

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DO INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA
EVOLUTIVA

Filogeografia de *Curatella americana* L. (Dilleniaceae): uma espécie arbórea das
savanas da Amazônia e Brasil Central

JAQUELINY ZOCCA CANUTO

MANAUS-AM

Maio, 2011

JAQUELINY ZOCCA CANUTO

Filogeografia de *Curatella americana* L. (Dilleniaceae): uma espécie arbórea das savanas da Amazônia e Brasil Central

ORIENTADORA: Dra Maristerra R. Lemes

Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

MANAUS-AM

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

C235 Canuto, Jaqueline Zocca

Filogeografia de *Curatella americana* L (Dilleniaceae): uma espécie arbórea das savanas da Amazonia e Brasil Central / Jaqueline Zocca Canuto. --- Manaus

[s.n.],2011.
xiii, 78 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) -- INPA, Manaus, 2011
Orientador: Maristerra Rodrigues Lemes
Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. *Curatella americana*. 2. Filogeografia. 3. Diversidade genética.
4. .Microsatélites . 5. Genoma de cloroplasto. I. Título.

CDD 19. ed. 583.1120415

Sinopse

A fim de determinar a estrutura filogeográfica de populações de *Curatella americana* (Dilleniaceae), vinte e duas populações localizadas em savanas do Brasil Central e Amazônia foram analisadas quanto à variabilidade genética em duas regiões não codificadoras e oito locos de microsatélites do genoma de cloroplasto (cpDNA). Os resultados evidenciaram uma grande similaridade genética entre as populações amostradas, sugerindo o papel que eventos históricos e fluxo de sementes a longa distância podem ter tido na atual estruturação genética das populações de *C. americana*.

Palavras chave: Filogeografia, diversidade genética, *C. americana*, microsatélites, cpDNA.

Dedico esta dissertação à minha mãe Marilda Z. Canuto, ao meu pai Edemilson A. Canuto e ao meu namorado Eduardo H. de Barros, sem o incentivo de vocês eu não chegaria até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente aos meus pais Marilda Z. Canuto e Edemilson A. Canuto que me deram todo o apoio necessário para realização desse sonho e estiveram sempre presentes me apoiando em todas as fases da minha vida.

A Penha e Neni, minhas irmãs queridas por todo carinho e amor. Ao meu namorado Eduardo Hoffman, por apoiar minhas escolhas, sempre torcendo pelo meu sucesso e por sempre ser companheiro e amoroso. Te amo Du!!!

A minha orientadora Dr^a Maristerra R. Lemes pelo apoio e por todo o aprendizado. Por sempre exigir o meu melhor me ajudando a superar minhas dificuldades e crescer profissionalmente.

A Dr^a Tânia Sanaiotti, Dr. Cláudio Nicoletti Fraga, André Rech, Dr. Rogério Gribel, Dr. Toby Pennington, Dr. Arnaldo Carneiro pelo apoio dado à realização das coletas de todo o material botânico que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Alberto Vicentini, Dr^a Camila Ribas, Dr. Charles Clement por todas as contribuições e sugestões feitas durante a aula de qualificação e pelos esclarecimentos de várias dúvidas durante o desenvolvimento desse estudo.

A Dr^a Vera M. Scarpassa pela ajuda na análise de dados e ao Dr. Mario Conhaft por ter compartilhado gentilmente seus conhecimentos de ornitologia.

Ao Dr. Rogério Gribel pelas contribuições e sugestões na discussão dos dados e ao André Rech e Carla Sardelli pelas correções e sugestões feitas neste trabalho.

Aos meus professores de graduação Dr. Leonardo Lutz e Dr^a Daniela Rossoni, vocês foram os grandes responsáveis em despertar minha curiosidade em questões evolutivas e incentivar minha vontade em apreender sempre.

Aos meus amigos Anderson Roberto, Karyne Salomão, Georgia Bassetti, Lorena Possatti, Ana Rita, Marcélia Martinelli, Gabriella Bertoline por toda a amizade e apoio durante todo o tempo em que estive longe.

