1999; Schlotterer, 2004; Miyaki e Alves, 2006) (Fig. 4). Isso se deve ao fato de que as análises baseadas em PCR são tecnicamente mais simples e necessitam de pequenas quantidades iniciais de DNA (Miyaki e Alves, 2006). A PCR baseia-se na amplificação de fragmentos a partir de oligonucleotídeos iniciadores (denominados *primers*) em ciclos que incluem uma etapa de desnaturação, uma etapa de anelamento dos iniciadores e uma etapa de extensão da fita de DNA; o número de moléculas, portanto, aumenta exponencialmente e, ao final de 30-40 ciclos, milhões de cópias da região específica que está sendo amplificada são geradas (Avisé, 2004; Allendorf *et al.*, 2013).

Dessa forma, através da PCR é possível amplificar quantidades ínfimas de DNA, como as que são encontradas em exsiccatas, peles de museu e fezes, tornando viável a análise de animais extintos localmente ou cuja captura para coleta não seja viável (Sunnucks, 2000; Miyaki e Alves, 2006; Allendorf *et al.*, 2013). Diversas técnicas surgiram com o advento da PCR, tais como o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), os ISSRs (*Inter-Simple Sequence Repeat*), os RAPDs (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), os microssatélites (SSR – *Simple Sequence Repeat*) e os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Fig. 4), todas variando quanto aos custos, material inicial necessário e reprodutibilidade (Garcia *et al.*, 2004; Allendorf *et al.*, 2013).

Os marcadores moleculares podem ser nucleares ou citoplasmáticos, sendo que em plantas os últimos podem ser mitocondriais ou cloroplastidiais. Esses diferentes marcadores variam em suas características evolutivas, como herança e taxas de mutação estrutural e de sequência, e por esse motivo inferências sobre as formas de fluxo gênico (pólen ou sementes) podem ser feitas a partir da análise associada de marcadores com diferentes formas de transmissão (Lowe *et al.*, 2004; Petit *et al.*, 2005). Ainda de acordo com Lowe *et al.* (2004), a herança dos marcadores citoplasmáticos difere da dos nucleares no fato de que eles apresentam: (i) segregação vegetativa, onde a segregação das organelas é determinada por processos estocásticos; (ii) seleção intracelular, onde células heteroplasmáticas se tornam homoplasmáticas através da segregação das organelas e fixação de um tipo por célula; (iii) herança uniparental, onde, na maioria dos casos, a herança é materna, podendo também ser paterna ou, em raros casos, biparental;

e (iv) recombinação reduzida, onde genomas de linhagens diferentes aparentemente não apresentam recombinação entre si.

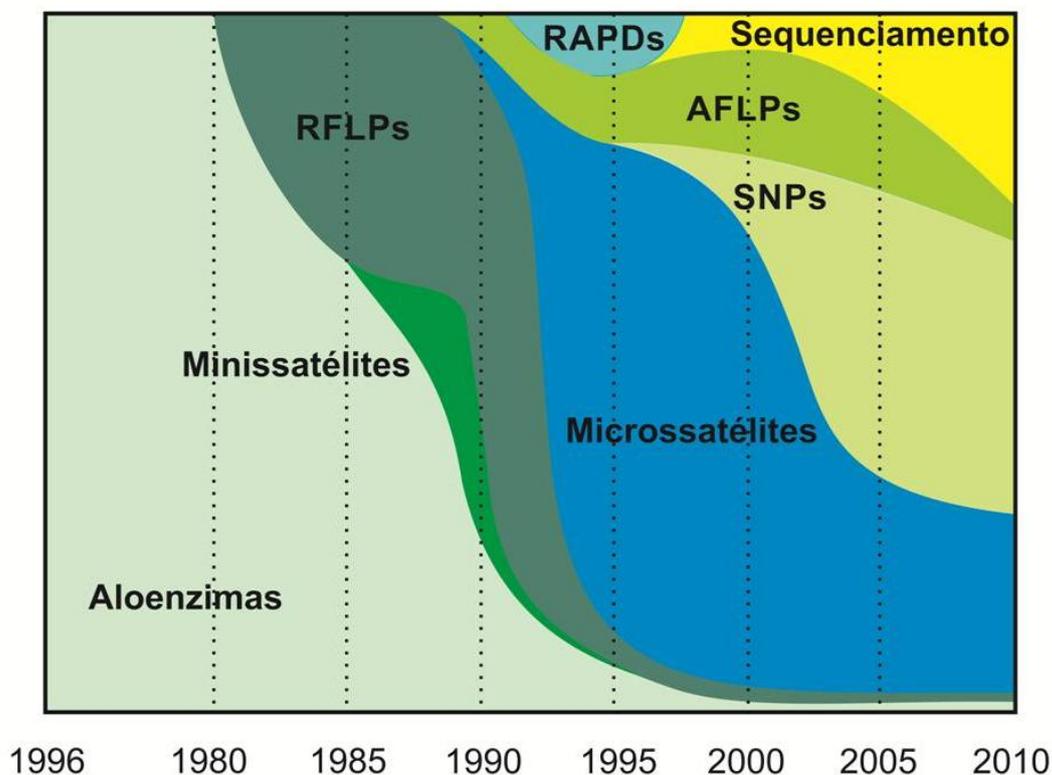


Figura 4. Visão subjetiva da mudança relativa na popularidade dos principais marcadores moleculares em genética da conservação. O eixo horizontal indica o tempo. AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphism*; RAPD, *Randomly Amplified Polymorphic DNA*; RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*; SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*. Gráfico adaptado de Allendorf *et al.*, 2013

Além disso, os diversos marcadores moleculares possuem diferentes taxas de substituição/evolução e, por isso, cada um é mais apropriado para responder um determinado tipo de questão (Petit *et al.*, 2005; Solé-Cava e Cunha, 2012; Scotti-Saintagne *et al.*, 2013). Por exemplo, para análises a nível populacional, marcadores de evolução rápida são mais indicados, como mtDNA para animais e os SSR para animais e plantas (Sunnucks, 2000; Zalapa *et al.*, 2012). Os marcadores também variam de acordo com a quantidade de polimorfismo (e consequentemente de informação) que geram. Em geral, isoenzimas são menos variáveis que marcadores do tipo RAPD ou RFLP, os quais por sua vez são menos variáveis que os micro e minissatélites (Ouborg *et al.*, 1999).

Por fim, os marcadores moleculares podem ser divididos entre dominantes e codominantes, de acordo com sua herança (Ouborg *et al.*, 1999). Por um marcador molecular codominante se entende aquele em que é possível distinguir o padrão de bandas dos homozigotos do padrão do heterozigoto, permitindo estimativas das frequências alélicas (Ouborg *et al.*, 1999; Ellegren, 2004; Solé-Cava, 2004). Nos marcadores dominantes, os padrões de bandas dos homozigotos são idênticos aos dos heterozigotos, sendo sua análise através de presença ou ausência dos fragmentos amplificados (Ouborg *et al.*, 1999; Nybom, 2004; Archibald *et al.*, 2006). Por essas características, marcadores codominantes são mais indicados para análises populacionais (Sunnucks, 2000). Entretanto, quando acompanhados de análises estatísticas adequadas, os marcadores dominantes também podem ser utilizados para essa finalidade (Ouborg *et al.*, 1999; Archibald *et al.*, 2006; Falush *et al.*, 2007).

Dentre os marcadores codominantes, destacam-se os marcadores do tipo SSR, os quais são baseados em PCR e apresentam altos níveis de polimorfismo intraespecífico, além de possuírem uma distribuição aleatória no genoma (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Zane *et al.*, 2002; Menezes, 2007; Kalia *et al.*, 2011). Os SSR são encontrados tanto em eucariotos como em procariotos, e são sequências de DNA de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem* de 5 a 100 vezes, por exemplo, (ATG)_n, com produtos que variam em geral de 75 a 300 pb, dependendo do loco e da localização dos *primers* (Li *et al.*, 2002; Nybom, 2004; Allendorf *et al.*, 2013). Entre os diferentes indivíduos da população, o número de repetições dessas unidades pode variar, gerando um grande potencial de polimorfismo, na faixa de 10⁻³ ou 10⁻⁴ por geração, colocando os SSR dentre os mais polimórficos disponíveis atualmente e, portanto, ideais para análises populacionais (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Ellegren, 2004; Rakoczy-Trojanowska e Bolibok, 2004; Menezes, 2007; Guichoux *et al.*, 2011; Allendorf *et al.*, 2013).

Para análise de polimorfismo de SSRs são usados *primers* flanqueadores da região do microssatélite, sendo, portanto, necessário um conhecimento prévio da sequência de DNA do organismo a ser estudado, tornando essa técnica inicialmente inacessível a muitas taxa (Squirrell *et al.*, 2003; Nybom, 2004). Com o advento de técnicas mais simples para construção de bibliotecas enriquecidas em microssatélites e, posteriormente, com o sequenciamento de nova geração, entretanto, o uso desses locos para análises populacionais se tornou mais viável, sendo utilizada para um número cada vez maior de espécies (Zane *et al.*, 2002; Angeloni *et al.*, 2011; Guichoux *et al.*, 2011; Crichton *et al.*, 2012; Ritter *et al.*, 2012; Wöhrmann *et al.*, 2013).

De fato, com as novas tecnologias de sequenciamento, a análise e o gerenciamento dos dados gerados tem se tornado um desafio maior que o sequenciamento em si (Zhang *et al.*, 2011; Allendorf *et al.*, 2013). Adicionalmente, o uso de PCRs multiplex e genotipagem automática aumentou a velocidade de genotipagem de indivíduos, ao mesmo tempo em que diminuiu os custos (Allendorf *et al.*, 2013). Esse procedimento pode se dar de duas formas, denominadas *multiplex* verdadeira, onde mais de um loco microssatélite é amplificado em uma mesma reação de PCR, usando diferentes cores de fluorocromos para cada loco, ou *pseudo-multiplex*, a qual se trata da junção de diferentes produtos de PCR simultaneamente em um único capilar do sequenciador (Guichoux *et al.*, 2011). Além disso, como em alguns casos a região flanqueadora dos microssatélites é conservada, os *primers* desenhados para uma espécie podem ser transferidos para outra espécie relacionada (Zane *et al.*, 2002; Krapp *et al.*, 2012; Wohrmann *et al.*, 2012, 2013; Allendorf *et al.*, 2013).

Um outro tipo de polimorfismo que vem sendo mais frequentemente utilizado são os SNPs (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*, ou polimorfismo de um único nucleotídeo) (Allendorf *et al.*, 2013). Esses se tratam do tipo mais abundante de polimorfismo no genoma, com um polimorfismo a cada 200-500 pb (Brumfield *et al.*, 2003). Por definição, os SNPs são alterações em posições (locos) únicas no genoma nas quais diferentes sequências alternativas (alelos) existem em indivíduos normais em alguma(s) população (populações), enquanto o alelo menos frequente tem uma abundância de 1% ou maior, podendo ser, em princípio, polimorfismos bi-, tri- ou tetra- alélico (Brookes, 1999). A troca de uma purina por outra purina (G↔A) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C↔T) é chamada transição, enquanto transversões são as trocas de uma purina por uma pirimidina ou o oposto (Allendorf *et al.*, 2013). Dessa forma, estritamente falando, inserções/deleções (*indels*) não são considerados SNPs, muito embora tenham sido utilizados numa definição mais abrangente do termo (Brookes, 1999). Os SNPs podem ser encontrados tanto em regiões não-codificantes como em regiões codificantes do genoma podendo ser, portanto, seletivamente neutros ou não (Allendorf *et al.*, 2013).

Diferenças nos genomas nuclear, mitocondrial ou cloroplastidial também podem ser analisadas através de sequenciamento de regiões previamente caracterizadas utilizando *primers* “universais”. O sequenciamento do DNA citoplasmático, por exemplo, vem sendo particularmente útil para estudos de filogenia e filogeografia (Avice, 2000). No caso do estudo de populações naturais de plantas, o DNA

mitocondrial se mostrou menos útil que em animais, essencialmente por apresentar uma taxa de substituição mais baixa, a qual resulta em uma menor variação, mas também por apresentar recombinação com o DNA nuclear e também com o cloroplastidial (Dumolin-Lapegue *et al.*, 1997; Avise, 2000; Petit *et al.*, 2005; Allendorf *et al.*, 2013). Por outro lado, para o cpDNA foram identificadas diversas regiões, tais como íntrons ou espaçadores intergênicos que são variáveis em uma ampla gama de taxa (Taberlet *et al.*, 1991; Small *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 2005; Shaw *et al.*, 2007), sendo que a maioria dessa variação se deve a *indels* (Lowe *et al.*, 2004). Com os dados gerados por cpDNA, índices como diversidade, diferenciação e distâncias genéticas podem ser calculados, além da análise de processos históricos (Lowe *et al.*, 2004). Essas regiões vêm sendo utilizadas para diversos estudos, inclusive em espécies nativas brasileiras, como *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae), uma árvore nativa de florestas sazonais que apresenta ampla distribuição no Brasil (Garcia *et al.*, 2011). Para essa espécie, além de marcadores de cpDNA, também o espaçador transcrito interno (ITS - *Internal Transcribed Spacer*) de DNA nuclear foi utilizado, e ambos os marcadores identificaram o isolamento das populações em dois grupos distintos, os quais teriam sido isolados no final do Mioceno e começo do Plioceno em populações localizadas a leste e oeste do Cerrado.

Mais recentemente, o campo da genética da conservação vem se beneficiando amplamente da técnica do sequenciamento de nova geração, que permite a análise de um grande volume de regiões gênicas e não-gênicas, aliada a uma redução significativa nos custos da análise (Mardis *et al.*, 2008a; Angeloni *et al.*, 2012). As tecnologias de sequenciamento de nova geração incluem o pirosequenciamento 454 da Roche, o sequenciamento Illumina, o sistema SOLiD da Applied Biosystems, dentre outros (Mardis, 2008a, 2008b; Zhang *et al.*, 2011). Embora utilizem diferentes estratégias para separar espacialmente as moléculas que estão sendo sequenciadas em paralelo, todas independem da necessidade de clonagem prévia para análise de genomas, o que possibilita uma análise de milhares de sequências simultaneamente de forma mais rápida e barata. As tecnologias de NGS oferecem a habilidade de gerar grandes quantidades de dados de sequências a partir dos quais é possível isolar e caracterizar numerosos loci SSR ao longo de todo o genoma e inclusive aqueles baseados em genes (Saarinen e Austin, 2010; Zalapa *et al.*, 2012). Diversas espécies de plantas já tiveram SRR desenvolvidos a partir dessa tecnologia como, por exemplo, *Fosterella rusbyi*

(Mez) L.B.Sm. (Bromeliaceae; Wöhrmann *et al.*, 2012) e *Dyckia marnier-lapostollei* (Bromeliaceae; Wöhrmann *et al.*, 2013).

Dessa forma, a escolha da ferramenta adequada deve levar em consideração tanto a pergunta a ser respondida como o domínio técnico, a infraestrutura e a disponibilidade financeira do laboratório (Parker *et al.*, 1998; O'Hanlon *et al.*, 1999; Ouborg *et al.*, 1999; Sunnucks, 2000; Lowe *et al.*, 2004; Solé-Cava e Cunha, 2012).

3. Genética de populações e conservação

O uso de ferramentas moleculares para auxiliar na conservação de populações naturais tem se tornado mais evidente recentemente, pois populações naturais sofrem continuamente com alterações no ambiente ao qual precisam se adaptar, sendo suscetíveis a doenças, pestes, parasitas, competidores e predadores, poluição, mas também alterações que têm sido mais acentuadas nos últimos anos, como as dos ciclos climáticos (como El Niño e La Niña) e mudanças climáticas globais induzidas pelo homem (England *et al.*, 2003; Frankham *et al.*, 2006).

A base dessa adaptação é a variabilidade genética, a qual é continuamente ampliada por mutação ou migração de indivíduos de outras populações, e continuamente perdida através da deriva genética, endocruzamento e seleção natural (Frankham *et al.*, 2006; Inglêz, 2006). Em populações pequenas e isoladas, essa perda é ainda mais acentuada, pois a deriva genética e o endocruzamento são inversamente proporcionais ao número de indivíduos na população (Solé-Cava, 2004). Além disso, elevadas taxas de endocruzamento e deriva genética levam à redução no tamanho populacional, entrando em um ciclo denominado vórtex de extinção (Frankham *et al.*, 2006; Banhos, 2009; Allendorf *et al.*, 2013). Muito embora alguns autores sugiram que outros fatores levariam à extinção de uma espécie antes daqueles relacionados à variabilidade genética, trabalhos recentes têm demonstrado o contrário (Spielman *et al.*, 2004; Evans e Sheldon, 2008). Vale a pena ressaltar, entretanto, que a baixa variabilidade genética não é a causa da ameaça de extinção, mas um indicador de processos que podem levar à extinção (Banhos, 2009).

Tradicionalmente, os principais aspectos estudados na genética de populações estão relacionados às estatísticas F de Wright e demais estatísticas correlacionadas, incluindo estimativas de fluxo gênico (Cunha e Solé-Cava, 2012). Entretanto, ainda de acordo com esses autores, o desenvolvimento de novos métodos analíticos em resposta à maior capacidade de processamento computacional e à grande quantidade de dados

disponível (graças ao sequenciamento de nova geração e às novas técnicas de genotipagem, com mais baixo custo) tem levado a medidas cada vez mais precisas de diversas estimativas. Dentre os aspectos mais estudados na genética da conservação estão o número de alelos e o nível de heterozigosidade (relacionados à variabilidade intrapopulacional), os níveis de divergência genética entre populações (inferidos, principalmente, pelos índices de F_{ST} e pelo AMOVA) e o nível de fluxo gênico entre as populações, inferido pela taxa de migração e também relacionado à divergência entre populações (Solé-Cava e Cunha, 2012; Allendorf *et al.*, 2013).

Muito embora a deriva genética atue tanto em populações grandes como em pequenas, nas últimas seus efeitos são mais intensos, pois as taxas de mutação (que balanceiam as perdas de alelos) são normalmente muito baixas e, em populações pequenas, os novos alelos gerados por mutação são facilmente perdidos (pois quanto menor a frequência do alelo, mais fácil será perdê-lo) (Banhos, 2009). Se o novo alelo for vantajoso, ele pode aumentar em frequência em função da seleção natural e, muito embora os impactos da fragmentação de habitat na variabilidade genética de espécies de árvores tropicais ainda seja um tópico bastante discutido (Ismail *et al.*, 2012), sabe-se que a perda de alelos por deriva genética pode levar à diferenciação, ao acaso, de subpopulações que tenham sido fragmentadas (Frankham *et al.*, 2006).

A curto prazo a perda de heterozigosidade pode reduzir o vigor dos indivíduos (depressão endogâmica) e a longo prazo diminuir a habilidade da espécie de responder às pressões de seleção (Young *et al.*, 1999). Além disso, juvenis resultantes de endocruzamento tendem a ser mais suscetíveis a alterações no ambiente que não afetariam indivíduos não-endocruzados (Crnokrak e Roff, 1999; Mills e Soulé, 2013). Por fim, espécies com baixa variabilidade genética têm seu sucesso reprodutivo reduzido. Em plantas isso pode acontecer, por exemplo, pela perda de alelos relacionados à auto-incompatibilidade. Essa perda pode levar a uma homogeneização dos alelos encontrados na população, fazendo com que ocorra uma redução no número de indivíduos capazes de fecundar os demais (Ellstrand e Elam, 1993; Frankham *et al.*, 2006).

A divergência genética entre populações é utilizada para definir a estrutura genética populacional. Uma alta estruturação genética entre populações indica ausência de fluxo gênico entre as mesmas, revelando que estas estão isoladas; quando não existe estruturação genética entre populações significa que estas são panmíticas, ou seja, geneticamente se comportam como uma única população, onde cada indivíduo tem a

mesma probabilidade de cruzar com outro do sexo oposto (Andrade, 2006). Phillips *et al.* (2012), por exemplo, observaram para a família Orchidaceae que, muito embora a diferenciação entre populações seja em geral baixa para a família, populações de espécies raras apresentavam maior diferenciação que populações de espécies comuns. Os autores sugerem que o motivo seja a ausência de populações intercalares, que propiciariam o fluxo gênico entre as populações disjuntas, fato comum em espécies raras. Já em um outro trabalho também com bromélias, Palma-Silva *et al.* (2011) observaram que, apesar de possuírem populações geograficamente isoladas, quatro espécies simpátricas que ocorrem em *inselbergs* são capazes de manter sua coesão genética, apesar do baixo fluxo gênico intraespecífico.

Diversas disciplinas vêm auxiliando os estudos de genética da conservação desde sua criação e os dados obtidos têm sido utilizados não apenas para inferir a variabilidade genética de populações, mas também para a caracterização de sistemas de cruzamento e estrutura genealógica, estimativa de taxas de polinização e dispersão de frutos e sementes (identificando taxas de migração e dispersão), identificação de produtos comercializados ilegalmente e da origem de bioinvasões e auxílio em seu controle, bem como discriminação de táxons e híbridos (Young *et al.*, 1999; Goldstein *et al.*, 2000; Colevatti *et al.*, 2001; Wasser *et al.*, 2008; Field *et al.*, 2009; Banhos, 2009; Grivet *et al.*, 2009; Solé-Cava e Cunha, 2012).

Dessa forma, além de fornecer subsídios para decisões de manejo de populações existentes, a genética da conservação também contribui para o desenvolvimento de medidas que levem à expansão da diversidade genética de espécies ameaçadas de extinção (O'Brien, 1994, Krakowskiet *et al.*, 2003; Solé-Cava, 2004; Adrianoelina *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2007; Cavallari, 2008). Um bom exemplo de como a genética de populações pode auxiliar nas análises de taxas de polinização é o trabalho de Ojeda-Camacho *et al.* (2011). Nele os autores analisaram populações nativas (controle) e cortadas seletivamente de *Guibourtia chodatiana* (Caesalpinioideae) e observaram uma produção de frutos duas vezes maior nas áreas controle, sugerindo uma limitação no polinizador que levou a uma redução no número de óvulos fertilizados nas populações cortadas seletivamente.

A expectativa, portanto, é que as análises genéticas tenham um papel cada vez maior na biologia da conservação no futuro, principalmente com o sequenciamento em massa do genoma parcial ou completo de diversas espécies e de vários indivíduos de cada espécie, aliado a habilidade de examinar centenas ou milhares de marcadores com

relativa facilidade (Holsinger, 2010; Allendorf *et al.*, 2013). Aliadas a essa nova e sem precedentes disponibilidade de dados, novas ferramentas de análise, processamento e compartilhamento de informações vêm sendo desenvolvidas. Um bom exemplo é o SUPERSMART, uma plataforma de acesso livre que objetiva produzir uma supermatriz e uma mega-filogenia de plantas, fungos e animais calibrados por fósseis, e que estima taxas de especiação, extinção e migração para áreas e clados (Dawson *et al.*, 2013)

4. O Cerrado

As savanas tropicais cobrem entre 15 e 24,6 x 10⁶ Km² da superfície da América do Sul, África e Ásia. Dentre essas, a maior, mais rica e possivelmente mais ameaçada é o Cerrado, o qual é composto por formações vegetacionais abertas com um estrato herbáceo sempre presente e estratos arbustivos e/ou arbóreos mais ou menos desenvolvidos, sujeitos a queimadas (Coutinho, 1978; da Silva e Bates, 2002; Klink e Machado, 2005; Batalha e Martins, 2007; Magnusson *et al.*, 2008). Sendo o segundo maior domínio neotropical, perdendo em extensão apenas para a Floresta Amazônica, o Cerrado faz parte da chamada "diagonal de formações abertas", que divide as florestas pluviais Amazônica (ao norte) e Atlântica (ao sudeste) (Collevatti *et al.*, 2001; Klink e Machado, 2005; Werneck *et al.*, 2012). Ao longo dessa diagonal, o Cerrado é cercado a nordeste pela Caatinga (uma região nuclear das florestas tropicais sazonais secas - SDTF, do inglês *Seasonally Dry Tropical Forests*) e a sudoeste pelo Chaco, com enclaves de SDTF que podem ser encontrados em manchas de solos férteis dentro do Cerrado (Pennington, 2000; Werneck *et al.*, 2012).

O Cerrado é considerado uma parte da savana localizada na América do Sul. Ao norte da Floresta Amazônica, esta savana é encontrada em manchas em Llanos, Gran Sabana, Roraima, Peru, Monte Alegre, Amapá e Marajó, sendo denominada Cerrado quando localizada ao sul desta floresta (da Silva e Bates, 2002; Werneck *et al.*, 2012) (Fig. 5). Tem sua origem comumente atribuída ao resfriamento global do final do Mioceno, o qual levou a uma diminuição na umidade e a uma expansão dos habitats secos e abertos, contribuindo para a expansão de gramíneas C4 e subsquente estabelecimento dos Cerrados (Simon e Pennington, 2012; Hughes *et al.*, 2013). De acordo com Ledru (2002), o primeiro registro de vegetação do tipo Cerrado data de 32.000 anos atrás, no Plateau Central Brasileiro.

Trata-se de uma vegetação xeromórfica, cujas árvores e arbustos frequentemente possuem casca grossa, troncos e galhos retorcidos, especialmente em áreas onde o fogo é frequente, com muitas espécies com folhas grandes, espessas, duras e glabras, como encontrado na família Vochysiaceae (Eiten, 1972). A flora arbórea é principalmente composta por plantas esclerófilas perenes adaptadas às queimadas periódicas, com sistemas radiculares bem desenvolvidos, permanecendo verdes durante os meses relativamente secos do inverno, enquanto a camada herbácea é sazonal, se tornando seca e de coloração amarronzada durante o inverno e verde durante o verão (Alves, 2007). Os solos têm estreita relação com as diferentes fisionomias da vegetação, apresentando maior biomassa e atividade em fisionomias do tipo florestal (por exemplo, mata de galeria) em relação àqueles de fisionomia mais aberta, como savana (Mendes *et al.*, 2012).



Figura 5. Distribuição dos principais domínios na América do Sul, com ênfase para as principais savanas sul-americanas (indicadas em cinza escuro). Modificado de da Silva e Bates, 2002

Considerado a última fronteira agrícola do planeta (Borlaug, 2002), os Cerrados se desenvolveram sobre solos muito antigos e intemperizados, com baixos níveis de

nutrientes mas elevados níveis de acidez e alumínio (Klink e Machado, 2005). Apesar de pobres em nutrientes, esses solos podem se tornar férteis para a agricultura com a adição de fertilizantes e calcário. Dessa forma, a agricultura moderna, em especial a cultura da soja, e as grandes extensões de pastagens, têm convertido extensões cada vez maiores de Cerrado em área cultivável (Klink e Machado, 2005).

4.1. Caracterização do Cerrado brasileiro

A área do Cerrado, incluindo a região central e os enclaves em outros biomas, inclui os estados de Amapá, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná, Piauí, Rondônia, Roraima, São Paulo e Tocantins, totalizando 1.445 municípios e 1,86 milhões de Km² (da Silva e Bates, 2002; Marcuzzo *et al.*, 2012). O clima predominante no domínio do Cerrado é o Tropical sazonal, de inverno seco (Coutinho, 2000).

O Cerrado brasileiro ocupa mais de 20° de latitude e 10° de longitude, abrangendo cerca de 22% do território do Brasil, ocorrendo desde o nível do mar até altitudes superiores a 1.800 m, com precipitações que vão de menos de 800 mm (NE) até mais de 2.000 mm (N) e que concentram-se nos meses de primavera e verão (outubro a março) e temperaturas médias que variam de 20 a 25°C (Ratter *et al.*, 1997; Furley e Ratter, 1988; Coutinho, 2000; Costa *et al.*, 2004; Felfili e Silva Júnior, 2005). De fato, o Cerrado abrange uma área tão extensa do Brasil que uma grande variação no solo e tipos de climas pode ser encontrada dentro dos seus limites (Alves *et al.*, 2007). Essas características, incluindo fatores edáficos, ação do fogo, topografia e drenagem, levam à grande riqueza e diversidade florística encontradas nesse domínio (Costa *et al.*, 2004).

Conseqüentemente, ao menos cinco fitofisionomias são reconhecidas para o Cerrado, sendo estas o “campo limpo” (predomínio do componente herbáceo), o campo sujo, o campo Cerrado, o Cerrado "*sensu stricto*" (formações "savânicas") e o “cerradão” (predomínio do componente arbustivo-arbóreo), em um "complexo de formações oreádicas" (Coutinho, 1978). Embora todas estas formações sejam naturais, Eiten (1972) descreveu que em diversas áreas as formas mais abertas se tratavam na verdade da degradação de uma formação mais densa, quer por desmatamento, por queimadas anuais, ou por ambos.

Essa grande variação nas fitofisionomias se reflete numa elevada riqueza de espécies. Juntas, as plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós somam mais de 7.000 espécies, valor superior àquele encontrado na maioria das regiões do mundo (Mendonça *et al.*, 1998; da Silva e Bates, 2002). O Cerrado também possui um número significativo de endemismos, chegando, por exemplo, a 38% do total de espécies de répteis e 44% da flora, sendo a savana tropical mais diversificada do mundo (Machado *et al.*, 2004; Klink e Machado, 2005). Também relacionada a essa grande variação de fisionomias, existe uma grande diferenciação florística. Ratter *et al.* (2003) identificaram que, das 914 espécies de árvores e arbustos encontradas em 315 localidades do Cerrado central e algumas manchas de Cerrado (excluindo áreas disjuntas da Amazônia), apenas cerca de um terço são encontradas em mais que oito localidades e 614 foram encontradas em poucas áreas, sendo consideradas "muito raras". Cerca da metade dessas árvores foram encontradas em apenas uma localidade ("unicatas"). Em relação ao total de espécies endêmicas no mundo, de acordo com Myers *et al.* (2000) o Cerrado abriga cerca de 1,5% de todas as plantas bem como 0,4% das espécies de vertebrados.

4.2. Divisões do Cerrado

O Cerrado abrange o Cerrado central, que ocupa o planalto central do Brasil, estendendo-se até o Piauí e o Maranhão e ocupando cerca de 1,5 milhão de Km², e áreas disjuntas, conhecidas como Cerrados marginais, que são encontradas nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste, localizadas em outros domínios que não o domínio Cerrado (Coutinho, 2000; Costa *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2004). No Norte, essas áreas são conhecidas como "savanas amazônicas", as quais são encontradas também em outros países amazônicos, como Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia e Bolívia (Eiten, 1972; Magnusson *et al.*, 2008). Muito embora possuam menor riqueza que as savanas do Brasil Central, as savanas amazônicas possuem várias espécies em comum com as primeiras, com cerca de metade das espécies encontradas em ambas as áreas (Ratter *et al.*, 2003; Magnusson *et al.*, 2008).

Além da subdivisão entre Cerrado central e Cerrados marginais, análises florísticas demonstraram um forte padrão geográfico na distribuição da flora entre as áreas amostradas, permitindo a distinção das seguintes regiões (Ratter *et al.* 2003) (Fig. 6):

- 1) Sul: Paraná, São Paulo e sul de Minas Gerais
- 2) Central e Sudeste: Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal

- 3) Centro-oeste: a maior parte do Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul, oeste do Tocantins e sudeste do Pará
- 4) Extremo-oeste: Rondônia
- 5) Norte e Nordeste: Bahia, Ceará, extremo norte de Minas Gerais, Maranhão, Tocantins, Piauí e Pará (Alter do Chão)
- 6) Grupos disjuntos das savanas amazônicas

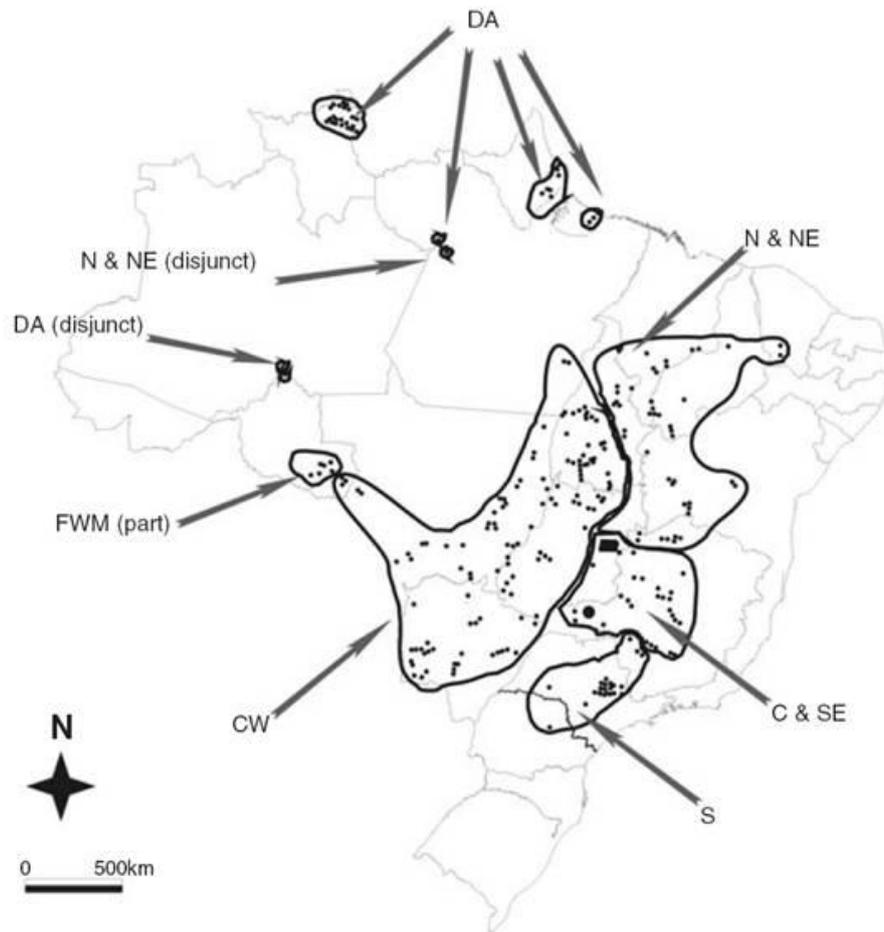


Figura 6. Localização das seis regiões florísticas de Cerrado de acordo com Ratter *et al.* (2003). S, Sul; C & SE, Central e Sudeste; CW, Centro-oeste; N & NE, Norte e Nordeste; DA, grupos disjuntos das savanas amazônicas; FWM, Oeste. Retirado de Ratter *et al.* (2003)

Essa subdivisão também parece ser corroborada por dados biogeográficos e filogeográficos (Fiaschi e Pirani, 2009). Para a Asteraceae *Lychnophora ericoides* Mart., uma diferenciação entre as populações encontradas na região central e as encontradas no sudeste foi detectada, sem nenhum haplótipo compartilhado entre essas duas áreas (Collevatti *et al.*, 2009). Ainda de acordo com os autores, é provável que a distribuição disjunta encontrada atualmente seja uma consequência da expansão da distribuição geográfica ocorrida durante períodos mais secos e frios, seguida da retração

da distribuição em períodos mais úmidos e quentes. Para *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo, uma Melastomataceae endêmica de savanas rochosas do Brasil central, um alto nível de diferenciação foi encontrado e o isolamento das populações também foi relacionado a eventos de expansão e retração ocorridos durante o Pleistoceno (Collevatti *et al.*, 2012a). Ramos *et al.* (2007) encontraram para *Hymenaea stignocarpa* uma divisão semelhante, onde as populações se agruparam geograficamente em oeste, central e leste. Para esses autores, entretanto, durante o período glacial houve extinção de populações ao sul de distribuição da espécie, a qual haveria sido recolonizada posteriormente por populações localizadas mais ao norte da distribuição.

Em outro estudo, foi observado para a espécie *Plathymenia reticulata* Benth., a qual ocorre na Mata Atlântica e nas áreas centrais e na porção do Nordeste do Cerrado, uma maior diversidade em Minas Gerais e Goiás, bem como uma baixa diversidade nas populações do Nordeste e dos Cerrados mais ao sul, com vários de seus haplótipos em comum com aqueles encontrados na região central (Novaes *et al.*, 2010). Os autores sugerem que as últimas populações teriam dado origem às marginais, sendo que as populações do Nordeste teriam se originado por duas rotas diferentes, uma leste (Atlântica) e uma oeste (continental). Adicionalmente, todas as espécies que ocorreram nas áreas de savanas amazônicas apresentaram sementes aladas ou endozoocóricas, dispersas principalmente por aves e mamíferos, indicando que estes modos de dispersão fornecem maior sucesso na colonização de áreas distantes e/ou isoladas (Vieira *et al.*, 2002).

Assim, a origem dos Cerrados marginais, bem como a distribuição da diversidade genética nas populações do Cerrado, ainda permanecem pouco compreendidas. A fim de compreender melhor as relações entre diferentes populações de plantas do Cerrado, bem como sua história evolutiva, diversas espécies vêm sendo estudadas, e marcadores moleculares do tipo microssatélites vêm sendo desenvolvidos para um número cada vez maior de espécies, inclusive de plantas (por exemplo, Collevatti *et al.*, 2001; Braga *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2008; Ritter *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2012; Telles *et al.*, 2013). Mesmo assim, Werneck *et al.* (2012) ainda enfatizam a necessidade de aumentar o conhecimento dos padrões de distribuição da diversidade genética ao longo do Cerrado para identificar áreas críticas para proteção.

4.3. Conservação do Cerrado

Estimativas indicam que mais da metade dos cerca de dois milhões de Km² de Cerrado que inicialmente se estendiam pelo Brasil foi transformada para a agropecuária nos últimos 35 anos, valor três vezes superior à área desflorestada na Amazônia no mesmo período (Klink e Machado, 2005). A vegetação original vem sendo substituída principalmente por pasto para gado e por plantio de soja, algodão, milho, milheto, sorgo e girassol (Machado *et al.*, 2004). De acordo com Klink e Machado (2005), "A área total para conservação é de cerca de 33.000 km², claramente insuficiente quando comparada com os principais usos da terra no Cerrado".

Por seu alto nível de endemismo e tamanhas taxas de degradação, o Cerrado foi considerado por Myers *et al.* (2000) um dos 25, atualmente 34 (Mittermeier *et al.*, 2005) *hotspots* de conservação mundiais. Entretanto, as barreiras à conservação desse Domínio encontram raízes mais profundas, pois o próprio Código Florestal exige que apenas 20% da área dos estabelecimentos agrícolas sejam preservadas como reserva legal no Cerrado, enquanto nas áreas de floresta tropical na Amazônia esse percentual sobe para 80% (Klink e Machado, 2005). Adicionalmente, ainda de acordo com esses autores, somente 2,2% do Domínio está legalmente protegido. Por esses motivos, estudos que possibilitem uma melhor compreensão do Cerrado estão se tornando cada vez mais necessários (Ratter *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2004; Klink e Machado, 2005).

A identificação de áreas críticas para conservação tem se tornado cada vez mais necessária, especialmente devido à intensa degradação desse domínio, mais intensa em áreas de maior ocupação humana e com maior quantidade de remanescentes naturais (Silva *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2012). As principais ameaças ao domínio incluem agricultura, pasto, extrativismo e queimadas. Em um estudo recente, Rachid *et al.* (2013) observaram, inclusive, redução na população de bactérias e significativa mudança estrutural na comunidade de bactérias do solo cultivado por cana de açúcar quando comparado ao solo ocupado por espécies nativas. Por apresentar alta resiliência, entretanto, a regeneração natural de áreas abandonadas tem provado ser uma eficiente medida de restauração, mesmo em áreas de monocultura (Soares e Nunes, 2013).

Entretanto, devido a todas as ameaças ao domínio, associados ao aumento na temperatura média global e suas consequências, é possível que a distribuição de muitas espécies seja alterada, caso nada seja feito. Por exemplo, para *Caryocar brasiliense* A. St.-Hil., foi predito que em 50 anos as únicas áreas climáticas propícias ao seu

desenvolvimento estarão restritas ao limite sul da distribuição do Cerrado, o qual são também as áreas de maior distúrbio e cujas populações possuem os mais altos níveis de endogamia no presente (Collevatti *et al.*, 2011). Para *Dipteryx alata* Vogel um padrão similar de modificação na distribuição foi observado em 50 anos, entretanto, por possuir uma maior tolerância, a mesma não sofreria alterações genéticas significativas até um limite de 50% de redução nas áreas climaticamente propícias (Diniz-Filho *et al.*, 2012).

O pequeno número de unidades de conservação no domínio tornam a necessidade de estudos que identifiquem áreas prioritárias ainda mais iminentes. Existem poucas reservas de grande tamanho (acima de 25.000 ha) e as mesmas não são distribuídas de forma uniforme no domínio (da Silva e Bates, 2002). Por exemplo, no estado de São Paulo, somente 0,5% deste domínio encontra-se protegido por unidades de conservação e os fragmentos remanescentes sofrem ameaças que incluem o isolamento, risco de incêndios e invasão por espécies vegetais exóticas (Durigan *et al.*, 2004; 2007). De acordo com Coutinho (2000), "é extremamente urgente que novas unidades de conservação representativas dos Cerrados sejam criadas ao longo de toda a extensão desse domínio, não só em sua área nuclear, mas também em seus extremos norte, sul, leste e oeste. Só assim se conseguirá conservar, a tempo, o maior número de espécies de sua rica e variadíssima flora e fauna".

5. *Alibertia edulis* (Rich.) A.Rich. ex D.C. e *Qualea grandiflora* Mart.

Os Cerrados apresentam uma flora muito diversa, com mais de 800 espécies de árvores e talvez quatro vezes essa quantidade de ervas e arbustos (Oliveira e Gibbs, 2000; da Silva e Bates, 2002). Em uma abrangente análise da composição florística do Cerrado, Ratter *et al.* (2003) investigaram 376 áreas encontradas tanto no Cerrado central quanto nos marginais, listando as espécies de acordo com a sua ocorrência. Espécies de distribuição ampla (encontradas tanto nas áreas centrais quanto nas savanas amazônicas), por exemplo, foram identificadas com a letra "W" (do inglês, *widespread*). Um estudo que vise compreender as relações filogeográficas de espécies de plantas do Cerrado deveria, idealmente, incluir espécies dentro desta categoria, pertencentes a famílias distintas, a fim de não incorrer no erro de detectar as relações da família e não do domínio, e preferencialmente incluir espécies com características ecológicas e de distribuição distintas, a fim de evitar estar detectando as relações ecológicas e não do

domínio. Dentre as diversas espécies que se enquadram nessa categoria, se encontram *Alibertia edulis* (Rich.) A.Rich. ex D.C. (Rubiaceae) e *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae).

5.1. *Alibertia edulis*

A família Rubiaceae é composta por ervas, subarbustos, arbustos e árvores, menos frequentemente lianas, possuindo folhas opostas, menos frequentemente verticiladas, simples, com margem inteira (Judd *et al.*, 2009). Possui distribuição cosmopolita, concentrada nos trópicos, incluindo aproximadamente 550 gêneros e 9.000 espécies, dos quais 120 gêneros e 2.000 espécies ocorrem no Brasil, correspondendo a uma das principais famílias da flora brasileira e constituindo um importante elemento em quase todas as formações naturais (Souza e Lorenzi, 2008). O gênero *Alibertia* possui 28 entradas de espécies aceitas segundo o The Plant List. Na filogenia do gênero *Alibertia*, a espécie *A. edulis* pertence ao clado *Alibertia edulis*, o qual tem centro de diversidade no oeste amazônico (Persson, 2000). Ainda de acordo com Persson (2000), *A. edulis* é uma espécie amplamente distribuída também encontrada em savanas.

A espécie *A. edulis* (Fig 7 a-c) , comumente conhecida como goiaba preta ou marmelinho do Cerrado, é uma espécie arbórea das savanas brasileiras que pode atingir até oito metros de altura (Fig. 7 a), com folhas verde-escuras simples, opostas, cruzadas, com ápices agudos a acuminados, margens inteiras, nervuras secundárias impressas na face superior e salientes na inferior (Fig. 7 b), com pecíolos de até 1,5 cm de comprimento e flores brancas (Fig. 7 b) (Silva *et al.*, 2008; Silva Júnior e Pereira, 2009). Pertence ao grupo informal denominado "Alibertia", o qual é composto por 11 gêneros e cerca de 120 espécies (Persson, 2000). Dentre esses, o gênero *Alibertia*, juntamente com os gêneros *Tocoyena* e *Palicourea* (os quais não fazem parte do grupo Alibertia), destacam-se no Cerrado (Souza e Lorenzi, 2008). Todos os membros do grupo Alibertia são arbustos ou árvores dióicos, com corola de estivação contorta, frutos indeiscentes com muitas sementes e com polpa succulenta (Fig. 7 c) (Persson *et al.*, 2000). No caso de *A. edulis*, espécie-tipo do gênero, os grãos de pólen são do tipo porado (Persson, 2000) e os frutos ficam pretos quando maduros (Silva Júnior e Pereira, 2009).

No Brasil Central, a espécie ocorre nas margens das matas de galeria, matas estacionais e cerradões, enquanto nos campos arbustivo-arbóreos da Ilha de Marajó ela ocorre de forma isolada ou formando aglomerados, em áreas que em geral ficam

afastadas das zonas de inundação anual (Amaral *et al.*, 2007; Silva Júnior e Pereira, 2009). Sua floração é mais frequente entre setembro e outubro, com pico de amadurecimento de seus frutos entre novembro e janeiro. Ainda não há informações sobre sua polinização, mas a dispersão de seus frutos é feita por animais (Silva Júnior e Pereira, 2009).