Aos amigos que fiz em Manaus: Alessandro Alves, Barbara Alessandra, Caroline Maia, Cinthya Arruda, Claudeir, Daniel Fagundes, Daniela Leroy, Diana Britto, Dona Joana, Edson, Eurizângela, Gilson Martins, Leila, Luciana Vieira, Jaqueline Fortuna, Mariana Trindade, Natália Carvalho, Poliana, Ramon Batista, Tatiana Bacry e Thatianna de Lira, pelas ótimas conversas e momentos compartilhados, especialmente a minha amiga Heide Luz por toda a amizade, pelas longas conversas de desabafo e bons momentos de descontração. Amiga obrigado por tudo!!!

A equipe do Labgen e amigos: Alessandro Alves, Carolina Braga (Cherol), Carla Sardelli (Charla), Francimery Carneiro, Milene Souza, Gabriela Farias, Marina Cortês, Tatiana Meniccuci, pela parceria, amizade, conhecimentos técnicos e por proporcionarem um ótimo ambiente de trabalho.

Aos amigos do laboratório de Genética animal, Carlos Schneider e Maria Leandra Terêncio pelas valiosas dicas, palavras de incentivo e ajuda na elaboração da aula de qualificação.

A equipe do Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFLORA) do Rio de Janeiro, pela confecção de mapas presentes na minha dissertação, especialmente a Eline Martins pelo abrigo e companhia agradável durante minha permanência no Rio de Janeiro.

As meninas da secretaria Alessandra, Tamara e Elci por sempre estarem dispostas a ajudar.

Ao Laboratório de Genética Reprodutiva de plantas pelo apoio financeiro na realização desse projeto. A Capes, pela bolsa de estudo, ao INPA e ao GCBEV (Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). A todos os professores do curso por acreditarem no desenvolvimento profissional de seus alunos.

Meu muito obrigado a todos vocês !!!!

RESUMO

Mudanças ambientais em savanas neotropicais parecem ter sido espacialmente complexas durante o quaternário. A dinâmica dessas mudanças é pouco conhecida, principalmente quanto à manutenção e extensão que a vegetação de cerrado alcançou em períodos mais secos no passado. Neste estudo foi investigada a estrutura filogeográfica de populações de *Curatella americana*, uma espécie arbórea típica dos cerrados que ocorrem no Brasil central e Amazônia, por meio da análise de oito locos de microssatélites e duas regiões não codificadoras do genoma do cloroplasto (cpDNA). Foram amostrados 275 indivíduos, de *C. americana* pertencentes a 22 populações distribuídas em áreas de cerrado situadas na Amazônia e no Brasil central. Foram estimados parâmetros de diversidade genética, bem como determinadas a estrutura genética e as relações entre os haplótipos encontrados nas populações de *C. americana*. A distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações foi definida por meio de uma Análise de Variância Molecular (AMOVA), a qual mostrou que aproximadamente 70% da variação genética observada está contida dentro das populações. O índice médio de diversidade genética foi alto ($H_e = 0.67$), variando de $H_e = 0.924$ a $H_e = 0.167$ na análise dos locos cpSSR. Para as regiões não codificadoras do cpDNA foi identificada variação em apenas três populações. A análise combinada dos oito locos de microssatélites do genoma do cloroplasto mostrou um total de 34 haplótipos, enquanto para as sequências do cpDNA foram observados três sítios polimórficos os quais evidenciaram quatro haplótipos. A estrutura genética populacional evidenciada por ambos marcadores do genoma do cloroplasto, regiões não codificadoras ($F_{ST} = 0.28$) e microssatélites ($F_{ST} = 0.30$), demonstrou uma diferenciação genética moderada entre as populações de *C. americana*. Também foi observado o compartilhamento de haplótipos entre várias populações de *C. americana* ao longo de sua distribuição. A ocorrência de haplótipos comuns presentes na maioria das populações, tanto na Amazônia quanto no Brasil Central, sugere uma recente expansão populacional da espécie, corroborada por testes de neutralidade. Dessa forma a atual estrutura genética das populações de *C. americana* evidencia a possível influência que eventos históricos e fluxo gênico a longas distâncias provavelmente tiveram na distribuição da variabilidade genética nas populações desta espécie.