Além de seu potencial como planta ornamental, os frutos de *A. edulis*, apesar de possuírem pouca polpa, são uma importante fonte de alimentação para a população local (Almeida *et al.*, 1998, Silva *et al.*, 2008). Além disso, o fruto também é parte da dieta da fauna nativa do Cerrado (Souza-Silva e Ferreira, 2004). A reprodução sexual é a única forma de propagação conhecida para a espécie e a viabilidade das sementes diminui com o tempo, pela dessecação (Silva *et al.*, 2008). A espécie se mostra de grande utilidade em sistemas agroflorestais, pois pode ser utilizada como frutífera, madeireira, medicinal, além de poder ser utilizada no reflorestamento da mata ciliar (Pott e Pott, 2003).

Análises moleculares recentes demonstraram que o gênero *Borojoa* faz parte do gênero *Alibertia*, assim como a espécie *Randia tessmannii* (Persson, 2000). Ainda de acordo com esses autores, o gênero *Alibertia* foi subdividido em dois clados, o clado "*Alibertia edulis*" e o clado "*Alibertia sessilis*", os quais também se diferenciam morfológicamente principalmente pela diferença no tamanho de seus frutos.

5.2. *Qualea grandiflora*

A espécie *Q. grandiflora*, conhecida popularmente como pau-terra, é uma das principais representantes da família Vochysiaceae no Cerrado. Vochysiaceae possui distribuição Neotropical, exceto pelos gêneros *Erismadelphus* e *Korupodendron*, nativos da África Ocidental (Souza e Lorenzi, 2008). A família compreende plantas sempre lenhosas, geralmente arbóreas, que se caracterizam por possuir uma pétala maior do que as outras, basalmente expandida ou modificada como esporão e geralmente com um único estame fértil oposto à pétala maior. Inclui oito gêneros e cerca de 250 espécies, dos quais seis gêneros e aproximadamente 150 espécies ocorrem no Brasil (Barbosa, 1999; Souza e Lorenzi, 2008; Judd *et al.*, 2009). Além do gênero *Qualea*, são encontrados nos Cerrados brasileiros os gêneros *Vochysia* (pau-de-tucano, cambará), *Callisthene* (itapicuru, pau-de-pilão), além da espécie monotípica *Salvertia convallariodora* (colher-de-vaqueiro) (Souza e Lorenzi, 2008).

A família tem grande importância na caracterização fitofisionômica do ambiente onde ocorre, pois, durante a época da floração, suas espécies se destacam através de suas inflorescências alongadas e vistosas (Barbosa, 1999). Essa elevada frequência de ocorrência da família no Brasil Central vem sendo explicada por uma de suas principais características, a propriedade de acumular alumínio em suas folhas (Barbosa, 1999). As Vochysiaceae foram tradicionalmente associadas às Rutales (Sapindales) ou às Polygalales, e apenas após o advento de trabalhos de filogenia ficou evidente sua relação com as Myrtales (Barbosa, 1999; Souza e Lorenzi, 2008).

Qualea grandiflora tem hábito arbustivo-arbóreo (Fig. 7 d), chegando até 30 m de altura, com casca espessa e folhas opostas cruzadas, coriáceas (Paulilo, 1991; Hiruma-Lima *et al.*, 2006). Possui nectários extraflorais dispostos junto ao pecíolo, flores com uma única pétala de cor amarela (Fig. 7 e), frutos deiscentes, secos, com três valvas lenhosas, de sementes aladas (Fig. 7 f) (Fonte: Rede de Sementes do Cerrado; Gaspi *et al.*, 2006). Parte dessas sementes (cerca de 80% da produção) se trata de sementes escuras, inviáveis, e mesmo as demais, claras, possuem baixa taxa de germinação, a qual é aumentada quando o tegumento é retirado (Paulilo, 1991). São plantas decíduas, cuja brotação ocorre no início da estação chuvosa, polinizadas por mariposas e dispersas anemocoricamente (Fonte: Rede de Sementes do Cerrado; Ferreira *et al.*, 2001; Lenza e Klink, 2006). A baixa restrição da espécie em relação aos níveis de recursos e condições (luminosidade e nutrientes no solo) parecem ser a causa da grande amplitude geográfica de sua distribuição, pois *Q. grandiflora* é a lenhosa de maior distribuição no Cerrado (Ratter *et al.*, 2003; Costa e Santos, 2011).

As Vochysiaceae apresentam reduzida utilidade econômica, sendo usadas apenas em algumas regiões como medicinais e madeireiras, além do uso esporádico de algumas espécies como ornamentais (Hiruma-Lima *et al.*, 2006; Ayres *et al.*, 2008; Souza e Lorenzi, 2008). Ecologicamente, além dos recursos oferecidos pelas flores, os representantes da família também oferecem ao ecossistema recursos alimentares adicionais, como casca e exsudatos, como observado pelo uso por primatas e insetos (Barbosa, 1999).

Apesar de sua amplitude de distribuição e de sua importância ecológica, foi demonstrado, em uma área de cerradão, que a população de *Q. grandiflora* está em declínio, com a maior parte dos indivíduos encontrados nas classes finais de diâmetro (ou seja, indivíduos adultos), e um baixo nível de recrutamento (Silva e Soares 1999). Recentemente, porém, *primers* para amplificar regiões de SSR nucleares foram

descritos para *Q. grandiflora*, representando um grande passo para o início de análises populacionais dessa espécie (Ritter *et al.*, 2012). Estes locos poderão auxiliar na compreensão não apenas de sua dinâmica populacional, mas das relações entre as diferentes populações.

Dessa forma, com suas diferentes características morfológicas e ecológicas, *A. edulis* e *Q. grandiflora* representam boas ferramentas para uma análise que vise compreender melhor as relações biogeográficas entre os Cerrados marginais e o Cerrado central. Tal análise se torna cada vez mais urgente, face à crescente degradação desse domínio ameaçado.

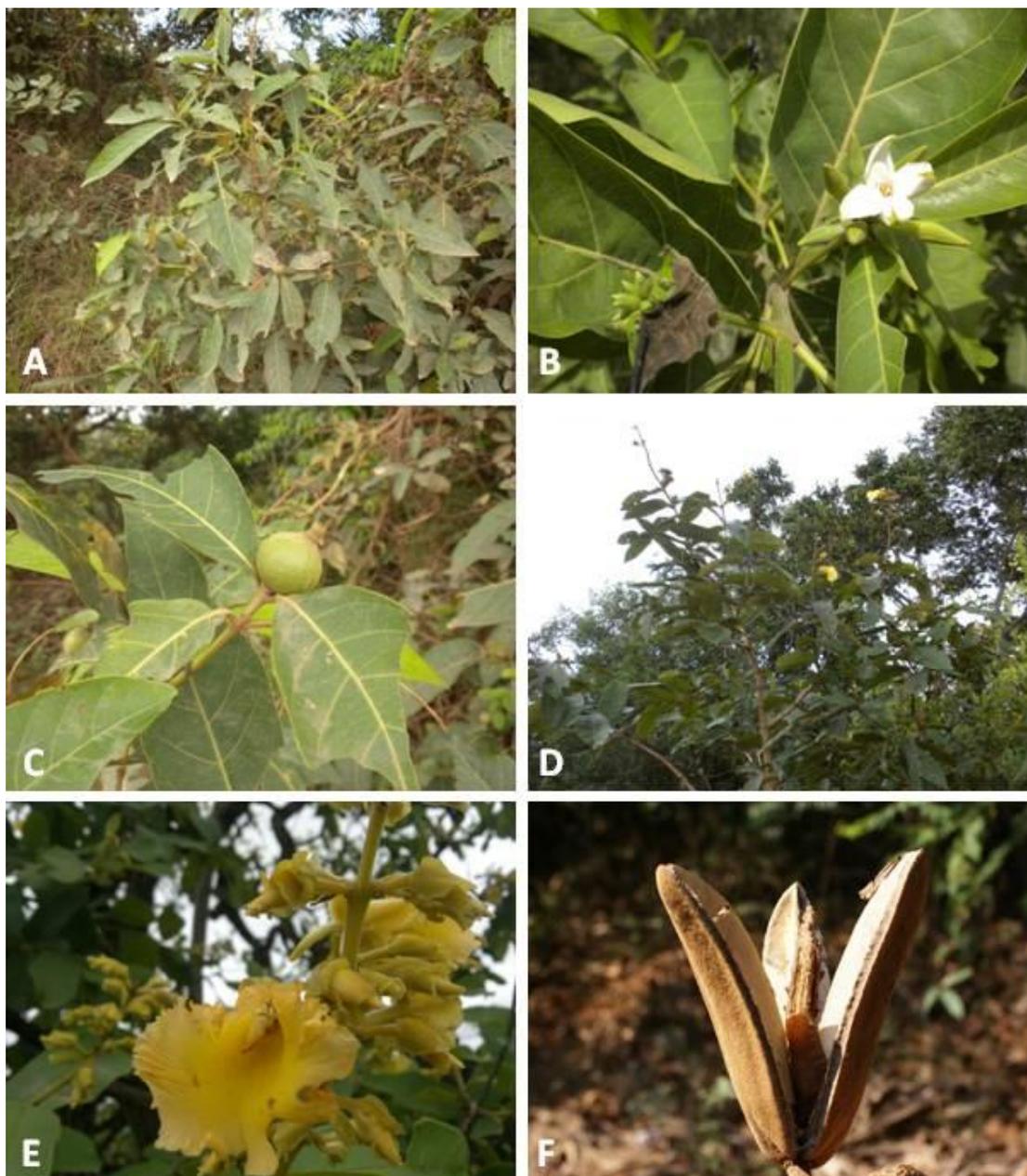


Figura 7. Espécies analisadas. (A) Indivíduo de *Alibertia edulis* de Uruçuí (Piauí); (B) Detalhe da inflorescência de *A. edulis*, mostrando uma flor de cor branca, com destaque também para as nervuras na face adaxial das folhas; (C) Fruto imaturo de *A. edulis*, com destaque também para a filotaxia oposta cruzada; (D) Indivíduo de *Q. grandiflora* de Uruçuí (Piauí) em floração; (E) Detalhe da inflorescência de *Q. grandiflora*, destacando a pétala única de cor amarela; (F) Fruto de *Q. grandiflora*, após a deiscência, com detalhe para semente alada no interior do fruto. Fotos A-E - da autora; foto F - <http://www.kew.org/>

Referências

- Adrianoelina O, Rakotondraoelina H, Ramamonjisoa L, Maley J, Danthu P, Bouvet J. 2006. Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae) an endangered tree species in the fragmented oriental forest of Madagascar. **Biodivers Conserv** **15**: 1109-1128.
- Allendorf FW, Luikart G, Aitken SN. 2013. **Conservation and the Genetics of Populations**. 2 ed. Wiley-Blackwell, West Sussex, USA. 602p
- Almeida SP, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF. 1998. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. 1a ed. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, DF. 464p
- Alves RJV, Cardin L, Kropf MS. 2007. Angiosperm disjunction "campos rupestres-restingas": a re-evaluation. **Acta bot bras** **21**: 675-685
- Amaral DD, Vieira ICG, Salomão RP, Almeida SS, Silva JBF, Neto SVC, Santos JUM, Carreira LMM, Bastos MNC. 2007. **Campos e florestas das bacias dos rios Atua e Anajás, Ilha do Marajó, Pará**. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, Brasil. 110p
- Andrade CCF. 2006. Estudo da estrutura genética das populações de saguis (*Callithrix spp.*) introduzidos em área de ocorrência do mico leão dourado (*Leontopithecus rosalia*), utilizando a técnica do DNA microssatélites. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro.
- Angeloni F, Wagemaker N, Vergeer P, Ouborg J. 2012. Genomic toolboxes for conservation biologists. **Evol Appl** **5**: 130-143
- Antonelli A, Sanmartin I. 2011. Why are there so many plant species in the Neotropics? **Taxon** **60**: 403-414
- Archibald JK, Mort ME, Crawford DJ, Santos-Guerra A. 2006. Evolutionary relationships within recently radiated taxa: comments on methodology and analysis of inter-simple sequence repeat data and other hypervariable dominant markers. **Taxon** **55(3)**: 747-756
- Avice JC. 2000. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press Cambridge, Massachusetts, USA. 447p
- Avice JC. 2004. **Molecular markers: natural history and evolution**. 2nd edition. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA. 684p

- Ayres MCC, Escórcio SP, Costa DA, Chaves MH. 2008. Constituintes químicos das folhas de *Qualea grandiflora*: atribuição dos dados de RMN de dois flavonóides glicosilados acilados diastereoisoméricos. **Quim Nova** 31: 1481-1484
- Azevedo VCR, Kanashiro M, Ciampi AY, Grattapaglia D. 2007. Genetic structure and mating system of *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev., a heavily logged Amazonian timber species. **J Hered** 98: 646-654.
- Banhos A. 2009. Genética, distribuição e conservação do gavião-real (*Harpia harpyja*) no Brasil. **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.
- Batalha MA, Martins FR. 2007. The vascular flora of the cerrado in Emas National Park (Central Brazil): a savanna flora summarized. **Braz Arch Biol Techno** 50: 269-277
- Barbosa AR. 1999. As espécies do gênero *Vochysia* Aubl. (Vochysiaceae) ocorrentes no estado de São Paulo. **Tese de mestrado**. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas.
- Braga AC, Reis AMM, Leoi LT, Pereira RW, Collevatti RG. 2007. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Mol Ecol Notes** 7: 53-56
- Borlaug NE. 2002. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey (ed). **Global warming and other eco-myths**. Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA. 320p
- Brookes AJ. 1999. The essence of SNPs. **Gene** 234: 177-186
- Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV. 2003. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. **TRENDS Ecol Evol** 18: 249-256
- Cavallari MM. 2008. Variabilidade genética e química entre e dentro de populações de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) no estado de São Paulo. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.
- Castro AAJF, Martins FR, Tamashiro JY, Shepherd GJ. 1999. How rich is the flora of Brazilian cerrados? **Ann Mo Bot Gard** 86: 192-224
- Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Mol Ecol** 10: 349-356

- Collevatti RG, Rabelo SG, Vieira RF. 2009. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. **Ann Bot** **104**: 655-664
- Collevatti RG, Nabout JC, Diniz-Filho JAF. 2011. Range shift and loss of genetic diversity under climate change in *Caryocar brasiliense*, a Neotropical tree species. **Tree Genetics and Genomes** **7**: 1237-1247
- Collevatti RG, Castro TG, Lima JS, Telles MPC. 2012a. Phylogeography of *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae), and endangered tree species from rocky savannas, suggests bidirectional expansion due to climate cooling in the Pleistocene. **Ecol Evol** **2**: 1024-1035
- Collevatti RG, Terribile LC, Lima-Ribeiro MS, Nabout JC, Oliveira G, Rangel TF, Rabelo SG, Diniz-Filho JAF. 2012b. A coupled phylogeographical and species distribution modelling approach recovers the demographical history of a Neotropical seasonally dry forest tree species. **Mol Ecol** **21**: 5845-5863
- Costa RC, Santos FAM. 2011. Padrões espaciais de *Qualea grandiflora* Mart. em fragmentos de cerrado no estado de São Paulo. **Acta Bot Brasilica** **25**: 215-222
- Costa IR, Araújo FS, Lima-Verde LW. 2004. Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. **Acta Bot Brasilica** **18**: 759-770
- Coutinho LM. 1978. O conceito de cerrado. **Rev Brasil Bot** **1**:17-23.
- Coutinho, LP. 2000. O bioma do cerrado. In: Klein, AL (org). **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois**. Editora UNESP, São Paulo, Brasil. 156p
- Crnokrak P, Roff DA. 1999. Inbreeding depression in the wild. **Heredity** **83**: 260-270.
- Crichton RJ, Squirell J, Woodin SJ, Dalrymple SE, Hollingsworth PM. 2012. Isolation of microsatellite primers for *Melampyrum sylvaticum* (Orobanchaceae), an endangered plant in the United Kingdom. **Am J Bot** **99**: e457-e459
- Cunha HA, Solé-Cava AM. 2012. Análise filogeográfica. In: Matioli SR e Fernandes FMC (eds). **Biologia Molecular e Evolução**. 2a ed. Holos Editora, Ribeirão Preto, Brasil. 256p
- da Silva JMC, Bates JM. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American cerrado: a tropical savanna hotspot. **BioScience** **52**: 225-234
- Dainou K, Bizoux J, Doucet J, Mahy G, Hardy OJ, Heuertz M. 2010. Forest refugia revisited: nSSRs and cpDNA sequences support historical isolation in a wide-spread

- African tree with high colonization capacity, *Milicia excelsa* (Moraceae). **Mol Ecol** **19**: 4462-4477
- Dawson MN, Algar AC, Antonelli A, Dávalos LM, Davis E, Early R, Guisan A, Jansson R, Lessard J-P, Marske KA, McGuire JL, Stigall AL, Swenson NG, Zimmermann NE, Gavin DG. 2013. An horizon scan of biogeography. **Front Biogeogr** **5**: 130-145
- Dick CW. 2010. Phylogeography and population structure of tropical trees. **Trop Plant Biol** **3**: 1-3
- Diniz-Filho JAF, Collevatti RG, Chaves LJ, Soares TN, Nabout JC, Rangel TF, Melo DB, Lima JS, Telles MPC. 2012. Geographic shifts in climatically suitable areas and loss of genetic variability in *Dipteryx alata* ("Baru" tree; Fabaceae). **Genet Mol Res** **11**: 1618-1626
- Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Jordano P, Salvini D, Vendramin GG, Petit RJ. 2007. Can population genetic structure be predicted from life-history traits? **Am Nat** **169**: 662-672
- Dumolin-Lapegue S, Pemonge M-H, Petit RJ. 1997. An enlarged set of consensus *primers* for the study of organelle DNA in plants. **Mol Ecol** **6**:393-397
- Durigan G, Franco GADC, Siqueira MF. 2004. A vegetação dos remanescentes de cerrado no Estado de São Paulo. *In*: Bittencourt MD, Mendonça RR (orgs) **Viabilidade da conservação dos remanescentes de Cerrado no Estado de São Paulo**. Annablume, FAPESP, São Paulo. 169p
- Durigan G, Siqueira MF, Franco GADC. 2007. Threats to the Cerrado remnants of the State of São Paulo, Brazil. **Sci Agric** **64**: 355-363.
- Eiten G. 1972. The cerrado vegetation of Brazil. **Bot Rev** **38**: 201-341
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nat Rev Genet** **5**: 435-445.
- Ellstrand NC, Elam DR. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annu Rev Ecol Syst** **24**: 217-242.
- England PR, Osler GHR, Woodworth LM, Montgomery ME, Briscoe DA, Frankham R. 2003. Effects of intense versus diffuse population bottlenecks on microsatellite genetic diversity and evolutionary potential. **Conserv Genet** **4**: 595-604.

- Evans SR, Sheldon BC. 2008. Interspecific patterns of genetic diversity in birds: correlations with extinction risk. **Conserv Biol** **22**: 1016-1025.
- Excoffier L. 2004. Special issue: analytical methods in phylogeography and genetic structure. **Mol Ecol** **13**: 727
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Mol Ecol Notes** **7**: 574-578.
- Felfili JM, Silva Júnior MC. 2005. Diversidade alfa e beta no cerrado *sensu stricto*, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais e Bahia. In: Scariot A, Sousa-Silva JC, Felfili JM (orgs) **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília. Ministério do Meio Ambiente. 439p.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. 1996. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 2^a. ed. EMBRAPA/CENARGEN. 220p.
- Ferreira RA, Davide AC, Tonetti OAO. 2001. Morfologia de sementes e plântulas de pau-terra (*Qualea grandiflora* Mart. - Vochysiaceae). **Rev Bras Sementes** **23**: 116-122
- Fiaschi P, Pirani JR. 2009. Review of plant biogeographic studies in Brazil. **J Syst Evol** **47**: 477-496
- Field DL, Ayre DJ, Whelan RJ, Young AG. 2009. Molecular and morphological evidence of natural interespecific hybridization between the uncommon *Eucalyptus aggregata* and the wildespread *E. rubida* and *E. viminalis*. **Conserv Genet** **10**: 881-896.
- Franceschinelli EV, Jacobi CM, Drummond MG, Resende MFS. 2006. The genetic diversity of two Brazilian *Vellozia* (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. **Ann Bot** **97**: 585-592.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2006. **Introduction to Conservation Genetics**. University Press, Cambridge. 617p.
- Furley PA, Ratter JA. 1988. Soil resources and plant communities of the central Brazilian cerrado and their development. **J Biogeogr** **15**: 97-108
- Garcia AAF, Benchimol LL, Barbosa AMM, Geraldi IO, Souza Jr CL, Souza AP. 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. **Genet Mol Biol** **27**: 579-588.
- Garcia MG, Silva RS, Carniello MA, Veldman JW, Rossi AAB, Oliveira LO. 2011. Molecular evidence if cryptic speciation, historical range expansion, and recent

- intraspecific hybridization in the Neotropical seasonal forest tree *Cedrela fissilis* (Meliaceae). **Mol Phylogenet Evol** **61**: 639-649
- Gaspi FOG, Foglio MA, Carvalho JE, Moreno RA. 2006. Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart. **J Ethnopharmacol** **107**: 19-24
- Goldstein PZ, DeSalle R, Amato G, Vogler AP. 2000. Conservation genetics at the species boundary. **Conserv Biol** **14**: 120-131.
- Grivet D, Robledo-Arnuncio JJ, Smouse PE, Sork VL. 2009. Relative contribution of contemporary pollen and seed dispersal to the effective parental size of seedling population of California valley oak (*Quercus lobata*, Née). **Mol Ecol** **18**: 3967-3979.
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. **Mol Ecol Resour** **11**: 591-611
- Gutiérrez-Rodríguez C, Ornelas JF, Rodríguez-Gómez F. 2011. Chloroplast DNA phylogeography of a distylous shrub (*Palicourea padifolia*, Rubiaceae) reveals past fragmentation and demographic expansion in Mexican cloud forests. **Mol Phylogenet Evol** **61**: 603-615
- Hardy OJ, Maggia L, Bandou E, Breyne P, Caron H, Chevallier M, Doligez A, Dutech C, Kremer A, Latouche-Hallé C, Troispoux V, Veron V, Degen B. 2006. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 neotropical tree species. **Mol Ecol** **15**: 559-571.
- Hendry AP, Lohmann LG, Conti E, Cracraft J, Crandall KA, Faith DP, Häuser C, Joly CA, Kogure K, Larigauderie A, Magallón S, Moritz C, Tillier S, Zardoya R, Prieur-Richard A-H, Walther BA, Yahara T, Donoghue MJ. 2010. Evolutionary biology in biodiversity science, conservation and policy: a call to action. **Evolution** **64**:1517-1528
- Hiruma-Lima CA, Santos LC, Kushima H, Pellizzon CH, Silveira GG, Vasconcelos PCP, Vilegas W, Brito ARMS. 2006. *Qualea grandiflora*, a Brazilian "Cerrado" medicinal plant presents an important antiulcer activity. **J Ethnopharmacol** **104**: 207-214
- Ho SYW, Shapiro B. 2011. Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. **Mol Ecol Resour** **11**: 423-434
- Holsinger KE. 2010. Next generation population genetics and phylogeography. **Mol Ecol** **19**: 2361-2363

- Hughes CE, Pennington RT, Antonelli A. 2013. Neotropical plant evolution: assembling the big picture. **Bot J Linn Soc** **171**: 1-18
- Inglêz APD. 2006. Caracterização genética de *Alouatta caraya* (Primates, Atelidae) utilizando marcadores heterólogos do tipo microssatélites. **Dissertação de mestrado**. Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal.
- Ismail SA, Ghazou J, Ravikanth G, Uma Shaanker R, Kushalappa CG, Kettle CJ. 2012. Does long-distance pollen dispersal preclude inbreeding in tropical trees? Fragmentation genetics of *Dysoxylum malabaricum* in an agro-forest landscape. **Mol Ecol** **21**: 5484-5496
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2009. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. 3a ed. Artmed, Porto Alegre. 612p
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica** **177**: 309-334
- Klink CA, Machado RB. 2005. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conserv Biol** **19**: 707-713
- Krakowski J, Aitken SN, El-Kassaby YA. 2003. Inbreeding and conservation genetic in whitebark pine. **Conserv Genet** **4**: 581-593
- Krapp F, Wohrmann T, Pinangé DS, Benko-Iseppon AM, Huettel B, Weising K. 2012. A set of plastid microsatellite loci for the genus *Dyckia* (Bromeliaceae) derived from 454 pyrosequencing. **Am J Bot** **99**: e470-e473
- Ledru M-P. 2002. Late Quaternary history and evolution of the cerrados as revealed by palynological records. *In*: Oliveira PS, Marquis RJ (eds). **The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna**. Columbia University Press, New York. 400p
- Lenza E, Klink CA. 2006. Comportamento fenológico de espécies lenhosas em um cerrado sentido restrito de Brasília, DF. **Rev Bras Bot** **29**: 627-638
- Li Y, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Mol Ecol** **11**: 2453-2465.
- Lowe A, Harris S, Ashton P. 2004. **Ecological Genetics: Design, Analysis and Application**. Blackwells, Oxford. 326p
- Machado RB, Ramos Neto MB, Pereira PGP, Caldas EF, Gonçalves DA, Santos NS, Tabor K, Steininger M. 2004. **Estimativas da perda da área do cerrado brasileiro**. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF.

- Magnusson WE, Lima AP, Albernaz ALKM, Sanaiotti TM, Guillaumet J. 2008. Composição florística e cobertura vegetal das savanas na região de Alter do Chão, Santarém - PA. **Rev Bras Bot** **31**: 165-177
- Marcuzzo FFN, Melo DCR, Costa HC. 2012. Sazonalidade e distribuição espaço-temporal das chuvas no bioma do cerrado do estado do Mato Grosso do Sul. **Rev Bras Recursos Hídricos** **17**: 77-86
- Mardis ER. 2008a. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends Genet** **24**: 133-141
- Mardis ER. 2008b. Next-generation DNA sequencing methods. **Annu Rev Genomics Hum Genet** **9**: 387-402
- Martins GT. 2008. Efeitos da estrutura do habitat na diversidade genética do pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Cambess: Caryocaraceae). **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais
- McCormack JE, Faircloth BC. 2013. Next-generation phylogenetics takes root. **Mol Ecol** **22**:19-21
- Mendes IC, Fernandes MF, Chaer GM, Reis Junior FB. 2012. Biological functioning of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types. **Plant Soil** **329**: 183-195
- Mendonça R, Felfili J, Walter B, Silva Jr JC, Rezende A, Filgueiras T e Nogueira P. 1998. Flora vascular do cerrado. *In*: S. Sano e S. Almeida (eds). **Cerrado. Ambiente e Flora**. Embrapa - Cerrados. Planaltina, Brasil. 556p
- Menezes DC. 2007. Diversidade genética de cães da raça veadeiro pampeano. **Dissertação de mestrado**. Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul.
- Mills S, Soulé ME. 2013. The role of genetics in conservation. *In*: Allendorf FW, Luikart G, Aitken SN. 2013. **Conservation and the Genetics of Populations**. 2 ed. Wiley-Blackwell, West Sussex, USA. 602p
- Mittermeier RA, Gil RP, Hoffman M, Pilgrim J, Brooks T, Mittermeier CG, Lamourex J, Fonseca GAB. 2005. Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial eco-regions. University of Chicago Press, Boston, USA. 392p
- Miyaki CY, Alves MAS. 2006. Técnicas genéticas aplicadas à conservação. *In*: Rocha CFD, Bergallo HG, Sluys MV, Alves MAS (orgs) **Biologia da Conservação: essências**. 588p.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** **403**: 853-858

- Novaes RML, Lemes Filho JP, Ribeiro RA, Lovato MB. 2010. Phylogeography of *Plathymentia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. **Mol Ecol** **19**: 985-998
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Mol Ecol** **13**: 1143-1155.
- O'Brien SJ. 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. **Proc Natl Acad Sci USA** **91**: 5748-5755.
- O'Hanlon PC, Peakall R, Briese DT. 1999. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) reveals introgression in weedy *Onopordum* thistles: hybridization and invasion. **Mol Ecol** **8**: 1239-1246.
- Ojeda-Camacho M, Kjær ED, Philipp M. 2013. Population genetics of *Guibourtia chodatiana* (Hassl.) J. Leonard, in a dry Chiquitano forest of Bolivia. **Forest Ecology and Management** **289**: 525-534
- Oliveira PE, Gibbs PE. 2000. Reproductive biology of woody plants in a cerrado community of central Brazil. **Flora** **195**: 311-329
- Ouborg NJ, Piquot Y, van Groenendael JM. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **J Ecol** **87**: 551-568
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F, Barbará T, Fay MF, Cozzolino S, Lexer C. 2011. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. **Mol Ecol** **20**: 3185-3201
- Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC, Fuerst PA. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology** **79**(2): 361-382.
- Paulilo MTS. 1991. *Qualea grandiflora* Mart.: crescimento inicial e crescimento foliar em árvores. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, Brasil.
- Pennington RT, Prado DE, Pendry CA. 2000. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. **J Biogeogr** **27**: 261-273
- Persson C. 2000. Phylogeny of the Neotropical *Alibertia* group (Rubiaceae), with emphasis on the genus *Alibertia*, inferred from ITS and 5S ribosomal DNA sequences. **Am J Bot** **87**: 1018-1028

- Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Salvini D, Vendramin GG. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. **Mol Ecol** **14**: 689-701
- Phillips RD, Dixon KW, Peakall R. 2012. Low population genetic differentiation in the Orchidaceae: implications for the diversification of the family. **Mol Ecol** **21**:5208-5220
- Pott A, Pott VJ. 2003. **Plantas Nativas potenciais para sistemas agroflorestais em Mato Grosso do Sul**. In: Seminário Sistemas agroflorestais e desenvolvimento sustentável. Campo Grande: Embrapa.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** **155**: 945-959
- Rachid CTCC, Santos AL, Piccolo MC, Balieiro FC, Coutinho HLC, Peixoto RS, Tiedje JM, Rosado AS. 2000. Effect of sugarcane burning or green harvest methods on the Brazilian cerrado soil bacterial community structure. **PLOS One** **8**: 1-8
- Rakoczy-Trojanowska M, Bolibok H. 2004. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cell Mol Biol Lett** **9**: 221-238.
- Ramos ACS, Lemes-Filho JP, Ribeiro RA, Santos FR, Lovato MB. 2007. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of Quaternary climate changes in the Brazilian cerrado. **Ann Bot** **100**: 1219-1228
- Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S. 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Ann Bot** **80**: 223-230
- Ratter JA, Bridgewater S, Ribeiro JF. 2003. Analysis of the floristic composition of the Brazilian cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinb J Bot** **60**: 57-109
- Ritter LMO, Bajay MM, Monteiro M, Souza RGVC, Moreno MA, Kageyama PY. 2012. Development of microsatellite markers for *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae), a typical species of the Brazilian cerrado. **Am J Bot** e97-e98
- Rocha GF, Ferreira LG, Ferreira NC, Ferreira ME. 2012. Detecção de desmatamento no bioma cerrado entre 2002 e 2009: padrões, tendências e impactos. **Revista Brasileira de Cartografia** **63**: 341-349

- Saarinen EV, Austin JD. 2010. When technology meets conservation: increased microsatellite marker production using 454 genome sequencing on the endangered Okaloosa Darter (*Etheostoma okaloosae*). **J Hered** **101**: 784-788
- Schlotterer C. 2004. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Nat Rev Genet** **5**: 63-69.
- Scotti-Saintagne C, Dick CW, Caron H, Vendramin GG, Guichoux E, Buonanici A, Duret C, Sire P, Valencia R, Lemes MR, Gribel R, Scotti I. 2013. Phylogeography of a species complex of lowland Neotropical rain forest trees (*Carapa*, Meliaceae). **J Biogeogr** **40**: 676-692
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **Am J Bot** **92**: 142-166
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **Am J Bot** **94**: 275–288.
- Silva JMC, Bates JM. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. **BioScience** **52**(3): 225-234
- Silva DW, Soares JJ. 1999. Estrutura etária das principais populações arbóreas em uma área de cerradão na Fazenda Canchim, São Carlos, SP. **Revista de Ciências Exatas e Naturais** **1**: 57- 65
- Silva FAB, Pereira LAR, Silveira CES. 2008. Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. **Braz Arch Biol Technol** **51**: 1103-1114
- Silva GBS, Formaggio AR, Shimabukuro YE. 2010. Áreas alteradas em função de atividades antrópicas no bioma cerrado localizado no estado do Mato Grosso (MT), até o ano de 2001: uma abordagem espaço-temporal. **Revista Brasileira de Cartografia** **62**: 363-371
- Silva Júnior MC, Pereira BAS. 2009. **+100 árvores do cerrado matas de galeria**. Rede de Sementes do Cerrado, Brasília. 288p
- Simon MF, Pennington T. 2012. Evidence for adaptation to fire regimes in the tropical savannas of the Brazilian cerrados. **Int J Plant Sci** **173**: 711-723
- Small RL, Ryburn JA, Cronn RC, Seelanan T, Wendel JF. 1998. The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for

- phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. **Am J Bot** **85**:1301-1315
- Soares MP, Nunes YRF. 2013. Regeneração natural de cerrado sob plantio de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. no norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Ceres**, **60**: 205-214
- Soares TN, Melo DB, Resende LV, Chaves LJ, Brondani RV, Collevatti RG, Telles MPC. 2012. Development of microsatellite markers for the neotropical tree species *Dipteryx alata* (Fabaceae). **Am J Bot** **99**: e72-e73
- Solé-Cava AM, Cunha HA. 2012. A genética e a conservação da Natureza. *In*: Matioli SR e Fernandes FMC (eds) **Biologia Molecular e Evolução**. 2 ed. Holos Editora, Ribeirão Preto. 256p
- Solé-Cava AM. 2004. Biodiversidade molecular e genética da conservação. *In*: Matioli SR (org.), **Biologia Molecular e Evolução**. 1 ed. Holos Editora, Ribeirão Preto. 202p
- Solferini VN, Selivon D. 2004. Polimorfismos de isoenzimas. *In*: Matioli SR (org.), **Biologia Molecular e Evolução**. 1 ed. Holos Editora, Ribeirão Preto. 202p
- Souza VC, Lorenzi H. 2008. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2 ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP. 704p
- Souza-Silva M, Ferreira RL. 2004. Heterotrophic succession in *Alibertia edulis* fruits: variation in resource availability and temporal heterogeneity of microhabitats for invertebrates. **Ecotropica** **10**: 23-32
- Spielman D, Brook BW, Frankham R. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. **Proc Natl Acad Sci USA** **101**: 15261-15264.
- Squirrell J, Hollingsworth PM, Woodhead M, Russel J, Lowe AJ, Gibby M, Powell W. 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? **Mol Ecol** **12**: 1339-1348
- Sunnuks P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. **Trends Ecol Evol** **15**: 199-203
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991. Universal *primers* for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Mol Biol** **17**: 1105-1109
- Telles MPC, Silva JB, Resende LV, Vianello RP, Chaves LJ, Soares TN, Collevatti RG. 2013. Development and characterization of new microsatellites for *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae). **Genet Mol Res** **12**: 3124-3127

- The Plant List. Disponível em: < <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=alibertia>>;
acessado em: 06 de jun de 2014
- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Mol Ecol** **22**: 1193-1213
- Vieira DLM, Aquino FG, Brito MA, Fernandes-Bulhão C, Henriques RPB. 2002. Síndromes de dispersão de espécies arbustivo-arbóreas em cerrado *sensu stricto* do Brasil Central e savanas amazônicas. **Rev Bras Bot** **25**: 215-220
- Wasser SK, Clark WJ, Drori O, Kisamo ES, Mailand C, Mutayoba B, Stephens M. 2008. Combating the illegal trade in African elephant ivory with DNA forensics. **Conserv Biol** **22**: 1065-1071.
- Werneck FP, Nogueira C, Colli GR, Sites JW, Costa GC. 2012 . Climatic stability in the Brazilian Cerrado: implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. **J Biogeogr** **39**: 1695-1706
- Wohrmann T, Wagner N, Krapp F, Huettel B, Weising K. 2012. Development of microsatellite markers in *Fosterella rusbyi* (Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. **Am J Bot** **99**: e160-e163
- Wohrmann T, Pinangé DSB, Krapp F, Benko-Iseppon A, Huettel B, Weising K. 2013. Development of 15 nuclear microsatellite markers in the genus *Dyckia* (Pitcairnioideae; Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. **Conservation Genet Resour** **5**: 81-84
- Young AG, Brown AHD, Zich FA. 1999. Genetic structure of fragmented populations of the endangered daisy *Rutisosis leptorrhynchoides*. **Conserv Biol** **13**: 256-265.
- Zalapa JE, Cuevas H, Zhu H, Steffan S, Senalik D, Zeldin E, McCown B, Harbut R, Simon P. 2012. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. **Am J Bot** **99**: 193-208
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Mol Ecol** **11**: 1-16
- Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G. 2011. The impact of next-generation sequencing on genomics. **J Genet Genomics** **38**: 95-109

CAPÍTULO 1 - Análise filogeográfica de duas espécies arbóreas revela diferenciação longitudinal dos Cerrados marginais e central

A ser submetido à

Molecular Ecology

Análise filogeográfica de duas espécies arbóreas revela diferenciação longitudinal dos Cerrados marginais e central

Liliane G Dantas^{1*}, Toby R Pennington², Andrea Pedrosa-Harand¹

¹Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal, Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670420, Recife, PE, Brasil

²Royal Botanic Garden Edinburgh, 20a Inverleith Row, EH3 5LR, Edinburgh, UK

Palavras-chave: *Alibertia edulis*, *Qualea grandiflora*, conservação, arco pleistocênico

* Autora para correspondência

Liliane G Dantas

Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal, Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670420, Recife, PE, Brasil.

dantas.lg@gmail.com

Short running title: Relações filogeográficas entre os Cerrados

RESUMO

O Cerrado, um dos 34 *hotspots* mundiais para conservação, é o segundo maior domínio fitogeográfico do Brasil e apresenta uma distribuição descontínua com diferentes composições florísticas e fisionomias, sendo dividido em Cerrado central e enclaves de Cerrado em outros domínios (Cerrados marginais). O presente trabalho objetivou investigar as relações filogeográficas entre o Cerrado central e os Cerrados marginais, a fim de compreender a origem dos Cerrados marginais e contribuir para sua conservação. Para tanto, foram amostradas populações de duas espécies, *Alibertia edulis* (Rubiaceae) e *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) por meio da análise das regiões não-codificantes do genoma cloroplastidial (cpDNA) *matK*, *ndhF* e *psbA-trnH*. Ambas as espécies apresentaram baixos níveis de polimorfismo intrapopulacional, o que refletiu em baixos valores de diversidade nucleotídica e haplotípica. Houve grande diferenciação populacional e regional, mas uma distinção entre Cerrados centrais x Cerrados

marginais não foi suportada. Para *A. edulis*, as populações do Pará, Piauí, Mato Grosso e parte de Goiás mostraram-se mais relacionadas e separadas das populações de São Paulo, Minas Gerais, Distrito Federal e centro-oeste de Goiás. As populações de *Q. grandiflora* também apresentaram forte estruturação geográfica. Três das populações analisadas, encontradas em Cerrados "marginais", apresentaram haplótipos exclusivos ou raros e por vezes ancestrais. Nossos dados sugerem um gradiente leste-oeste na distribuição da diversidade genética nas espécies do Cerrado analisadas, possivelmente resultado de disjunções ocorridas durante o Pleistoceno. As populações a oeste desse gradiente se encontram mais vulneráveis, por não se encontrarem em unidades de conservação e por estarem isoladas das demais, o que foi indicado pela presença de haplótipos exclusivos ou raros.

INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior domínio fitogeográfico brasileiro, ocupando originalmente cerca de 22% do território nacional, numa área de 1,86 milhões de km² que ocupa mais de 20° de latitude e 10° de longitude (Ratter et al., 1997; Furley e Ratter, 1988; Coutinho, 2000; Costa et al., 2004; Felfili e Silva Júnior, 2005). Possui solos ácidos e pobres em cálcio e magnésio, com uma flora adaptada ao fogo (Pennington et al., 2000; Simon et al., 2009). Essas características, incluindo fatores edáficos, ação do fogo, topografia e drenagem, levam à elevada riqueza e diversidade florística encontradas nesse domínio (Costa et al., 2004).

Por outro lado, o Cerrado se encontra na fronteira agrícola do país e estimativas indicam que mais da metade dos quase dois milhões de km² de Cerrado que inicialmente se estendiam pelo Brasil foi destinada para a agropecuária nos últimos 35 anos, valor três vezes superior à área desflorestada na Amazônia no mesmo período (Klink e Machado, 2005). Devido ao seu alto nível de endemismo, associado a suas elevadas taxas de degradação, o Cerrado foi considerado em 2005 por Mittermeier e colaboradores um dos 34 *hotspots* mundiais para a conservação. O pequeno número de unidades de conservação no domínio torna ainda mais iminentes estudos que identifiquem áreas prioritárias. Apenas 2,2% do domínio se encontra sob proteção legal, existem poucas reservas de grande tamanho (acima de 25.000 ha), e as mesmas não são distribuídas de forma uniforme no domínio (da Silva e Bates, 2002; Klink e Machado, 2005).

O Cerrado abrange o Cerrado central, que ocupa o planalto central do Brasil, estendendo-se até o Piauí e o Maranhão totalizando cerca de 1,5 milhão de km² e áreas disjuntas, conhecidas como Cerrados marginais, que são encontradas nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste, as quais estão localizadas em outros domínios que não o domínio Cerrado (Coutinho, 2000; Costa et al., 2004; Machado et al., 2004). Baseado no padrão geográfico na distribuição das espécies vegetais observado, Ratter et al. (2003) propuseram uma subdivisão do Cerrado em seis áreas, estando os Cerrados marginais isolados geograficamente do Cerrado central, como no caso dos encontrados no Sul (incluindo, em sua divisão, São Paulo) ou na Amazônia, ou associados a algumas áreas do Cerrado central, como os da subdivisão Norte e Nordeste. Ainda de acordo com esses autores, a população de Alter do Chão, localizada no estado do Pará (Cerrado marginal, encontrado na floresta Amazônica, Norte do Brasil) se mostra floristicamente mais relacionada a populações encontradas no Nordeste do Brasil do que a outras populações de Cerrado encontradas no Norte.

Acredita-se que os eventos de expansão e retração ocorridos durante o Pleistoceno possam ter contribuído para a diversificação desse domínio (Ratter et al., 1997), uma vez que esses eventos climáticos têm contribuído para a atual distribuição de outros domínios brasileiros. A hipótese do Arco Pleistocênico, por exemplo, foi proposta para explicar a conexão das florestas tropicais sazonais secas da Caatinga ao chaco (Prado e Gibbs, 1993) e tem sido corroborada por estudo mais recentes (Caetano et al., 2008). Um padrão complexo de interações entre habitats florestados e não florestados durante o Pleistoceno também foi sugerido por Capurucho et al. (2013). Estes autores analisaram populações de *Xenopipo atronitens* (Aves: Pipridae) em manchas de areia branca (campinas) imersas na floresta Amazônica, detectando padrões de expansão e conectividade entre as manchas que estariam relacionadas às alterações climáticas do Pleistoceno. Uma história complexa de diversificação também foi sugerida por Prado et al. (2012) para a espécie de sapo amplamente distribuída no Cerrado, *Hypsiboas albopunctatus*. Os autores identificaram que tanto os eventos geológicos do Terciário quanto as flutuações climáticas do Pleistoceno promoveram a diversificação genética da espécie, levando à subdivisão em três linhagens distintas.

O isolamento de alguns desses Cerrados marginais também tem sido corroborado por estudos filogeográficos em plantas, e a diferenciação encontrada vem sendo associada aos possíveis eventos de expansão da distribuição geográfica ocorrida durante períodos mais secos e frios, seguida da retração da distribuição em períodos

mais úmidos e quentes do Pleistoceno, como no caso das espécies *Lychnophora ericoides* Mart. (Collevatti et al., 2009) e *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Collevatti et al., 2012). Ainda, estudos filogeográficos têm sugerido uma origem recente para alguns Cerrados marginais a partir dos Cerrados centrais (Collevatti et al., 2003; Ramos et al., 2007; Novaes et al., 2010), considerando-se que o leste permaneceu mais ameno durante as oscilações climáticas do Pleistoceno (Ramos et al., 2007). Por fim, uma barreira leste-oeste na diversidade vem sendo identificada para diversas espécies, isolando populações muitas vezes próximas geograficamente e agrupando populações relativamente distantes geograficamente (Ramos et al., 2007; Collevatti et al., 2009; Pennington et al., 2009).

O aumento no conhecimento dos padrões de distribuição da diversidade genética ao longo do Cerrado é essencial para identificar áreas críticas para proteção (Werneck et al., 2012). A fim de compreender melhor as relações entre as diferentes populações de plantas do Cerrado, bem como sua história evolutiva, um número cada vez maior de espécies vêm sendo estudado (Collevatti et al., 2003; 2009; Braga et al., 2007; Ramos et al. 2007; 2009; Novaes et al., 2010; Ritter et al., 2012; Soares et al., 2012). A subdivisão florística do Cerrado vem sendo corroborada por vários desses estudos, entretanto estes não incluem Cerrados marginais do norte e nordeste. De fato, uma revisão recente destacou o Cerrado como uma das várias regiões no mundo onde os estudos filogeográficos são extremamente necessários (Beheregaray, 2008). Existem poucas reservas de grande tamanho (acima de 25.000 ha) para esse domínio, e as mesmas não são distribuídas de forma uniforme no domínio (da Silva e Bates, 2002), sendo localizadas principalmente no Cerrado central. É provável, entretanto, que esse sistema seja ineficiente para preservar toda a diversidade desse domínio, pois a diversidade encontrada nos Cerrados marginais pode não estar contida no Cerrado central.