ABSTRACT

Phylogeography of *Curatella americana* L. (Dilleniaceae): a tree species of the Amazon and savannas of central Brazil

Environmental changes in Neotropical savannas appear to have been spatially complex during the Quaternary. The dynamic of these changes are poorly known, especially concerning to the maintenance and range expansion of the Cerrado (savanna) vegetation. This study investigated the phylogeographic structure of *Curatella americana* populations, a typical tree species found in the Cerrado vegetation in Central Brazil and Amazonia, by analysing eight microsatellite loci and two noncoding regions from the chloroplast genome (cpDNA). A total of 275 individuals were sampled from 22 populations, distributed along cerrado areas located in Amazonia and Central Brazil. Genetic diversity parameters were estimated and genetic structure and haplotype relationships defined among populations. The distribution of the genetic variation within and among populations was detected by an Analysis of Molecular Variance (AMOVA) and showed that approximately 70% of the genetic variation was found within populations. The average gene diversity index was high ($H_e = 0.67$), ranging from $H_e = 0.924$ to $H_e = 0.167$ based on the cpSSR loci. For the cpDNA noncoding regions variation was detected in only three populations. The combined analysis of eight cpDNA microsatellite loci revealed a total of 34 haplotypes while for the cpDNA non coding regions the three polymorphic sites generate a total of four haplotypes. The population genetic structure shown by both markers of the chloroplast genome, non coding regions ($F_{ST} = 0.28$) and microsatellites ($F_{ST} = 0.30$), revealed a moderate genetic differentiation among the *C. americana* populations. Several haplotypes were shared among populations of *C. americana* along its distribution. The occurrence of common haplotypes throughout the species range, in Amazonia and Central Brazil, suggests a recent population expansion, confirmed by neutrality tests. The current population genetic structure of *C. americana* highlights the probable influence of historical events and gene flow over long distances in the distribution of the genetic variation of this species populations.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA.....	III
DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE ABREVIACÕES E CONVENÇÕES	XIII
1. APRESENTAÇÃO	
1.1 Distribuição das savanas Neotropicais.....	01
1.2 Família Dilleniaceae e a espécie <i>Curatella americana</i>	02
1.3 Cenário paleo ambiental das savanas.....	07
1.4 Estrutura genética de populações e análise filogeográfica em plantas	08
1.5 Marcadores moleculares em estudos de filogeografia	11
1.6 OBJETIVOS	
1.6.1 Geral.....	13
1.6.2 Específicos	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
2. CAPÍTULO I	
Introdução	31
Material e Métodos	34
<i>Material biológico e locais de coleta</i>	35
<i>Extração e quantificação do DNA</i>	35
<i>Amplificação e análise dos locos microssatélites do genoma do cloroplasto</i>	36
<i>Amplificação e análise de regiões não codificadoras do cpDNA</i>	37
Análise de dados	39
<i>Diversidade genética</i>	39
<i>Estrutura genética populacional e análise filogeográfica</i>	39
Resultados	42

Diversidade genética.....	42
<i>Microsatélites</i>	42
<i>Regiões não codificadoras do cpDNA</i>	43
Estrutura genética populacional e análise filogeográfica.....	44
<i>Microsatélites</i>	44
<i>Regiões não codificadoras do cpDNA</i>	46
Discussão	49
3. CONCLUSÕES.....	81
ANEXO I	82
ANEXO II.....	83
ANEXO III	84
ANEXO IV	85

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Diversidade genética em populações de *C. americana* da Amazônia e Brasil Central com base na análise de duas regiões não-codificadoras do cpDNA (*psbC-trnS* e intron *TrnL*) e oito locos de cpSSR.....59

Tabela 2. Haplótipos encontrados em 22 populações de *C. americana* com base na análise de oito locos de cpSSR.....60

Tabela 3. Distribuição da variabilidade genética em 22 populações de *C. americana*, com base na análise de variância molecular (AMOVA) em duas regiões não-codificadoras de cpDNA (*psbC-trnS* e intron *trnL*) e oito locos de cpSSR.....61

Tabela 4. Sítios polimórficos (em pares de bases) observados em duas regiões não codificadoras (*psbC-trnS* e intron *trnL*) do cpDNA e distribuição de frequência dos haplótipos em cada população de *C. americana*.....62