Uma amostragem foi realizada ao longo da área de ocorrência do Cerrado, e duas espécies amplamente distribuídas nesse domínio, mas com diferentes características biológicas, foram selecionadas: *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. (Rubiaceae) e *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae). Utilizando DNA de cloroplasto (cpDNA), o presente estudo visou entender como se relacionam filogeograficamente os Cerrados marginais e o Cerrado central. Nossa hipótese inicial era que os Cerrados periféricos foram originados a partir do Cerrado central por eventos de expansão e retração durante o Pleistoceno e que, portanto, contêm parte da diversidade presente no Cerrado central. Os resultados obtidos, entretanto, não

corroboraram essa hipótese, sendo utilizados para sugerir novas estratégias de conservação para esse domínio altamente ameaçado.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies analisadas e locais de coleta

As espécies escolhidas para o presente estudo foram selecionadas por serem amplamente distribuídas no Cerrado de acordo com Ratter et al. (2003). A espécie *A. edulis*, comumente conhecida como goiaba preta ou marmelinho do Cerrado, é uma espécie arbórea que ocorre nas savanas brasileiras, podendo atingir até oito metros de altura, com folhas verde-escuras simples, opostas, cruzadas, com ápices agudos a acuminados, margens inteiras, nervuras secundárias impressas na face superior e salientes na inferior, com pecíolos de até 1,5 cm de comprimento e flores brancas dióicas (Persson, 2000; Silva et al., 2008; Silva Júnior e Pereira, 2009). Na filogenia do gênero *Alibertia*, *A. edulis* pertence ao clado de mesmo nome, o qual tem centro de diversidade no oeste amazônico (Persson, 2000). Ainda de acordo com Persson (2000), *A. edulis* é uma espécie amplamente distribuída também encontrada em savanas. No Brasil Central, a espécie ocorre nas margens das matas de galeria, matas estacionais e cerradões, enquanto nos campos arbustivo-arbóreos da Ilha de Marajó ela ocorre de forma isolada ou formando aglomerados, em áreas que em geral ficam afastadas das zonas de inundação anual (Amaral et al., 2007; Silva Júnior e Pereira, 2009). Ainda não há informações sobre sua polinização, mas a dispersão de seus frutos é feita por animais (Silva Júnior e Pereira, 2009). A reprodução sexuada é a única forma de propagação conhecida para a espécie, e a viabilidade das sementes diminui com o tempo, pela dessecação (Silva et al., 2008). A espécie é potencialmente útil em sistemas agroflorestais, pois pode ser utilizada como frutífera, madeireira, medicinal, além de poder ser utilizada no reflorestamento da mata ciliar (Pott e Pott, 2003).

A espécie *Q. grandiflora*, conhecida popularmente como pau-terra, é uma das principais representantes da família Vochysiaceae no Cerrado, a qual tem grande importância na caracterização fisionômica do domínio (Barbosa, 1999). *Qualea grandiflora* tem hábito arbustivo-arbóreo, chegando até 30 m de altura, com casca espessa e folhas opostas cruzadas, coriáceas (Paulilo, 1991; Hiruma-Lima et al., 2006). Possui nectários extraflorais dispostos junto ao pecíolo, flores com uma única pétala de cor amarela, frutos deiscentes, secos, com três valvas lenhosas, de sementes aladas (Gaspi et al., 2006; Rede de Sementes do Cerrado, 2013). Parte dessas sementes (cerca

de 80% da produção) se trata de sementes escuras, inviáveis, e mesmo as demais, claras, possuem baixa taxa de germinação, a qual é aumentada quando o tegumento é retirado (Paulilo, 1991). São plantas decíduas, cuja brotação ocorre no início da estação chuvosa, e são polinizadas por mariposas e dispersas anemocoricamente (Ferreira et al., 2001; Lenza e Klink, 2006; Rede de Sementes do Cerrado, 2013). A baixa restrição da espécie em relação aos níveis de recursos e condições (nutrientes no solo e luminosidade) permitiriam a grande amplitude geográfica de sua distribuição, pois *Q. grandiflora* é a lenhosa de maior distribuição no Cerrado (Ratter et al., 2003; Costa e Santos, 2011).

Foram coletadas folhas de ao menos quinze indivíduos pertencentes a oito populações de *Q. grandiflora* e oito de *A. edulis*, além de um indivíduo do Parque Nacional das Emas (GO1) para essa última espécie (Tabela 1). As populações foram localizadas ao longo da extensão do Cerrado, abrangendo tanto localidades consideradas "Cerrado central" como localidades consideradas "Cerrado marginal" (Fig. 1). As distâncias lineares entre os pontos de coleta foram de cerca de 134 km (entre as duas populações do Piauí) a cerca de 2.400 km (entre a população de São Paulo e a população do Pará). Dentre as populações amostradas para cada espécie, quatro se encontram em unidades de conservação (Parque Nacional de Brasília - DF, Parque Nacional das Emas - GO1, Floresta Nacional de Paraopeba - MG, Parque Estadual de Porto Ferreira - SP), além de uma (Parque Nacional da Chapada dos Guimarães - MT), para a qual apenas *A. edulis* foi coletada. O material foi preservado em sílica (Chase e Hills, 1991) até a extração de DNA.

Amplificação do DNA e sequenciamento

O DNA da espécie *A. edulis* foi extraído seguindo o protocolo de Ferreira e Gratapaglia (1996), enquanto para a extração do DNA da espécie *Q. grandiflora* foi utilizado o kit comercial DNA *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. Após a extração, o DNA foi mantido a -20 °C até o uso. Uma seleção foi realizada em uma subamostra de três indivíduos por população por espécie a fim de identificar as regiões de DNA plastidial e nuclear que apresentassem melhor amplificação e maior nível de polimorfismo, utilizando os locos *matK* e *psbA-trnH* (Sang et al., 1997), *trnL-trnF* (Taberlet et al, 1991), *petA-psbJ* (Shaw et al., 2007), *ndhF* (Olmstead e Sweere, 1994), *trnS-trnG* (Hamilton, 1999) e ITS (White et al., 1990). Para ambas as espécies, as regiões que apresentaram melhor amplificação e maior nível de polimorfismo nos indivíduos analisados foram *matK*, *ndhF* e *psbA-trnH* e, por esse motivo, foram escolhidas para análise nos demais indivíduos.

Tabela 1. Localização geográfica das áreas de estudo amostradas em regiões de Cerrados central e marginal

Código	Localidade	Estado	Latitude	Longitude	Tipo de Cerrado
DF	Parque Nacional de Brasília	Distrito Federal	-15.68	-48.02	Central
GO1	Parque Nacional das Emas	Goiás	-17.92	-53.00	Central
GO2*	Montividiu	Goiás	-17.40	-51.23	Central
GO3**	São Miguel do Passa Quatro	Goiás	-15.03	-47,28	Central
MG	Floresta Nacional de Paraopeba	Minas Gerais	-19.26	-44.40	Central
MT**	Chapada dos Guimarães	Mato Grosso	-15.46	-55.75	Central
PA	Santarém - Alter do Chão	Pará	-2.53	-54.90	Marginal
PI1	Campo Maior	Piauí	-7.03	-43.39	Marginal
PI2	Uruçuí	Piauí	-7.56	-44.44	Central
SP	Parque Estadual Porto Ferreira	São Paulo	-21.84	-47.42	Marginal

* apenas amostras de *Qualea grandiflora*; ** apenas amostras de *Alibertia edulis*

As reações de PCR foram realizadas para o volume final de 50 μ L e amplificadas em termocicladores Eppendorf Mastercycler e Applied Biosystems Veriti. A reação continha DNA genômico, 1 \times Tampão de PCR (Invitrogen), 10 μ g de BSA, 3,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 0,5 mM de cada *primer* e 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). Depois de uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, foram realizados 30 ciclos compostos de 1 min a 95 °C, 1 min a 50° C (*ndhF* e *psbA-trnH*) ou 52 °C (*matK*), 1 min a 72 °C, seguidos por uma extensão final a 72 °C por 10 min.

Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1% em 1 \times TAE corados com brometo de etídeo e aqueles cuja banda era suficientemente forte tiveram o restante de suas reações purificadas com o kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). As amostras purificadas foram novamente avaliadas em gel de agarose 1% em 1 \times TAE corados com brometo de etídeo, quantificadas e enviadas para sequenciamento em um ABI 3500 GeneticAnalyser (Life) do Laboratório Central - CCB da UFPE ou na Macrogen.

Análise dos dados

As sequências foram alinhadas com o programa Geneious 7.0.4 e os alinhamentos foram checados e corrigidos manualmente. Todos os polimorfismos detectados foram checados nos eletroferogramas, e em caso de dúvidas persistentes, novas PCRs

independentes foram realizadas. As diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π) foram estimadas com o programa Arlequin 3.5.1 (Excoffier et al., 2005). A riqueza alélica (Hr) foi calculada usando o método da rarefação, padronizando para o menor tamanho amostral, implementado em CONTRIB 1.02 (Petit et al., 1998). Tipicamente, a rarefação é utilizada para padronizar a riqueza alélica pelo menor n em uma comparação (Petit et al., 1998), entretanto em alguns casos em que uma das amostras tem um n muito baixo é possível excluí-la dessa análise e escolher um outro valor de rarefação (Ramos et al., 2009). No presente estudo, a população de GO do Parque Nacional das Emas da espécie *A. edulis* possuía apenas um indivíduo e, por esse motivo, foi excluída da análise de rarefação, sendo escolhidos os valores da população com o menor número de indivíduos para cada região analisada.

O software Permut 2.0 foi utilizado para calcular os valores dos índices de diferenciação G_{ST} e N_{ST} . De acordo com Pons e Petit (1996), a existência de estrutura filogeográfica entre haplótipos é sugerida quando os valores de N_{ST} são significativamente maiores que os de G_{ST} . O software MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) foi utilizado para inferir a história evolutiva através do método Neighbor-Joining (NJ) com 1.000 réplicas de *bootstrap*. O software Network 4.6.1.2 foi utilizado para desenhar as redes de haplótipos, e o software Microsoft PowerPoint foi utilizado para editar as imagens. As comparações de F_{ST} par-a-par entre populações e a diferenciação genética entre populações e grupos foi analisada utilizando a Análise da Variância Molecular (AMOVA) implementado no Arlequin 3.5.1 (Excoffier et al., 2005).

RESULTADOS

Um total de 1.219 pb e 1.660 pb para as três regiões concatenadas foi sequenciado para *A. edulis* (*matK* - 612 pb, *ndhF* - 478 pb, *psbA-trnH* - 129 pb) e *Q. grandiflora* (*matK* - 665 pb, *ndhF* - 615 pb, *psbA-trnH* - 308 pb), respectivamente. Os índices de diversidade molecular estão indicados na Tabela 2. O número de sítios variáveis em *A. edulis* foi 16, e em *Q. grandiflora* 13. Essas sequências de cpDNA representaram para *A. edulis* um total de dez haplótipos, enquanto para *Q. grandiflora* doze haplótipos foram observados (Tabela 2). Foi observado um número maior de transversões do que de transições, o que já é esperado, dado o alto conteúdo de AT nas regiões de cpDNA e, conseqüentemente, sua tendência às transversões associadas aos nucleotídeos flanqueados por A ou T (Kelchner, 2000; Ribeiro et al, 2011).

A diversidade haplotípica (h) para cada população variou de 0 a 0,8, a diversidade nucleotídica de 0 a 0,00402 e índices de riqueza alélica após a rarefação variaram de 0 a 2,42 (Tabela S1). As populações PA, GO1 e PI2 de *Q. grandiflora* e DF, GO1, GO3 e MT de *A. edulis* foram monomórficas para todos os *loci* analisados, e o número máximo de haplótipos encontrados por população foi seis (Tabela 2). As análises de AMOVA mostraram que para ambas as espécies a maior parte da variação foi encontrada entre e não dentro das populações (90,95% para *A. edulis* e 87,99% para *Q. grandiflora*; Tabela 3).

Tabela 2. Amostragem populacional, com número de haplótipos e número de locos polimórficos para *A. edulis* e *Q. grandiflora*

Espécie	População	Nº indivíduos analisados	Nº haplótipos	Nº <i>loci</i> polimórficos	Nº de <i>loci</i> com menos de 5% de dados faltando
<i>Alibertia edulis</i>	DF	7	1	0	1218
	GO1	1	1	0	1217
	GO3	10	1	0	1219
	MG	8	2	3	1219
	MT	19	1	0	1219
	PA	12	5	2	1219
	PI1	7	3	3	1218
	PI2	11	3	3	1219
	SP	11	6	5	1218
Total	86	10	16	1219	
<i>Qualea grandiflora</i>	DF	8	3	2	1636
	GO1	5	1	0	1636
	GO2	9	2	4	1636
	MG	10	2	3	1636
	PA	18	1	0	1635
	PI1	6	2	3	1636
	PI2	12	1	0	1636
	SP	8	3	2	1660
Total	76	12	13	1660	

DF - Distrito Federal; GO - Goiás; MG - Minas Gerais; MT - Mato Grosso; PA - Pará; PI - Piauí; SP - São Paulo.

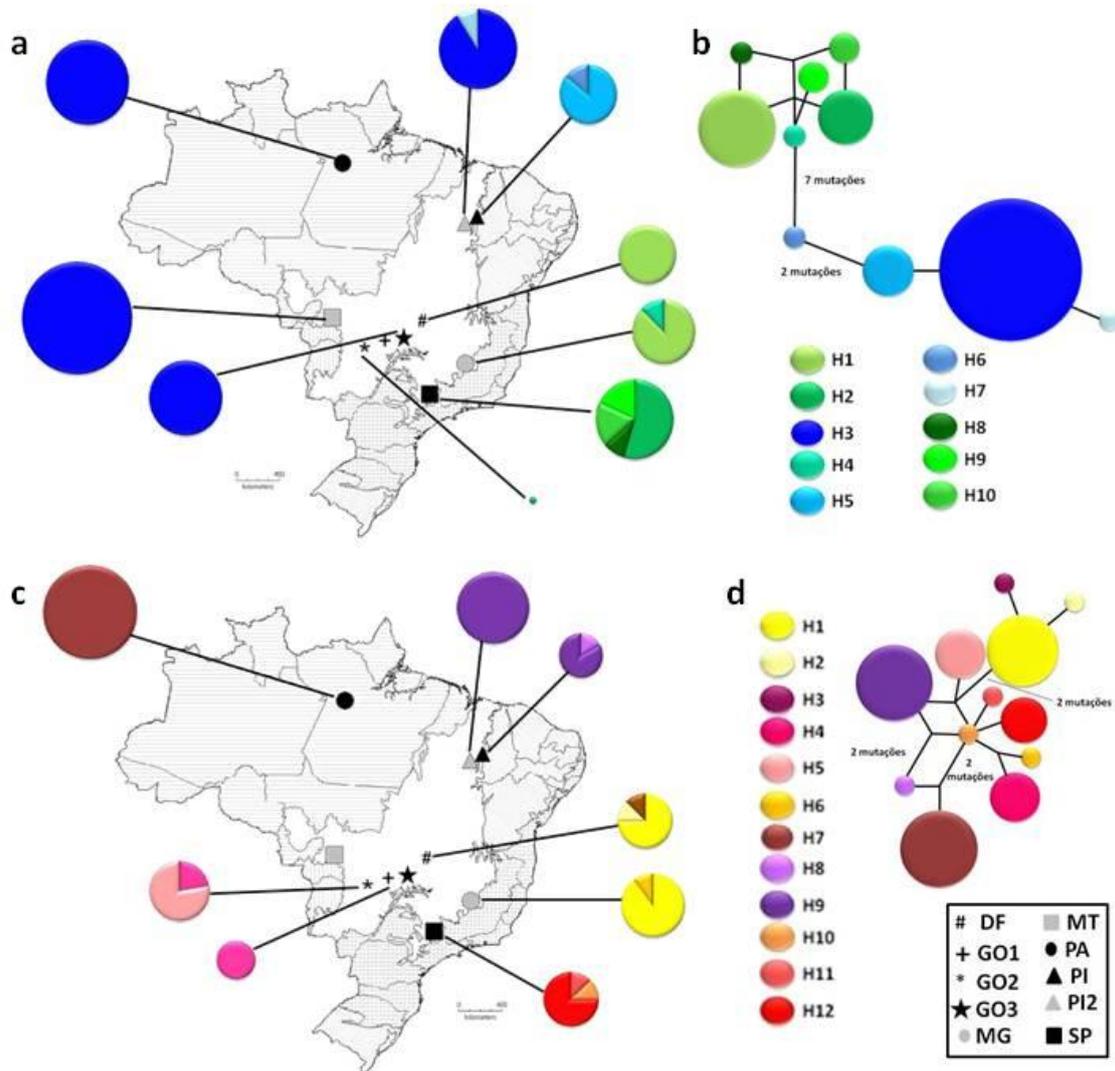


Figura 1. Distribuição dos haplótipos e redes de haplótipos encontrados para *A. edulis* (a e b) e *Q. grandiflora* (c e d). (a e c) Mapa das localidades de coleta, destacando a área de Cerrado em branco de acordo com o IBGE, com a distribuição dos haplótipos de acordo com o tamanho amostral para a análise concatenada dos locos *matK*, *ndhF* e *psbA-trnH* em *Alibertia edulis* (a) e *Q. grandiflora* (c). (b e d) Redes de haplótipos geradas para os dados concatenados das sequências *matK*, *ndhF* e *psbA-trnH* para as espécies *Alibertia edulis* (b) e *Qualea grandiflora* (d). O comprimento das linhas nas redes de haplótipos são proporcionais ao número de passos mutacionais, e para aquelas onde houve mais de um passo mutacional o número de passos está indicado. As siglas indicadas na legenda identificam os nomes das populações amostradas, de acordo com a Tab. 1; PA, PI1 e SP - populações do Cerrado marginais; demais populações - Cerrado Central

As populações de *A. edulis* sempre se mostraram separadas em dois grupos, tanto na rede de haplótipos (Fig. 1b) quanto na análise de NJ, com valores de *bootstrap* significativos para essa estruturação (Fig. 2a). Uma análise de AMOVA adicional foi realizada para essa espécie, com a divisão em dois grupos como identificados pelo NJ. Essa análise revelou que a maior parte da variação (84,31%) foi encontrada entre as populações, seguida pela variação entre populações dentro dos grupos (10,46%) e por fim da variação dentro das populações (5,22%) (resultados não mostrados). Já para *Q. grandiflora*, uma subestruturação maior foi observada, com várias populações possuindo haplótipos exclusivos e pouco compartilhamento entre populações (Fig. 1c e d). Essa estruturação filogeográfica foi suportada pelos valores de N_{ST} maiores que os valores de G_{ST} observados para essa espécie, embora a análise de NJ tenha revelado baixo suporte para relações entre os grupos (Fig. 2b). A análise do F_{ST} par-a-par reforçou essa diferenciação, sendo que a maioria dos pares apresentou valores de diferenciação altos e significativos, com raras exceções (Tabelas 4 e 5).

Tabela 3. Distribuição da variabilidade genética por análise da variância molecular (AMOVA) em populações de *A. edulis* e *Q. grandiflora*

Espécie	<i>Alibertia edulis</i>				<i>Qualea grandiflora</i>			
	GL	SQ	CV	PV	GL	SQ	CV	PV
Fonte da variação								
Entre populações	8	216,84	2,89	90,95	7	259,70	3,94	87,99
Dentro das populações	77	22,13	0,29	9,05	68	36,55	0,54	12,01
Total	85	238,96	3,18	100	75	296,25	4,48	100
<i>Fst</i>	0,90953				0,87994			
P	0,0000+-0,0000				0,0000+-0,0000			

GL - graus de liberdade; SQ - soma dos quadrados; CV - componentes da variação; PV - porcentagem da variação.

Para as amostras de *A. edulis*, a distribuição dos haplótipos sugere um claro padrão filogeográfico, separando as amostras pertencentes as populações DF, GO1, MG E SP daquelas pertencentes a GO3, MT, PA E PI1 e PI2 (Fig. 1a). Esse padrão também foi observado para os locos quando analisados individualmente (Fig. S1). Para *Q. grandiflora*, os locos *ndhF* e *psbA-trnH* mostram indícios de um padrão similar, mas não com tanta clareza (Fig. S2). A população de São Paulo (SP) apresenta um certo isolamento, pois foram encontrados em alta porcentagem indivíduos com alelos raros ou

exclusivos, e para um deles (na região *psbA-trnH*), uma duplicação de 24 pb separa sete indivíduos de São Paulo de todos os outros indivíduos analisados. De fato, apesar da ampla distribuição, *Q. grandiflora* aparentou certo isolamento das populações, onde haplótipos exclusivos também foram encontrados para DF, GO1, MG, PA e PI1 (Fig. 1c).

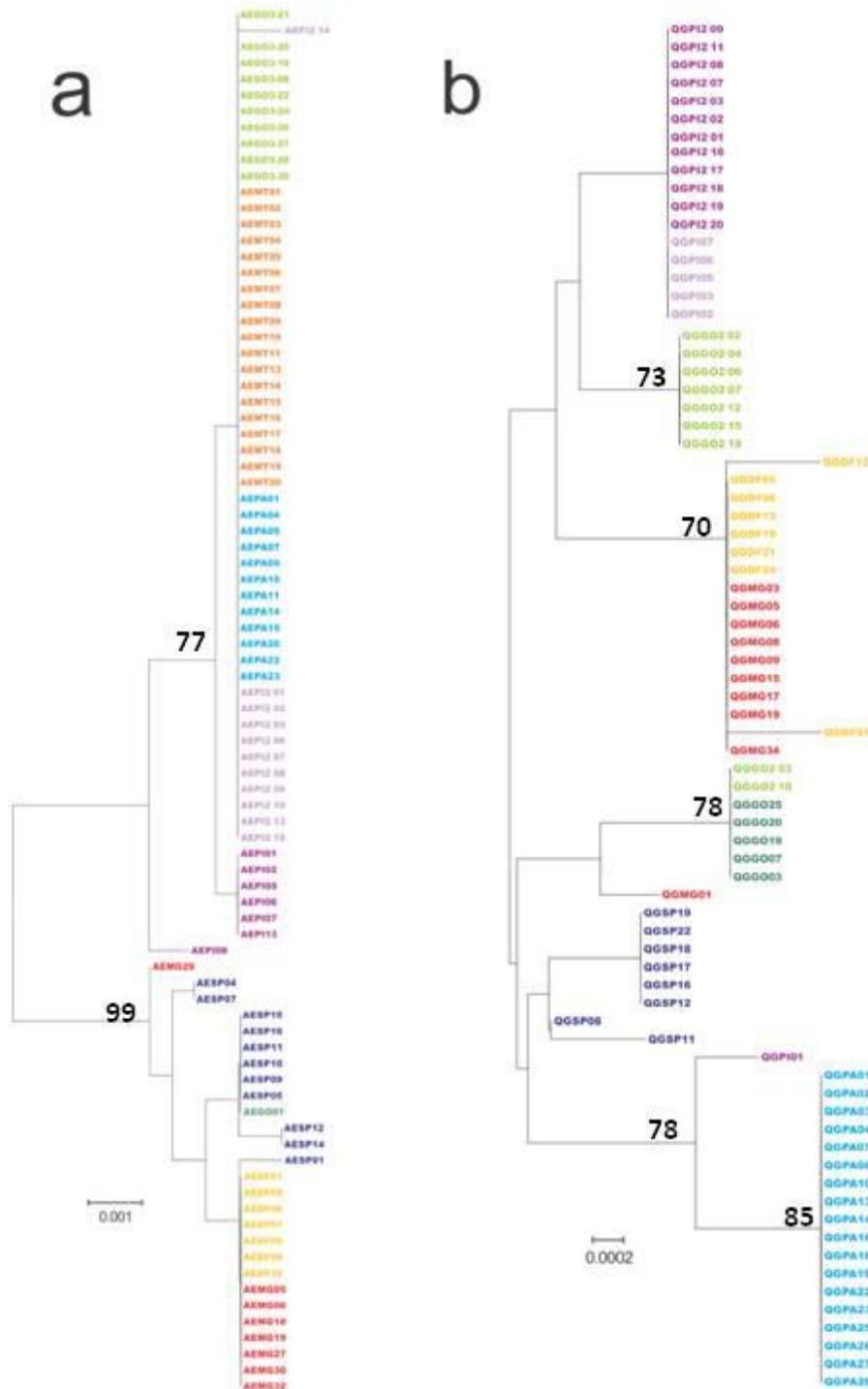


Figura 2. Análise de NJ das sequências concatenadas de *A. edulis* (a) e *Q. grandiflora* (b). Apenas os valores de bootstrap acima de 70 são indicados.

Tabela 4. Valores de F_{ST} par-a-par para as populações de *A. edulis*. Valores em negrito indicam populações com $p < 0,05$. Códigos das populações de acordo com a Tabela 1

População	DF	GO1	GO3	MG	MT	PA	PI1	PI2	SP
DF									
GO1	1,000								
GO3	1,000	1,000							
MG	0,648	0,806	0,970						
MT	1,000	1,000	1,000	0,978					
PA	0,971	0,958	0,809	0,941	0,479				
PI1	0,961	0,926	0,898	0,930	0,905	0,720			
PI2	0,956	0,935	0,649	0,924	0,198	0,216	0,695		
SP	0,578	-0,400	0,915	0,599	0,936	0,893	0,861	0,881	

Tabela 5. Valores de F_{ST} par-a-par para as populações de *Q. grandiflora*. Valores em negrito indicam populações com $p < 0,05$. Códigos das populações de acordo com a Tabela 1

População	DF	GO1	GO2	MG	PA	PI1	PI2	SP
DF								
GO1	0,940							
GO2	0,714	0,685						
MG	-0,002	0,913	0,694					
PA	0,980	1,000	0,914	0,970				
PI1	0,810	0,868	0,540	0,789	0,957			
PI2	0,939	1,000	0,721	0,912	1,000	0,124		
SP	0,856	0,827	0,834	0,867	0,921	0,823	0,884	

DISCUSSÃO

Diversidade genética de *A. edulis* e *Q. grandiflora*

De maneira geral, as populações apresentaram pouco polimorfismo intrapopulacional e uma alta diferenciação entre as populações, reveladas pela AMOVA e pelos valores de F_{ST} encontrados. Os valores de diversidade nucleotídica foram, em geral, muito baixos, e os valores de diversidade haplotípica (que, excetuando-se os zero, variaram de 0,25 a

0,80 para *A. edulis* e 0,20 a 0,46 para *Q. grandiflora*, Tabela S1) também ficaram, em geral, abaixo daqueles encontrados para outras espécies de Cerrado, como *Tibouchina papyrus* ($h = 0,771$ para o loco *psbA-trnH* e $h = 0,775$ para o loco *trnS-trnG*; Collevatti et al., 2012) *Plathymenia reticulata* ($h = 0,88$; Novaes et al., 2010) e *Hymenaea stignocarpa* ($h = 0,804$; Ramos et al., 2007). Já os valores de F_{ST} encontrados para ambas as espécies (0,91 *A. edulis* e 0,89 para *Q. grandiflora*, Tabela 3) foram altos e, em geral, acima do normalmente encontrado para populações de uma mesma espécie. De fato, estudos prévios no Cerrado sugerem valores de F_{ST} mais baixos, variando entre 0,604 e 0,692 (Ramos et al., 2007; Ramos et al., 2009; Ribeiro et al., 2011; Collevatti et al., 2012), sugerindo uma forte diferenciação entre as populações.

Relações filogeográficas entre as populações analisadas

No presente trabalho e com base nas regiões analisadas não foi observado um padrão de estrela claro para as redes geradas, e os haplótipos marginais não aparecem como derivados dos centrais. Isso leva a supor que não existe suporte para a teoria de que essas populações tenham se expandido recentemente, como proposto para *Plathymenia reticulata* (Novaes et al., 2010). Esta espécie, que ocorre tanto em áreas de Cerrado quanto em Mata Atlântica, foi amostrada neste trabalho para 41 populações ao longo de sua distribuição, e ao final os autores detectaram que a região central da sua amostragem (Minas Gerais e Goiás) apresentou os maiores níveis de diversidade genética, com vários endemismos. Os haplótipos encontrados nas demais regiões amostradas ou eram comuns a essa região central ou eram derivados dos encontrados nela, enquanto a população do sudeste (SP) apresentou uma diversidade abaixo da encontrada para MG e GO.

Para *A. edulis*, o fato de que os haplótipos presentes nas populações mais periféricas (MT, PA e as duas do PI) são bastante diferenciados dos haplótipos das populações centrais, aliado ao fato de serem haplótipos com alta frequência, sugerem que essas populações podem ser mais antigas e não resultado de expansão ou dispersão recentes. Adicionalmente, considerando a origem Amazônica para o grupo *Alibertia edulis* (Persson, 2000), é possível que a espécie tenha se originado na região Norte e se dispersado para as demais populações do Cerrado posteriormente. Ainda, a presença de um haplótipo compartilhado entre as populações MT, PA e PI2 e a população GO3 sugere que o fluxo gênico, apesar de limitado, tenha sido mantido por longos períodos entre essas populações.

Para a espécie *Q. grandiflora*, diversas populações apresentaram haplótipos exclusivos, tanto no Cerrado central quanto no Cerrado marginal. Dessa forma, assim como para *A. edulis*, é possível que Cerrados centrais não sejam significativamente mais antigos que os marginais e, por isso, não tenham acumulado mais alterações que os últimos. Vale a pena ressaltar o fato de que muitas populações dessa espécie apresentaram apenas um haplótipo por população, sugerindo dispersão limitada e fluxo gênico reduzido entre as populações, compatível com sua dispersão anemocórica (Rede de Sementes do Cerrado, 2013).

Estudos filogeográficos recentes com diversos taxa descreveram o Cerrado do Sudeste como recentemente colonizado a partir dos Cerrados centrais (Collevatti et al., 2003; Ramos et al., 2007; Novaes et al., 2010; Prado et al., 2012). A espécie *A. edulis* corroborou essa hipótese, com haplótipos mais derivados encontrados na população SP. Para *Q. grandiflora*, tal padrão não pôde ser observado de forma tão clara. Apesar de possuir dois haplótipos mais derivados, a espécie possui também um haplótipo central, a partir do qual derivam seis outros haplótipos. Ramos et al. (2007) afirmam que, para *Hymenaea stagnocarpa* Hayne, populações mais ao leste de sua distribuição (em Minas Gerais) estariam sob condições mais amenas durante as oscilações do Pleistoceno, devido às influências do Oceano Atlântico. De forma semelhante, é possível que a população de *Q. grandiflora* de São Paulo, a qual se encontra mais ao leste que as do DF e GO, tenha sobrevivido sob condições mais amenas durante o Pleistoceno e, posteriormente, dado origem através de um contato secundário aos haplótipos que dela derivaram. Alternativamente, é possível que a espécie *Q. grandiflora* tenha surgido mais ao sudeste, onde apresenta a maior diversificação genética, de onde teria se dispersado para o norte e oeste, atingindo sua distribuição atual. Outras análises serão necessárias para esclarecer essa relação.

A ocorrência de diversos haplótipos exclusivos para a população de SP de *Q. grandiflora* está em concordância com a subdivisão de Ratter et al. (2003), que separou os Cerrados do Sudeste como um conjunto florístico a parte. Ainda, a conexão entre a população do PA e as populações dos Cerrados do Nordeste também sugerida por Ratter et al. (2003) foi corroborada pela ligação observada entre os haplótipos encontrados nessas populações para *A. edulis*.

Gradiente leste-oeste na diversidade

Diversos trabalhos reportaram uma barreira leste-oeste no Cerrado (Ramos et al., 2007; Collevatti et al., 2009; Pennington et al., 2009). No presente trabalho também detectamos uma barreira leste-oeste, contudo mais a oeste do que a barreira previamente detectada, sugerindo um gradiente leste-oeste, que separou as populações de *A. edulis* do noroeste das populações mais ao sudeste. Essa diferenciação foi suportada pela AMOVA e pela análise de NJ. Para *Q. grandiflora* uma certa diferenciação também pode ser observada, mas de forma mais clara apenas pela análise separada dos locos: pela presença dos haplótipos compartilhados entre as populações de DF, GO1, MG e SP para a região *psbA-trnH* e pelos haplótipos compartilhados entre as populações GO2, PA, PI1 e PI2 para a região *ndhF*, a qual pode estar relacionada ao gradiente leste-oeste descrito acima para *A. edulis*.

Gradientes podem surgir através de oscilações climáticas quando, ao invés de expandir e retrair novamente à sua distribuição original após uma oscilação climática, a espécie aumenta gradualmente a sua distribuição, causando um aumento *stepwise*: aumentando rapidamente o tamanho populacional durante períodos favoráveis, e permanecendo estático durante períodos não favoráveis (Bennett e Provan, 2008).

A diferenciação entre a população da Chapada dos Guimarães (MT) e populações do Cerrado localizadas na região mais ao centro e sudeste do Brasil já foi reportada para outros organismos, como para o sapo *Hypsiboas albopunctatus* (Prado et al., 2012). De acordo com estes autores, esta divergência foi originada durante o final do Mioceno, em concordância com o soerguimento do plateau do Brasil Central. Ainda, para esta espécie também as populações do sudeste se mostraram diferenciadas das populações centrais, com a diferenciação datando da metade do Pleistoceno. A conexão entre as populações MT, PA, PI e PI2 para *A. edulis* pode ser explicada por uma ligação das terras baixas por uma faixa a oeste do Cerrado, que teria permanecido úmida e conectada mesmo em períodos mais secos, como o ocorrido durante o último máximo glacial. Isso porque as florestas de galeria sofreram uma retração durante os períodos mais frios e secos do Pleistoceno, com ampla substituição da vegetação do Cerrado no sul e sudeste pelos pampas e até mesmo por florestas de araucária, levando a uma redução nas diversidades haplotípica e nucleotídica de algumas populações (Ramos et al., 2007). Espécies encontradas em matas de galeria, como *Hymenaea courbaril*, teriam persistido principalmente em áreas localizadas mais ao norte de Minas Gerais e em locais de baixa elevação (Ramos et al., 2009).

Acredita-se que essas matas de galeria tenham mantido a conectividade entre o Plateau Central do Brasil e as florestas adjacentes mesmo durante os períodos climáticos menos favoráveis, provendo refúgio para uma biota florestal estável (Brown e Gifford, 2002). Por ser encontrada preferencialmente em áreas próximas a rios (Silva Júnior e Pereira, 2009), é possível que *A. edulis* tenha apresentado um comportamento semelhante a *H. courbaril* e a *Platymenia reticulata*, a qual também apresentou uma mudança de distribuição para altitudes mais baixas devido à diminuição da temperatura durante o Pleistoceno (Novaes et al., 2010). Ainda de acordo com esses autores, a altitude e a vegetação árida teriam atuado como barreiras ao fluxo de sementes de *P. reticulata*, condição similar ao que poderia ter ocorrido a *A. edulis*. Uma explicação alternativa para a conexão encontrada entre as populações de PA e PI seria a sugerida por Werneck et al. (2012). Nesse trabalho, os autores sugerem um corredor ao longo da costa do Atlântico que ligou as savanas Amazônicas ao Cerrado da região central do Brasil, especialmente durante o último período interglacial (LIG).

Uma hipótese para explicar o gradiente leste-oeste observado no presente trabalho, é que o mesmo poderia ter se originado pela vicariância do Cerrado causada pela incursão das florestas sazonais tropicais secas (SDTF, do inglês *Seasonally Dry Tropical Forests*) durante os períodos mais secos do Pleistoceno. De acordo com Pennington et al. (2000), em épocas de menor precipitação, como as ocorridas durante o Quaternário, os minerais que estão em camadas mais profundas do solo podem ser levados à superfície por capilaridade, deixando os solos com o pH mais alto e com maior concentração de cálcio. Essas condições favoreceriam a expansão da área de ocorrência de espécies que sob outras condições não ocorreriam na área do Cerrado, como as espécies nativas das florestas sazonais tropicais secas, como a Caatinga (hipótese do Arco Pleistocênico). Durante os períodos interglaciais, o aumento na precipitação levaria a uma maior lixiviação e a uma acidificação, permitindo o retorno do Cerrado para essas regiões e o isolamento da vegetação SDTF em manchas de habitat adequado.

Essa hipótese é suportada por vários dados, como o padrão de distribuição atual de Cactaceae terrestres em áreas de SDTF dentro do domínio Cerrado (Penninton et al., 2000), a distribuição de mariposas ao longo da Caatinga e do Cerrado (Amorim et al., 2009) e a presença de lagartos endêmicos ao Arco Pleistocênico conectando a Caatinga e os enclaves de SDTF do Cerrado (Werneck e Colli, 2006). Além disso, estudos filogeográficos recentes em diferentes grupos vêm corroborando a teoria de uma

distribuição mais ampla das SDTF, como é o caso da espécie arbórea *Astronium urundeuva* (Caetano et al., 2008) e da mosca-de-frutas *Drosophila gouveai* (Moraes et al., 2009).

Implicações para a conservação

Os critérios para a seleção de populações prioritárias para conservação devem incluir tanto a singularidade da população como o seu nível de diversidade, especialmente em termos de sua composição alélica (Petit et al., 1998; Diniz-Filho et al., 2012). As populações de *Q. grandiflora* apresentaram baixo nível de polimorfismo intrapopulacional. Essa baixa variabilidade, associada a uma aparente redução no recrutamento que já vem sendo observada em uma área de cerradão (Silva e Soares, 1999), chama a atenção para o fato de que, apesar de bem distribuída, esta espécie também pode se encontrar ameaçada. De fato, estudos de previsão de alterações da distribuição geográfica de outras espécies amplamente distribuídas no Cerrado, como *Dipteryx alata* (Diniz-Filho et al., 2012) e *Caryocar brasiliense* (Collevatti et al., 2011), têm demonstrado não apenas a redução de sua distribuição, como também a perda de parte de sua diversidade genética, o que pode ser agravado quando a espécie em estudo já possui baixa variabilidade genética *a priori*, levando em última instância a extinções locais.

No presente trabalho foi possível observar um padrão que se repetiu para ambas as espécies: as populações do PA e do PI apresentaram haplótipos exclusivos ou raros em dois dos três marcadores analisados para ambas as espécies. Uma atenção especial deve ser dada aos fragmentos no Nordeste do Brasil, pois além de se encontrarem em uma das fronteiras agrícolas do país, com elevados índices de degradação (Rocha et al., 2012), é esperado que ocorra uma diminuição no volume da precipitação nessa área devido ao aquecimento global (Bates et al., 2008). Isso levaria a consequências similares às do período glacial, em que espécies sensíveis à dessecação, como *A. edulis*, podem sofrer uma redução em sua distribuição que, aliada às pressões antrópicas, levaria a uma perda significativa de sua diversidade. Muito embora dados sobre a degradação dos Cerrados amazônicos sejam escassos, também a sua diversidade está ameaçada pela agropecuária (Dantas, observações pessoais).

Levando isso em consideração, e os dados acima descritos, concluímos que, apesar de não suportar a divisão Cerrado central x marginais, as populações das duas espécies localizadas nos Cerrados "marginais" não se tratam apenas de expansões

recentes do Cerrado "central", devendo a hipótese de que sua diversidade estaria contida dentro da diversidade observada no Cerrado "central" ser considerada com cautela. Dessa forma, essas populações também devem receber uma atenção especial em esforços conservacionistas, a fim de preservar toda a diversidade do domínio. Pela presença de haplótipos exclusivos nessa região, é imprescindível que novas medidas conservacionistas, que foquem a implementação de novas unidades de conservação nos Cerrados do Piauí amostrados, sejam tomadas. Por também possuir haplótipos exclusivos e, principalmente, pela inexistência de qualquer unidade de conservação federal que abranja manchas de Cerrado marginal ocorrentes nessa área, se tornam urgente estudos de viabilidade para implementação de áreas de proteção dessas manchas na região Norte do Brasil.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a João Batista de Oliveira Júnior, Gustavo Maruyama Mori, Mariana Telles, Ana Paula Moraes e Felipe Amorim, e aos gestores das Unidades de Conservação, pelo apoio nas coletas, e a Markus Rusham e Linda Neaves pelo apoio nas análises estatísticas. Ao CETENE pela disponibilidade de acesso à infraestrutura. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), a Fundação Grupo Boticário de Proteção à Natureza pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Amaral DD, Vieira ICG, Salomão RP, Almeida SS, Silva JBF, Neto SVC, Santos JUM, Carreira LMM, Bastos MNC (2007) *Campos e florestas das bacias dos rios Atuí e Anajás, Ilha do Marajó, Pará*. Pará, Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi.
- Amorim FW, Ávila Jr RS, Camargo AJA, Vieira AL, Oliveira PE (2009) A hawkmoth crossroads? Species richness, seasonality and biogeographical affinities of Sphingidae in a Brazilian Cerrado. *Journal of Biogeography* **36**: 662-674.
- Barbosa AR (1999) *As espécies do gênero Vochysia Aubl. (Vochysiaceae) ocorrentes no estado de São Paulo*. Tese de mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas.

- Bates BC, Kundzewicz ZW, Wu S, Palutikof JP (2008) *IPCC Technical Paper VI—Climate Change and Water*, IPCC Secretariat, Geneva.
- Beheregaray LB (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* **17**: 3754-3774.
- Bennett KD, Provan J (2008) What do we mean by "refugia"? *Quaternary Science Reviews* **27**: 2449-2455.
- Braga AC, Reis AMM, Leoi LT, Pereira RW, Collevatti RG (2007) Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). *Molecular Ecology Notes* **7**: 53-56.
- Caetano S, Prado D, Pennington RT, Beck S, Oliveira-Filho A, Spichiger R, Naciri Y (2008) The history of Seasonally Dry Tropical Forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). *Molecular Ecology* **17**: 3147-3159.
- Chase MW, Hills HH (1991) Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* **40**: 215-220.
- Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD (2003) Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. *Molecular Ecology* **12**: 105-115.
- Collevatti RG, Rabelo SG, Vieira RF (2009) Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. *Annals of Botany* **104**: 655-664.
- Collevatti RG, Nabout JC, Diniz-Filho JAF (2011) Range shift and loss of genetic diversity under climate change in *Caryocar brasiliense*, a Neotropical tree species. *Tree Genetics and Genomes* **7**: 1237-1247.
- Collevatti RG, Castro TG, Lima JS, Telles MPC (2012) Phylogeography of *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae), and endangered tree species from rocky savannas, suggests bidirectional expansion due to climate cooling in the Pleistocene. *Ecology and Evolution* **2**: 1024-1035.
- Costa RC, Santos FAM (2011) Padrões espaciais de *Qualea grandiflora* Mart. em fragmentos de cerrado no estado de São Paulo. *Acta Botanica Brasilica* **25**: 215-222.
- Costa IR, Araújo FS, Lima-Verde LW (2004) Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **18**: 759-770.

- Coutinho LP (2000) O bioma do cerrado. In: Klein, AL (org). *Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois*. Editora UNESP, São Paulo, Brasil. 156p.
- da Silva JMC, Bates JM (2002) Biogeographic patterns and conservation in the South American cerrado: a tropical savanna hotspot. *BioScience* **52**: 225-234.
- Diniz-Filho JAF., Collevatti RG, Chaves LJ, Soares TN, Nabout JC, Rangel TF, Melo DB, Lima JS, Telles MPC (2012) Geographic shifts in climatically suitable areas and loss of genetic variability in *Dipteryx alata* ("Baru" tree; Fabaceae). *Genetics and Molecular Research* **11**: 1618-1626.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin v. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47-50.
- Felfili JM, Silva Júnior MC (2005) Diversidade alfa e beta no cerrado *sensu stricto*, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais e Bahia. In: Scariot A, Sousa-Silva JC, Felfili JM (orgs) *Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação*. Brasília. Ministério do Meio Ambiente. 439p.
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1996) *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética*. 2ª. ed. EMBRAPA/CENARGEN.
- Ferreira RA, Davide AC, Tonetti OAO (2001) Morfologia de sementes e plântulas de pau-terra (*Qualea grandiflora* Mart. - Vochysiaceae). *Revista Brasileira de Sementes* **23**: 116-122.
- Furley PA, Ratter JA (1988) Soil resources and plant communities of the central Brazilian cerrado and their development. *Journal of Biogeography* **15**: 97-108.
- Gaspi FOG, Foglio MA, Carvalho JE, Moreno RA (2006) Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart. *Journal of Ethnopharmacology* **107**: 19-24.
- Hamilton MB (1999) Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* **8**: 521-523.
- Hiruma-Lima CA, Santos LC, Kushima H, Pellizzon CH, Silveira GG, Vasconcelos PCP, Vilegas W, Brito ARMS (2006) *Qualea grandiflora*, a Brazilian "Cerrado" medicinal plant presents an important antiulcer activity. *Journal of Ethnopharmacology* **104**: 207-214.
- Kelchner SA (2000) The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **87**: 482-498.