Tabela 5. Estimativas de expansão populacional com base em dados demográficos e genéticos para populações de *C. americana* utilizando os testes de neutralidade D (Tajima, 1989) e FS (Fu, 1997) . $P < 0.05$ e $*P < 0.01$63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica dos cerrados no Brasil.....01

Figura 2. Distribuição geográfica de *Curatella americana*, segundo dados do CRIA (Centro de Referência em Informação Ambiental) e MOBOT (Missouri Botanic Garden).....05

Figura 3. Detalhe da inflorescência de *C. americana*. Foto: André Rech.....06

Capítulo 1

Figura 1. Locais de coleta das populações de *C. americana*.....64

Figura 2. Distribuição geográfica dos haplótipos observados em 22 populações de *C. americana* com base na análise de oito locos de cpSSR. Os tamanhos dos círculos são proporcionais ao tamanho amostral e cada cor representa um haplótipo conforme legenda ao lado. O mapa menor mostra a área de distribuição de *C. americana* na América Latina segundo dados de ocorrência da espécie fornecidos pelo CRIA (Centro de Referência de Informação Ambiental, São Paulo, SP) e MOBOT (Missouri Botanical Garden, USA).....65

Figura 3. Relações entre haplótipos inferida a partir da análise *Median-Joining* implementada pelo programa *Network*, com base na análise de oito locos de cpSSR de *C. americana*.....66

Figura 4. Relações entre haplótipos inferida a partir da análise *Median-Joining* implementada pelo programa *Network*, com base na análise de duas regiões não codificadoras (*psbC-trnS* e intron *trnL*) do cpDNA de *C. americana*.....67

Figura 5. Representação de filogrupos obtidos pelo SAMOVA.....68

Figura 6. Agrupamentos populacionais de *C. americana* inferidos por meio do programa BAPS.....69

LISTA DE ABREVIACOES E CONVENOES

μ L	Microlitros
AMOVA	Análise de variância molecular
AP	Antes do Presente
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CIA	clorofórmio: lcool isoamílico
cpDNA	Genoma de cloroplasto
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamonia
DNA	cido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
EDTA	cido etileno diamino tetracético
HCl	cido Clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
indel	Inserção/deleção
mtDNA	Genoma mitocondrial
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polietileno Glicol
<i>Primers</i>	Oligonucleotídeos iniciadores
TE	Tris-HCl + EDTA
<i>Taq</i>	Enzima termoestável derivada da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
ROX	Marcador interno de peso molecular GeneScan 500 ROX (ABI, Inc)
RNAse	Enzima utilizada na polimerização do ácido ribonucleico (RNA)
rDNA	DNA ribossomal
SAMOVA	Análise espacial de variância molecular

1. APRESENTAÇÃO

1.1 Distribuição das savanas neotropicais

A região Neotropical possui a segunda maior área de savanas e áreas abertas do mundo (Furley 1999). No Brasil, a vegetação de savana conhecida como cerrado cobre cerca de dois milhões de quilômetros quadrados e possui a maior área de sua distribuição localizada no Brasil central (nos estados de Goiás, Tocantins, Distrito Federal, parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Piauí) com áreas disjuntas na região amazônica (Rondônia, Roraima, Pará, Amapá) e ilhas na região sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e no Paraná (Figura 1) (Salgado-Labouriau *et al.* 1997). Fora do Brasil, as savanas neotropicais ocupam áreas na Bolívia e Paraguai, enquanto paisagens semelhantes são encontradas no Norte da América do Sul (Guiana, Suriname, Colômbia e Venezuela) (Salgado-Labouriau *et al.* 1997).



Figura 1. Distribuição geográfica dos cerrados no Brasil.

O clima do cerrado pode ser dividido em duas estações bem definidas: uma seca, que tem início no mês de maio, terminando no mês de setembro, e outra chuvosa, que vai de outubro a abril, com precipitação variando entre 600 a 800 mm no limite com a caatinga e de 2.000 a 2.200 mm na interface com a floresta Amazônica (Reatto e Martins 2005). A vegetação do cerrado é constituída por uma variedade de tipos fisionômicos caracterizados por um estrato de árvores e arbustos, bem como um estrato herbáceo dominado principalmente por gramíneas (Ratter *et al.* 1997), os quais ocorrem sobre vários tipos de solos, mas a maior parte deles são bem drenados, profundos, ácidos, pobres em nutrientes e com alta saturação de alumínio (Eiten 1972).