- Klink CA, Machado RB (2005) Conservation of the Brazilian cerrado. *Conservation Biology* **19**: 707-713.
- Lenza E, Klink CA (2006) Comportamento fenológico de espécies lenhosas em um cerrado sentido restrito de Brasília, DF. *Revista Brasileira de Botânica* **29**: 627-638.
- Machado RB, Ramos Neto MB, Pereira PGP, Caldas EF, Gonçalves DA, Santos NS, Tabor K, Steininger M (2004) *Estimativas da perda da área do cerrado brasileiro*. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF.
- Moraes EM, Yotoko KSC, Manfrin MH, Solferini VN, Sene FM (2009) Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. *Journal of Biogeography* **36**: 2136-2147.
- Novaes RML, Lemes Filho JP, Ribeiro RA, Lovato MB (2010) Phylogeography of *Plathymenia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology* **19**: 985-998.
- Olmstead GR, Sweere JA (1994) Combining Data in Phylogenetic Systematics: An Empirical Approach Using Three Molecular Data Sets in the Solanaceae. *Systematic Biology* **43**: 467-481.
- Paulilo MTS (1991) *Qualea grandiflora* Mart.: crescimento inicial e crescimento foliar em árvores. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, Brasil.
- Pennington RT, Prado DE, Pendry CA (2000) Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography* **27**: 261-273.
- Pennington RT, Lavin M, Oliveira-Filho A (2009) Woody plant diversity, evolution and ecology in the tropics: perspectives from Seasonally Dry Tropical Forests. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **40**: 437-457.
- Persson C (2000) Phylogeny of the Neotropical *Alibertia* group (Rubiaceae), with emphasis on the genus *Alibertia*, inferred from ITS and 5S ribosomal DNA sequences. *American Journal of Botany* **87**: 1018-1028.
- Petit RJ, Mousadik AE, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, **12**, 844-855.
- Pons O, Petit RJ (1996) Measuring and testing genetic differentiation with ordered and unordered alleles. *Genetics*, **144**, 1237-1245.

- Pott A, Pott VJ (2003) Plantas Nativas potenciais para sistemas agroflorestais em Mato Grosso do Sul. *In: Seminário Sistemas agroflorestais e desenvolvimento sustentável*. Campo Grande: Embrapa.
- Prado DE, Gibbs PE (1993) Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **80**: 902-927
- Ramos ACS, Lemes-Filho JP, Ribeiro RA, Santos FR, Lovato MB (2007) Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of Quaternary climate changes in the Brazilian cerrado. *Annals of Botany*, **100**, 1219-1228.
- Ramos ACS, Lemos-Filho JP, Lovato MB (2009) Phylogeographical structure of the Neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. *Journal of Heredity*, **100**, 206-216.
- Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S (1997) The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*, **80**, 223-230.
- Ratter JA, Bridgewater S, Ribeiro JF (2003) Analysis of the floristic composition of the Brazilian cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. *Edinburgh Journal of Botany*, **60**, 57-109.
- Rede de Sementes do Cerrado, 2013 - <http://www.rededesementesdocerrado.org.br/PDF/Especiedavez/Novembro%20de%202010%20Qualea%20grandiflora.pdf>
- Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Ramos ACS, Lovato MB (2011) Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, **106**, 46-57.
- Ritter LMO, Bajay MM, Monteiro M, Souza RGVC, Moreno MA, Kageyama PY (2012) Development of microsatellite markers for *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae), a typical species of the Brazilian cerrado. *American Journal of Botany*, e97-e98.
- Rocha GF, Ferreira LG, Ferreira NC, Ferreira ME (2012) Detecção de desmatamento no bioma cerrado entre 2002 e 2009: padrões, tendências e impactos. *Revista Brasileira de Cartografia*, **63**, 341-349.
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, **84**, 1120-1136.

- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, **94**, 275–288.
- Silva DW, Soares JJ (1999) Estrutura etária das principais populações arbóreas em uma área de cerradão na Fazenda Canchim, São Carlos, SP. *Revista de Ciências Exatas e Naturais*, **1**, 57- 65.
- Silva FAB, Pereira LAR, Silveira CES (2008) Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **51**, 1103-1114.
- Silva Júnior MC, Pereira BAS (2009) *+100 árvores do cerrado matas de galeria*. Brasília, Rede de Sementes do Cerrado. 288p.
- Simon MF, Grether R, Queiroz LP, Skema C, Pennington RT., Hughes CE (2009) Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 20359-20364.
- Soares TN, Melo DB, Resende LV, Chaves LJ, Brondani RV, Collevatti RG, Telles MPC. (2012) Development of microsatellite markers for the neotropical tree species *Dipteryx alata* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, **99**, e72-e73.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal *primers* for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**, 1105-1109.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-2729
- Werneck FP, Colli GR (2006) The lizzard assemblage from Seasonally Dry Tropical Forest enclaves in the Cerrado biome, Brazil, and its association with the Pleistocenic Arc. *Journal of Biogeography*, **33**, 1983-1992.
- Werneck FP, Nogueira C, Colli GR, Sites JW, Costa GC (2012) Climatic stability in the Brazilian Cerrado: implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. *Journal of Biogeography*, **39**, 1695-1706.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, CA, Academic Press. 482p.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Diversidade genética em populações de *A. edulis* e *Q. grandiflora* em áreas de Cerrado central e marginais. Diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica (π) e riqueza alélica após a rarefação (Hr). As siglas identificam os nomes das populações amostradas, de acordo com a Tab. 1.

	<i>Alibertia edulis</i>			<i>Qualea grandiflora</i>		
	h	π	Hr	h	π	Hr
DF	0,00	0,00000	0,00	0,46	0,00031	1,25
GO1	1,00	0,00000	**	0,00	0,00000	0,00
GO2	*	*	*	0,39	0,00095	0,83
GO3	0,00	0,00000	0	*	*	*
MG	0,25	0,00061	0,88	0,20	0,00037	0,50
MT	0,00	0,00000	0,00	*	*	*
PA	0,80	0,00041	0,00	0,00	0,00000	0,00
PI	0,67	0,00070	1,00	0,33	0,00061	0,83
PI2	0,47	0,00066	0,64	0,00	0,00000	0,00
SP	0,80	0,00167	2,42	0,46	0,00402	1,25

Valores não significativos. Apenas um indivíduo analisado

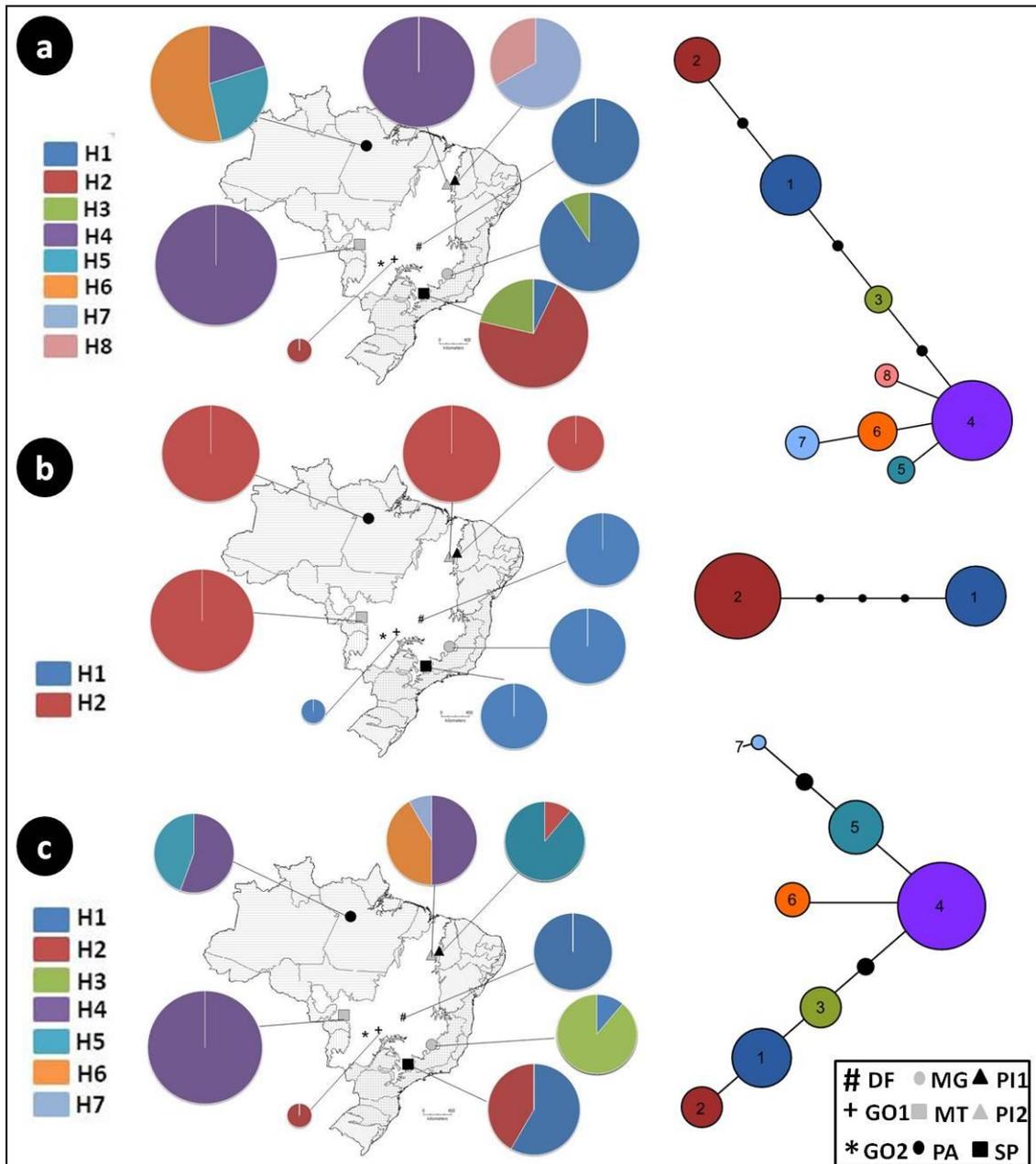


Figura S1. Mapa das localidades de coleta, destacando a área de Cerrado em branco de acordo com o IBGE, redes de haplótipos gerados para *A. edulis* e distribuição dos mesmos de acordo com o tamanho amostral. **a**, *matK*; **b**, *ndhF*; **c**, *psbA-trnH*. O comprimento das linhas nas redes de haplótipos são proporcionais ao número de passos mutacionais, e haplótipos intermediários não amostrados são indicados em preto. As siglas identificam os nomes das populações amostradas, de acordo com a Tab 1.

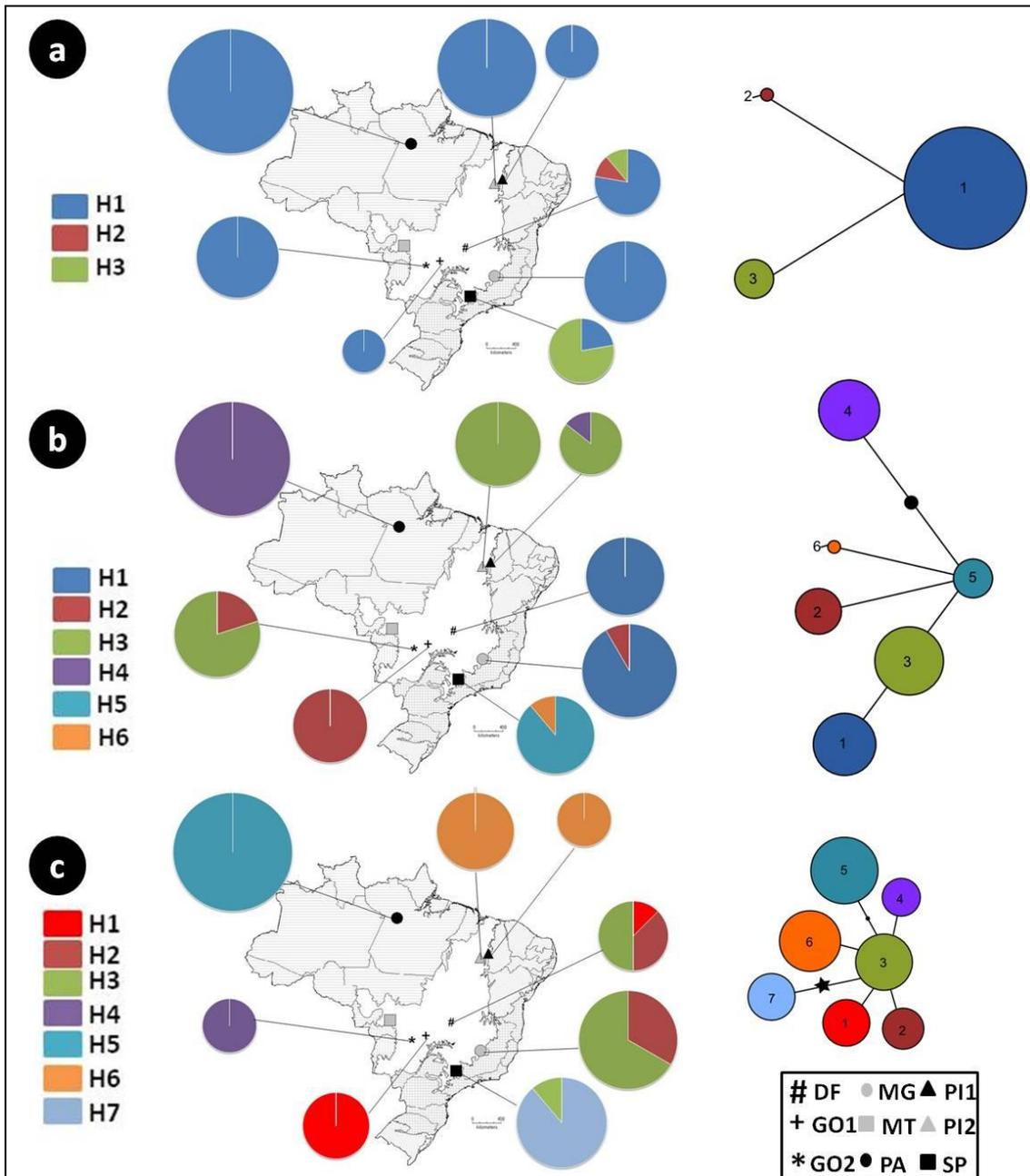


Figura S2. Mapa das localidades de coleta, destacando a área de Cerrado em branco de acordo com o IBGE (2005), redes de haplótipos gerados para *Q. grandiflora* e distribuição dos mesmos de acordo com o tamanho amostral. **a**, *matK*; **b**, *ndhF*; **c**, *psbA-trnH*. Estrela em rede de haplótipos em **c** equivale a duplicação de 24 pb em sete indivíduos da população SP. O comprimento das linhas nas redes de haplótipos são proporcionais ao número de passos mutacionais, e haplótipos intermediários não amostrados são indicados em preto. As siglas identificam os nomes das populações amostradas, de acordo com a Tab 1.

CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo SSR nucleares para *Alibertia edulis* (Rubiaceae)

A ser submetido à

Applications in Plant Sciences

Short title: Dantas *et al.* Microsatélites para *Alibertia edulis*

Título: Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo SSR nucleares para *Alibertia edulis* (Rubiaceae)

Liliane G Dantas^{1*}, Lucas Alencar¹, Bruno Huettel², Richard Reinhardt², Andrea Pedrosa-Harand¹

¹Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal, Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670420, Recife, PE, Brasil

²Max Planck Genome Centre Cologne, MPIPZ. Carl-von-Linne-Weg 10. D-50829 Colônia, Alemanha.

* Autora para correspondência: Liliane G Dantas - dantas.lg@gmail.com

RESUMO

Premissa do estudo - Os Cerrados, segundo maior domínio do Brasil, são considerados um dos 34 *hotspots* mundiais para a conservação. Apesar de sua importância, pouco se conhece sobre sua história biogeográfica. A fim de colaborar para uma melhor compreensão das relações filogeográficas entre as diversas áreas de Cerrado e seu fluxo gênico atual, foram desenvolvidos marcadores moleculares do tipo microsatélite nucleares a partir do sequenciamento 454 para a espécie *Alibertia edulis* (Rubiaceae), uma espécie de ampla distribuição no domínio.

Métodos e Resultados - Das 50 regiões de SSR selecionadas para desenho dos *primers*, 11 se mostraram polimórficas nas duas populações da espécie analisadas (Piauí e Mato Grosso). O número de alelos por loco polimórfico variou de 2 a 11, e as heterozigosidades médias observada e esperada (H_O e H_E , respectivamente), para as populações/locos polimórficos, variaram de 0,091 a 1,0 e 0,368 a 0,937, respectivamente. Foi observada uma deficiência de heterozigotos para quase todos os loci, resultando em um desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg para alguns locos. Os valores de coeficiente de endocruzamento foram, em geral, mais altos na população do Piauí que em Mato Grosso.

Conclusões - Os loci microsatélites caracterizados no presente estudo apresentaram valores de polimorfismo que variaram de moderado a alto nas duas populações analisadas, com o número total de alelos variando de três a 16. Em conjunto, tais loci

serão ferramentas úteis no estudo populacional de *A. edulis*, contribuindo para a melhor compreensão das relações filogeográficas do Cerrado.

Palavras-chave: Cerrado, microsatélites, Cerrados marginais, sequenciamento 454, genética de populações

INTRODUÇÃO

Alibertia edulis (Rubiaceae), comumente conhecida como goiaba preta ou marmelinho do Cerrado, é uma espécie arbórea que pode atingir até oito metros de altura, com folhas verde-escuras simples, opostas, cruzadas, com margens inteiras e nervuras secundárias impressas na face superior e salientes na inferior, flores dióicas brancas e frutos indeiscentes com muitas sementes e polpa suculenta, os quais ficam pretos quando maduros (Persson *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2008; Silva Júnior e Pereira, 2009). Foi definida por Ratter *et al.* (2003) como uma das espécies de ampla distribuição no Cerrado, sendo um excelente modelo para análises filogeográficas.

Os Cerrados brasileiros abrangem cerca de 1,86 milhões de km² de savanas, totalizando cerca de 22% do território nacional (Furley e Ratter, 1988; Ratter *et al.*, 1997; Coutinho, 2000; da Silva e Bates, 2002; Costa *et al.*, 2004; Felfili e Silva Júnior, 2005; Marcuzzo *et al.*, 2012). Essa extensa área abriga uma grande variação de tipos de solos e de climas (Alves, 2007), que associados à ação do fogo, à topografia e à drenagem contribuem para a grande riqueza e diversidade florística encontradas nesse domínio (Costa *et al.*, 2004), que possui cerca de 1,5% de todas as plantas bem como 0,4% dos vertebrados endêmicos do mundo (Myers *et al.*, 2000).

Por outro lado, estimativas indicam que mais da metade de sua área foi destinada para a agropecuária nos últimos 35 anos, valor três vezes superior à área desflorestada na Amazônia no mesmo período (Klink e Machado, 2005). Por sua grande diversidade, aliada a uma intensa degradação, Mittermeier *et al.* (2005) identificou o Cerrado como um dos 34 *hotspots* mundiais prioritários para a conservação.

Um número cada vez maior de marcadores moleculares vem sendo desenvolvido a fim de compreender melhor as relações entre as populações de diferentes espécies do Cerrado (Collevatti *et al.*, 2001; Braga *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2008; Ritter *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2012; Telles *et al.*, 2013). Os microsatélites (SSR) estão dentre os marcadores moleculares mais utilizados para estudos populacionais, destacando-se por serem co-dominantes, apresentarem altos níveis de polimorfismo intraespecífico, além de possuírem uma distribuição aleatória no genoma (Zane *et al.*, 2002). Para análise de

seu polimorfismo é, em geral, necessário um conhecimento prévio da sequência de DNA do organismo a ser estudado (Squirrell *et al.*, 2003; Nybom, 2004). Com o advento de técnicas mais acessíveis de sequenciamento genômico, como o pirosequenciamento 454, o uso dessas sequências para análises populacionais se tornou mais viável, sendo utilizada para um número cada vez maior de espécies (Zane *et al.*, 2002; Angeloni *et al.*, 2011; Guichoux *et al.*, 2011; Crichton *et al.*, 2012; Ritter *et al.*, 2012; Wöhrmann *et al.*, 2013).

A fim de colaborar para uma melhor compreensão das relações filogeográficas entre os diferentes áreas de Cerrado, bem como identificar áreas prioritárias para conservação, o presente trabalho objetivou desenvolver marcadores moleculares do tipo microsatélite a partir do sequenciamento 454 para a espécie *A. edulis*.

MÉTODOS E RESULTADOS

O DNA genômico foi extraído de folhas preservadas em sílica de um indivíduo de *A. edulis* de Paraopeba, Minas Gerais, usando um protocolo de extração convencional CTAB (Weising *et al.*, 2005). Uma alíquota de 5 µg de DNA foi fragmentada por ultrassonicação (COVARIS S2 system) e bibliotecas genômicas foram preparadas por meio da técnica de pirosequenciamento como indicado pelo fabricante (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). As bibliotecas foram quantificadas por fluorometria (TBS-380, Turner Biosystems, Sunnyvale, California, USA) e sequenciadas por sequenciamento tipo *shotgun* em um sequenciador Roche 454 GS-FLX com o kit Titanium Sequencing Kit XLR70 (Roche Diagnostics).

No total, foram obtidos 52.865 *reads*, os quais foram alinhados com o programa CodonCode Aligner 4.0.4 DEMO. Foram realizadas buscas nos *contigs* de sequências e nos *singletons*, sequências que não formaram *contigs*, a fim de encontrar SSRs, com o auxílio do programa MsatCommander 1.0.2-alpha (FairCloth, 2008). Foram adotados os seguintes critérios: dinucleotídeos e trinucleotídeos com ao menos seis repetições, tetranucleotídeos com ao menos cinco repetições, pentanucleotídeos com ao menos quatro repetições e hexanucleotídeos com ao menos três repetições. Mononucleotídeos também foram identificados, muito embora não tenham sido utilizados para desenho dos *primers*, mas microsatélites compostos foram considerados.

Foi analisado um total de 4.697 *contigs* com ao menos 300 pb, dos quais 278 possuíam SSRs, sendo 28 microsatélites compostos e 250 microsatélites simples. Dentre os microsatélites simples, 57,1% foram mononucleotídeos, 30,9%

dinucleotídeos, 4% trinucleotídeos, 2,4% tetranucleotídeos, 4% pentanucleotídeos e 1,6% hexanucleotídeos. Também 16.881 sequências *singletons* foram analisadas em busca de di-, tri-, tetra-, penta- e hexanucleotídeos. Para todas as sequências que possuíam microssatélite, uma busca no GenBank foi realizada, a fim de checar se se tratavam de sequências mitocondriais, cloroplastidiais ou associadas a algum tipo de sequência amplamente repetida no genoma (como retrotransposons), conhecidas para outras espécies, tendo sido estas removidas da análise.

Utilizando a ferramenta Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000), implementada no programa MsatCommander, foram sintetizados *primers* para 12 regiões de *contigs* e 38 de *singletons*, totalizando 50 pares de *primers* microssatélites (Tabelas 1 e S1). A funcionalidade dos *primers* foi testada em cinco indivíduos escolhidos aleatoriamente dentre os indivíduos coletados em sete populações ao longo da distribuição da espécie no Cerrado. Para esses, o DNA genômico foi extraído de folhas secas em sílica seguindo o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1996).

A PCR foi feita para um volume final de 10 μ L usando um termociclador Eppendorf Mastercycler ou um termociclador Applied Biosystems Veriti. A reação continha cerca de 10 ng de DNA genômico, 1 \times Tampão de PCR (Invitrogen), 0,5 μ g de BSA, 2,0 mM MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 0,5 mM de cada *primer* e 0,3 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). Alternativamente, no lugar do BSA, foi adicionada uma solução de Trehalose-BSA-Tween-20 (TBT) na concentração final de 1 \times , como descrito em Samarakoon *et al.* (2013). Depois de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, foram realizados 30 ciclos compostos de 45 s a 94 °C, 1 min a 53-65 °C, 30 s a 72 °C, seguidos por uma extensão final a 72 °C por 15 min.