As áreas de cerrado localizadas na região amazônica e Brasil central apresentam diferentes características fisionômicas, além de diferenças quanto ao tipo de solo e clima. Os cerrados localizados na região amazônica são constituídos por áreas abertas com gramíneas sem vegetação lenhosa ou podem ser constituídos exclusivamente por plantas arbóreas. No entanto, nessas áreas não é possível identificar uma cobertura arbórea densa. As plantas que ocorrem nessas áreas possuem sistema de raízes muito superficiais e em geral não existem partes vegetativas adaptadas a reprodução assexuada. O clima é úmido, e a umidade do ar é relativamente alta, acima de 80% (Pires e Prance 1985).

O clima das áreas de cerrado do Brasil central é definido por uma estação seca marcante, umidade relativa do ar mais baixa e solos mais profundos que os observados na região amazônica. Além disso, existe uma grande quantidade de plantas com reprodução vegetativa e organismos que apresentam características morfológicas e fisiológicas que proporcionam resistência ao fogo (Coutinho 1990). As plantas apresentam raízes adaptadas a alcançar água em grandes profundidades na ausência de água na superfície em função das características do solo (Pires e Prance 1985).

Apesar dessas diferenças climáticas, pedológicas e fitofisionômicas observadas entre as savanas localizadas na Amazônia e Brasil Central, alguns estudos têm detectado grande similaridade florística entre essas áreas (Gottsberg e Morawetz, 1986; Prance, 1996), evidenciado que algumas espécies, como *Curatella americana* e *Byrsonima crassifolia*, possuem uma variedade de mecanismos adaptativos, como resistência ao fogo e folhas

escleromórficas, as quais permitem que elas se adaptem a diversas condições ambientais (Goldstein *et al.* 1986).

1.2 Família Dilleniaceae e a espécie *Curatella americana*

A família Dilleniaceae possui distribuição pantropical, incluindo 12 gêneros e cerca de 300 espécies (Souza e Lorenzi 2005). No Brasil, a família é representada por seis gêneros e aproximadamente 82 espécies (Fraga 2010). É constituída por árvores, arbustos e lianas, possuindo folhas inteiras, peninérveas, sem estípulas e geralmente apresenta células epidérmicas impregnadas de sílica, o que lhes confere certa aspereza ao tato, pecíolos com ampla inserção no caule (Barroso *et al.* 1999). Possui características vegetativas tais como folhas com indumento com haste primária, pecíolos com uma ampla inserção no caule e ritidoma que se desprendem em placas, além de características florais como cálices uniformemente persistentes, corolas caducas, androceu marcescente em torno do fruto e sementes providas de arilo (Horn 2009). Mesmo com a extraordinária diversidade, especialmente quanto a habitats e estrutura floral, tais características morfológicas são consideradas medidas confiáveis para identificação da família por toda a área geográfica de ocorrência (Horn 2009).

Do ponto de vista filogenético, a monofilia da família foi confirmada tanto por caracteres morfológicos (vegetativos), como por dados moleculares (Hoot *et al.* 1999; Savolainem *et al.* 2000; Horn 2009). A análise molecular separou a família em quatro clados principais, pertencentes às subfamílias Hibbertioideae, Dillenioideae, Doliocarpoideae e Tetracera (Horn 2009).

A compilação mais atual sobre a riqueza das Dilleniaceae neotropicais foi apresentada por Fraga e Stehmann (2010), na qual foram reconhecidas 102 espécies de Dilleniaceae, pertencentes aos gêneros *Curatella* Loefl. (1), *Davilla* Vand. (31), *Doliocarpus* Rol. (49), *Neodillenia* Aymard (3), *Pinzona* Mart. & Zucc. (1) e *Tetracera* L. (17). O Brasil é o país com maior riqueza de espécies (81), com 30 espécies de *Davilla*, onde apenas *Davilla steyermarkii* Kubitzki ocorre fora dos seus limites, 33 de *Doliocarpus*, 15 de *Tetracera*, uma *Neodillenia*, além dos dois gêneros monoespecíficos supracitados. A maior riqueza de espécies de Dilleniaceae está na Mata Atlântica (36), seguida da região Amazônica (31) e do

Cerrado (14), que sempre foi reconhecido como a região fitogeográfica típica para a família, o que está relacionado à abundância e não à riqueza de espécies (Fraga 2009).