Os produtos de PCR foram inicialmente analisados em géis de agarose 3% em tampão 1 \times TAE corados com brometo de etídio ou gel red e visualizados em transiluminador. Treze pares de *primers* amplificaram fragmentos do tamanho esperado, 23 não apresentaram amplificação e 14 apresentaram amplificação inespecífica ou fora do tamanho esperado. Os treze que amplificaram fragmentos do tamanho esperado foram utilizados para genotipagem de 20 indivíduos, sendo dez de uma população localizada na Chapada dos Guimarães, no estado do Mato Grosso (MT; 15.46° S - 55.75° O) e dez de uma população localizada em Uruçuí, no estado do Piauí (PI; 7.56° S - 44.44° O), respeitando uma distância mínima de ao menos dez metros entre cada indivíduo dentro de cada população.

A genotipagem foi feita em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% em $1 \times$ TBE corado com nitrato de prata (Creste et al., 2001). O tamanho dos fragmentos foi determinado com o auxílio do ladder 10 pb (Invitrogen). Dos treze loci que amplificaram fragmentos do tamanho esperado, dois foram monomórficos e onze foram polimórficos e utilizados para genotipagem dos indivíduos que apresentaram boa amplificação.

O número de alelos, bem como as heterozigosidades observada e esperada foram determinados com o programa Arlequin v 3.5.1.3 (Excoffier et al., 2005). Adicionalmente, o coeficiente de endogamia de Wright (F_{IS}) foi calculado com o auxílio do programa GENEPOP (Raymond e Rousset, 1995), e todos esses resultados estão compilados na Tabela 2.

Dentre os microssatélites polimórficos, foram observados de um a nove alelos por loco entre os indivíduos da população MT e de dois a 11 alelos entre os indivíduos da população PI. A heterozigosidade observada variou de 0,0 (loco AeSSRS31, loco monomórfico na população MT) a 1,0 (locos AeSSRC2 nas população MT e PI e AeSSRS30 na população PI), enquanto a heterozigosidade esperada variou de 0,0 (loco AeSSRS31, loco monomórfico na população MT) a 0,937 (loco AeSSRC9, população PI).

Foi observada uma deficiência de heterozigotos para quase todos os loci, resultando em um desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg para a população PI em três dos locos e para ambas as populações em dois dos locos (Tabela 2). Além disso, os valores de coeficiente de endocruzamento também foram, em geral, mais altos na população PI que na MT.

Tabela 1. Características dos 11 locos SSR polimórficos e respectivos pares de *primers* desenvolvidos para *Alibertia edulis*

Loco	Sequências <i>primers</i> (5' - 3')	Repetição	Tamanho (pb)	Ta (°C)
AE_SSR_C2	F:GATCACGGCCACATAGAATACC R:CTCCGGTAATTGCTCTTTCAAT	(ACCAA) ₄	240	59
AE_SSR_C9	F:TGTTGAAGGACCACAAGAACAT R:AATTA ACTCCACTTCCCATTGC	(GA) ₁₂	225	65

AE_SSR_S1	F:CACGAAGTGGATTGAGGCAC R:CGGTAGTTTGTCTTCCGGC	(TA) ₁₁	249	59
AE_SSR_S3	F:TCACTACTAGGTAGGCAAATGAAG R:TCCAGAAACTGATTCAAACCC	(CA) ₁₂	338	58
AE_SSR_S6	F:GCGTGAGTGGTGCAAATTC R:CACCCACTCCACAAGGAAG	(CA) ₁₁	224	58
AE_SSR_S8	F:CTGTCTCTTGCGAGTCTTC R:ATGGCACGTCTCCATCCAC	(GA) ₁₂	179	58
AE_SSR_S9	F:CTCTGCCTACCCTCCTTGG R:TGCAACAAGTTGGCTTCGG	(AGG) ₁₁	384	59
AE_SSR_S26	F:ATCTTTCTTGCTTTACCACCA R:GAGGGAGAGTGCGGTTAC	(CCT) ₅	215	56
AE_SSR_S30	F:AAAAGAATCCAACCAAGAAAG R:CAAGTAATAGCAGCATCCAAT	(ACG) ₅	195	53
AE_SSR_S31	F:GAATAAGGATTTTCAGGGGTA R:TAGATAAGGGTAAGGGGCATA	(TTTA) ₅	216	55
AE_SSR_S33	F:T TACTCTTCTATTGGCATTGG R:TGGAGATCAAAAAGACTGCTA	(TTC) ₆	168	55

Ta = temperatura de anelamento

Tais valores mais elevados na população do Piauí podem estar relacionados a um possível longo isolamento da mesma em relação a outras populações de Cerrado, possivelmente desde o Pleistoceno, considerando a origem amazônica do clado *Alibertia* (Persson, 2000), aliado às conexões sugeridas por Batalha-Filho e colaboradores (2013) que promoveram a expansão das florestas de galeria durante o período Plio-Pleistoceno. Adicionalmente, tais valores podem ainda estar relacionados à seleção devido a não-neutralidade dos *loci* ou subestruturação das populações (Woehrmann *et al.*, 2012). Um estudo posterior utilizando os marcadores desenvolvidos neste trabalho em um número maior de populações poderá revelar mais claramente essas relações.

Tabela 2. Parâmetros genéticos determinados em duas populações de *A. edulis* (Mato Grosso - MT e Piauí - PI) para onze locos polimórficos de microssatélites

Loco	AEMT					AEPI					Nam	Nat
	N	Na	H_o	H_E	F_{IS}	N	Na	H_o	H_E	F_{IS}		
AeSSRC2	9	2	1,000	0,529	-1	10	4	1	0,647	-0,593	3	4
AeSSRC9	10	8	0,700	0,863	0,198	10	11	0,800	0,937	0,153	9,5	13
AeSSRS1	10	2	0,182	0,416	0,575	10	2	0,091	0,368	0,762	2	3
AeSSRS3	10	6	0,600	0,837	0,294	10	6	0,400	0,837	0,536	6	6
AeSSRS6	7	6	0,429	0,791	0,478	10	5	0,300	0,726	0,600	5,5	8
AeSSRS8	10	9	0,900	0,900	-0,0	9	8	0,889	0,863	-0,0323	8,5	16
AeSSRS9	10	5	0,800	0,784	-0,0213	10	7	0,800	0,842	0,053	6	9
AeSSRS26	10	2	0,100	0,100	-0,0	10	4	0,5	0,437	-0,154	3	5
AeSSRS30	10	5	1,000	0,711	-0,44	10	6	1,000	0,721	-0,417	5,5	6
AeSSRS31	10	1	0*	0*	-*	10	3	0,9	0,616	-0,500	2	3
AeSSRS33	8	3	0,25	0,425	0,429	10	2	0,3	0,521	0,437	2,5	4

N = número de indivíduos analisados; Na = número de alelos observado; H_o = heterozigidade observada; H_E = heterozigidade esperada; F_{IS} = coeficiente de endogamia de Wright; Nam = número de alelos observado em média nas duas populações; Nat = número de alelos observados no total; locos fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg destacados em negrito; * loco monomórfico para a população MT

CONCLUSÕES

Os marcadores polimórficos desenvolvidos no presente trabalho serão, portanto, ferramentas informativas para análises populacionais e filogeográficas em *Alibertia edulis*. Tais estudos contribuirão para uma melhor compreensão da história biogeográfica do Cerrado e, conseqüentemente, para sua conservação.

Agradecimentos

Nós agradecemos a João Batista de Oliveira Júnior, Ana Paula Moraes, Felipe Amorim e aos gestores das Unidades de Conservação pelo apoio nas coletas e a Ana Benko-Iseppon e João Pacífico Bezerra Neto pelo apoio nas análises dos dados. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), a Fundação Grupo Boticário de Proteção à Natureza pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Alves, R.J.V., Cardin, L., Kropf, M.S. (2007) Angiosperm disjunction "campos rupestres-restingas": a re-evaluation. *Acta Botanica Brasílica*, **21**, 675-685.
- Angeloni, F., Wagemaker, N., Vergeer, P., Ouborg, J. (2012) Genomic toolboxes for conservation biologists. *Evolutionary Applications*, **5**, 130-143.
- Batalha-Filho, H., Fjeldsa, J., Fabre, P.-H., Miyaki, C.Y. (2013). Connections between the Atlantic and the Amazonian forest avifaunas represent distinct historical events. *Journal of Ornithology*, **154**, 41-50.
- Braga, A.C., Reis, A.M.M., Leoi, L.T., Pereira, R.W., Collevatti, R.G. (2007) Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). *Molecular Ecology Notes*, **7**, 53-56.
- Collevatti, R.G., Grattapaglia, D., Hay, J.D. (2001) Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, **10**, 349-356.
- Costa, I.R., Araújo, F.S., Lima-Verde, L.W. (2004) Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, **18**, 759-770.
- Coutinho, L.P. (2000) O bioma do cerrado. In: Klein, AL (org). Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois. Editora UNESP, São Paulo, Brasil. 156p.
- Creste, S., Tulmann Neto, A., Figueira, A. (2001) Detection of simple sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, **19**, 299-306.
- Crichton, R.J., Squirell, J., Woodin, S.J., Dalrymple, S.E., Hollingsworth, P.M. (2012) Isolation of microsatellite primers for *Melampyrum sylvaticum* (Orobanchaceae), an endangered plant in the United Kingdom. *American Journal of Botany*, **99**, e457-e459.
- da Silva, J.M.C., Bates, J.M. (2002) Biogeographic patterns and conservation in the South American cerrado: a tropical savanna hotspot. *BioScience*, **52**, 225-234.
- Excoffier, Laval, L.G., Schneider, S. (2005) Arlequin v. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.
- Faircloth, B. (2008) Msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology*, **8**, 92-94.

- Felfili, J.M., Silva Júnior, M.C. (2005) Diversidade alfa e beta no cerrado *sensu stricto*, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais e Bahia. In: Scariot A, Sousa-Silva JC, Felfili JM (orgs) Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. Brasília. Ministério do Meio Ambiente. 439p.
- Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. (1996) Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 2^a. ed. EMBRAPA/CENARGEN. 220p.
- Furley, P.A., Ratter, J.A.. (1988) Soil resources and plant communities of the central Brazilian cerrado and their development. *Journal of Biogeography*, **15**, 97-108.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., Petit, R.J. (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 591-611.
- Klink, C.A., Machado, R.B. (2005) Conservation of the Brazilian cerrado. *Conservation Biology*, **19**, 707-713.
- Machado, R.B., Ramos Neto, M.B., Pereira, P.G.P., Caldas, E.F., Gonçalves, D.A., Santos, N.S., Tabor, K., Steininger, M. (2004) Estimativas da perda da área do cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF.
- Marcuzzo, F.F.N., Melo, D.C.R., Costa, H.C. (2012) Sazonalidade e distribuição espaço-temporal das chuvas no bioma do cerrado do estado do Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, **17**, 77-86.
- Martins, G.T. (2008) Efeitos da estrutura do habitat na diversidade genética do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Cambess: Caryocaraceae). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais
- Mittermeier, R.A., Gil, R.P., Hoffman, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mittermeier C.G., Lamourex, J., Fonseca, G.A.B. (2005) Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial eco-regions. University of Chicago Press, Boston, USA. 392p
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**, 853-858.
- Nybom, H. (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, **13**, 1143-1155.
- Persson, C. (2000) Phylogeny of the Neotropical *Alibertia* group (Rubiaceae), with emphasis on the genus *Alibertia*, inferred from ITS and 5S ribosomal DNA sequences. *American Journal of Botany*, **87**, 1018-1028.

- Ratter, J.A., Ribeiro, J.F., Bridgewater, S. (1997) The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*, **80**, 223-230.
- Ratter, J.A., Bridgewater, S., Ribeiro, J.F. (2003) Analysis of the floristic composition of the Brazilian cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. *Edinburgh Journal of Botany*, **60**, 57-109.
- Raymond, M., Rousset, F. (1995) GENEPOP (v. 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Ritter, L.M.O., Bajay, M.M., Monteiro, M., Souza, R.G.V.C., Moreno, M.A., Kageyama, P.Y. (2012) Development of microsatellite markers for *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae), a typical species of the Brazilian cerrado. *American Journal of Botany*, e97-e98.
- Rozen, S., Skaletsky, H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Humana Press, Totowa. 500p.
- Samarakoon, T., Wang, S.Y., Alford, M.H. 2013. Enhancing PCR amplification of DNA from recalcitrant plant specimens using a trehalose-based additive. *Applications in Plant Sciences* 1: 1200236
- Silva, F.A.B., Pereira, L.A.R., Silveira, C.E.S. (2008) Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **51**, 1103-1114.
- Silva Júnior, M.C., Pereira, B.A.S. (2009) +100 árvores do cerrado matas de galeria. Rede de Sementes do Cerrado, Brasília. 288p.
- Soares, T.N., Melo, D.B., Resende, L.V., Chaves, L.J., Brondani, R.V., Collevatti, R.G., Telles, M.P.C. (2012) Development of microsatellite markers for the neotropical tree species *Dipteryx alata* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, **99**, e72-e73.
- Squirrell, J., Hollingsworth, P.M., Woodhead, M., Russel, J., Lowe, A.J., Gibby, M., Powell, W. (2003) How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology*, **12**, 1339-1348.
- Telles, M.P.C., Silva, J.B., Resende, L.V., Vianello, R.P., Chaves, L.J., Soares, T.N., Collevatti, R.G. (2013) Development and characterization of new microsatellites for *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae). *Genetics and Molecular Research*, **12**, 3124-3127.

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Kahl, G. (2005) DNA fingerprinting in plants: principle, methods and applications. 2nd edition. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida. 444p.

Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, **11**, 1-16.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S 1. Características dos demais locos SSR que não apresentaram amplificação (*) ou apresentaram amplificação inespecífica/fora do tamanho esperado (**) e respectivos pares de *primers* desenvolvidos para *Alibertia edulis*

Loco	Sequências <i>primers</i> (5' - 3')	Repetição	Tamanho esperado (pb)	Ta (°C)
AE_SSR_C1*	F: GACCCGCAGTAGACGTTTC R: AGGTCATACAAGGCAAGTCAAG	(TCTTG) ₄	400	58
AE_SSR_C3*	F:AGAAATAGGCAGTGGTGCAAAT R:TAAAGCCCGTCATAAGATCACA	(TA) ₂₁	259	59
AE_SSR_C4*	F:GCTGCCCTCTTTTATCAATTC R:CTTCTGGTGACTTCCACACAAC	(AT) ₁₃ AC(TA) ₃₁	213	59
AE_SSR_C5**	F:AGACAAACAAGTCATGCCAGAT R:CTTGACCTTTTCAGCTTGCC	(AGACA) ₄ NNN(AGACA) ₄ A) ₄ NNN(AGACA) ₄	246	58
AE_SSR_C6*	F:TTCTAACTATTCGCTTCCCGTC R:GGCACACTCTACATGCGTTTAC	(ATAC) ₅	133	59
AE_SSR_C7*	F:CCAACCTTCATGCGAAAATAAG R:GGTGGAAACTACAACCAGCAAT	(AC) ₂₉ AA(ACAA) ₁₃	294	60
AE_SSR_C8**	F:GGGTATGGCGCTTGCTTAC R:AGGTGTCCAACTCAACAAAGG	(CTG) ₈ CCGCC(TAG) ₆	272	60
AE_SSR_C10*	F:ATTAGACTGACTGGAGAAGGCG R:GTTCAAGAGGAGGATTCTGACG	(AGT) ₆	186	59
AE_SSR_C11*	F:TAGGAAAGAAACGGAATGGAAC R:GGTAGAGAGAAGGAAGGGAGGA	(CA) ₁₈	139	59

AE_SSR_C12**	F: TGAGGTGTCAAGTGAGTGTTCC R: ATGCTAAGGCAGGACAAGTAGG	(ATGAA) ₄	234	59
AE_SSR_S2*	F: CCAGTCGGTGTTCTTGACAC R: ACGTAGTTTACTGCTTAGTTGC	(GT) ₁₁	317	57
AE_SSR_S4*	F: GAGGCCTGCAGCACAATTC R: GCCAGTGGAAAGACTAGGTTG	(GA) ₁₁	294	58
AE_SSR_S5*	F: TCCTAGAAGACTGCACGGC R: CCTACTGACGACCAAAGAAATAC C	(AT) ₁₄	310	59
AE_SSR_S7**	F: CCTCCACCGCCCTCTATTG R: TGCATGAAACCATTGCCAG	(GT) ₁₁	181	58
AE_SSR_S10**	F: CCATCTTCCCTCCTGTTTCT R: TGCCTCAATACCAATCTTCAA	(TA) ₁₁	165	58
AE_SSR_S11*	F: AAAGAGCCAGTCGGTGTTCC R: ACGTAGTTTACTGCTTAGTTGC	(GT) ₁₁	323	57
AE_SSR_S12**	F: AGAGACGAGAGACAGCCTGA R: AAACGAGTGGGGATTGAGAC	(CAAT) ₅	267	57
AE_SSR_S13**	F: ATGCTGGTCCTCTTTGCTA R: CCTTTTCTCTGCGTTGTCAT	(GCA) ₉	180	57
AE_SSR_S14**	F: GAACGAGAGACAGCAGGAAA R: GCGACACGAGGAAGTTACAT	(ATCC) ₅	164	57
AE_SSR_S15*	F: TCTCACGATCCATAAATTACCTCC R: AGCATAGCGTTCGGTCCTC	(AAG) ₇	202	58
AE_SSR_S16**	F: TCCTTCTGCTTCCATCTCTG R: CCATGAATTTGATCGACGTT	(TTTG) ₇	163	58
AE_SSR_S17**	F: GTGTGGGAGAGGGCTGTT R: ACCCGTTTGATAGCAACTTCT	(TGCG) ₅	276	57
AE_SSR_S18**	F: CCCTTTTCCCTCTTATTCC R: GCTGGTTGCCATCTACACTC	(TA) ₁₀	209	58
AE_SSR_S19**	F: TCCTAGAAGACTGCACGGC R: CCTACTGACGACCAAAGAAATAC C	(AT) ₁₄	310	59
AE_SSR_S20**	F: TCTCTCTCTGCGTGAGTGGT R: GGAAGGAGGTGACAAGGATT	(CA) ₁₁	272	57

AE_SSR_S21*	F:CCTCCACCGCCCTCTATTG R:TGCATGAAACCATTTGCCAG	(GT) ₁₁	181	58
AE_SSR_S22**	F:TTATTGCGTCCTGCTTCTTC R:ACCAAAGTCCATCATCCAAG	(CTT) ₇	166	57
AE_SSR_S23*	F:AGCGGGATTTGAGGTATGG R:TATCGCCGGTAGAATGTCG	(GTTT) ₅	244	57
AE_SSR_S24*	F:AGCCAATCCAAATCAACAAA R:CACGTCTCCATCCACCATA	(GA) ₁₂	238	57
AE_SSR_S25*	F:CAACGAGAACGAAAGAAGATA R:GAGATGAAAGGAAGAGGAAGA	(ATAC) ₅	179	55
AE_SSR_S27*	F:TACTATGTCAGAGGCTTTGGA R:CTTACTGGAACCTGGATGTCA	(GTA) ₆	184	55
AE_SSR_S28*	F:ACCCTTCAATCCCTTCTTT R:CTGCCATACTTGTGACCTAAC	(AG) ₈	199	55
AE_SSR_S29*	F:GTTCTCGTCGTTTCGTAGC R:CAAACCCCAAAACAAAC	(TTAC) ₄	233	55
AE_SSR_S32*	F:TCTTTATTCTGTTTCGTGGTTC R:AGAGACCCCAAAATGAGC	(TC) ₇	194	54,4
AE_SSR_S34*	F:GACCGTTTTATGACATTTGAG R:AACATTTACCCCAAGATTACT	(AT) ₇	208	55
AE_SSR_S35**	F:TCAGTTGGTTAGTTTGTCTGC R:AGGAAGAACATCACCTTGG	(GGT) ₈	194	55
AE_SSR_S36**	F:ACTACTACGTCTCTGGATTGC R:CCTAACTTCGTTTTCTTTTC	(TA) ₁₉	182	53,7
AE_SSR_S37*	F:TCATTCCCATTCTCACATTAG R:TTTACCATGTTCTTTTGCTATG	(TTC) ₁₆	228	55
AE_SSR_S38*	F:TACTCACGTCTACAGGCACA R:TCTTGTAGGTATGGATGGTGA	(CTC) ₆	201	55

Ta = temperatura de anelamento

CONCLUSÕES

- As populações de *A. edulis* e *Qualea grandiflora*, quando analisadas com marcadores cloroplastidiais, apresentaram baixa variabilidade genética, a qual se refletiu em um baixo número de haplótipos;
- As duas espécies apresentaram grande diferenciação populacional, a qual foi refletida nos altos valores de F_{ST} par-a-par e nos valores de AMOVA, indicando que a maior parte da variação foi encontrada entre as populações, e não dentro das mesmas;
- Para *A. edulis* foi observado um claro padrão filogeográfico, que conectou entre si as populações localizadas mais ao centro-noroeste e entre si as populações localizadas mais ao centro-sudeste;
- Para *Q. grandiflora* tal padrão não foi tão claro, mas houve uma grande diferenciação entre as populações, com a presença de haplótipos exclusivos nas populações DF, GO1, MG, PA, PII e SP, sugerindo que, apesar de bem distribuída, existe pouco fluxo gênico entre as populações desta espécie;
- A distinção Cerrado central x Cerrados marginais não foi suportada, observando-se compartilhamento de haplótipos entre as populações de ambos os tipos de Cerrado;
- Nossos resultados sugerem um gradiente leste-oeste na distribuição da diversidade do Cerrado, compatível com possíveis disjunções ocorridas pela incursão das florestas tropicais sazonais secas (SDTF) durante o Pleistoceno (hipótese do Arco Pleistocênico). As populações a oeste desse gradiente se encontram mais vulneráveis, por não se encontrarem em unidades de conservação e por apresentarem haplótipos exclusivos ou raros;
- Os 11 locos microssatélites polimórficos desenvolvidos e caracterizados no presente trabalho fornecem ferramentas úteis para estudos populacionais e filogeográficos em *Alibertia edulis*;
- As análises de polimorfismo realizadas a partir dos dados genotípicos com os microssatélites desenvolvidos no presente trabalho evidenciaram um possível endocruzamento na população do Piauí, o qual pode estar relacionado com o longo isolamento desta população.

ANEXOS - NORMAS DAS REVISTAS

Manuscrito 1. Applications in Plant Sciences

http://botany.org/APPS/APPS_Author_Instructions.html

Manuscrito 2. Molecular Ecology

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-294X/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-294X/homepage/ForAuthors.html)