Os gêneros de Dilleniaceae que ocorrem no Neotrópico pertencem a duas subfamílias distintas. Delimoideae Burnett, constituída apenas por *Tetracera* L., revelou-se uma linhagem basal e representa o grupo irmão de todas as demais subfamílias. Os demais gêneros neotropicais (*Curatella* L., *Davilla* Vand., *Doliocarpus* Rol., *Neodillenia* Aymard e *Pinzona* Mart. e Zucc.) pertencem à subfamília Doliocarpoideae J. W. Horn e formam um grupo monofilético irmão das subfamílias paleotropicais Dillenioideae Burnett e Hibbertioideae J. W. Horn. Nessa filogenia *Curatella* é grupo irmão de *Pinzona* em uma fraca relação com *bootstraps* próximos a 50 (Horn 2009). O gênero *Curatella* Loef. foi inicialmente proposto por Loefling (1758) em uma descrição minuciosa e bem elaborada, mas sem prover de um nome específico. Apenas em Linnaeus (1759) é que o nome *Curatella americana* L. é proposto e formalmente descrito, em uma curta diagnose, baseada unicamente na descrição genérica oferecida por Loefling, pois aparentemente Linnaeus não teve o material utilizado por Loefling em mãos. O material original da espécie foi coletado por Loefling em sua expedição a Venezuela e posteriormente enviado para Espanha (Todzia e Barrie 1991).

Além de *Curatella americana*, outros cinco nomes foram considerados em *Curatella* para a região Neotropical. *Curatella combaiba* Saint-Hilaire (1824) na obra *Plantes Usuelles des Brasiiliens*, a partir de uma planta coletada em Minas Gerais, sem localidades específicas, porém vem sendo referenciada a obra *Florae Brasiliae Meridionalis* (Saint-Hilaire 1825), como a obra original em alguns trabalhos taxonômicos (Saint-Hilaire 1825; Eichler 1863) e também em bases de dados digitais (www.tropicos.org). Ambas as obras se basearam no mesmo material de herbário, sendo a obra *Plantes Usuelles des Brasiiliens* a obra original para a espécie por ter a prioridade na data de publicação (Art. 11.4; McNeill *et al.* 2006). Além disso, na revisão mais recente é citada a data de 1825, o que representa um erro gerado a partir de Kubitzki (1971). *Curatella grisebachiana* Eichler foi descrita a partir de uma coleta na Ilha de São Domingos, no Caribe (Eichler 1863), mesmo sendo a obra original da espécie a *Flora Brasiliensis*. Atualmente ambos os nomes são tratados como sinônimos de *Curatella americana*, fazendo com que o gênero seja monoespecífico.

Além desses dois nomes atualmente considerados sinônimos de *Curatella americana*, outros três nomes foram tratados no gênero: *Curatella alata* Vent., atualmente tratada com *Davilla alata* (Vent.) Briq.; *Curatella coriaceae* (Mart. e Zucc.) Benoist, atualmente tratada como *Pinzona coriaceae* Mart. & Zucc.; *Curatella glaziovii* Gilg., atualmente tratada como *Doliocarpus dentatus* (Aubl.) Standl (Kubitizki 1971).

A espécie *C. americana* é uma árvore com altura que varia de dois a dez metros, típica da vegetação de cerrado, conhecida popularmente por: caimbê, chaparro, curatá, lixeira e cajueiro-bravo (Foldats e Rutkis 1975). A espécie possui distribuição exclusiva no Neotrópico, sendo amplamente encontrada nos cerrados do Brasil central e Amazônia (Hutchinson 1964) (Figura 2). Trata-se de uma espécie generalista que apresenta características adaptativas relacionadas à resistência ao fogo. As folhas são escleromórficas (Goldstein *et al.* 1986) e o sistema de raízes ajusta-se às condições ambientais. A raiz principal pode chegar a 20 m de comprimento, enquanto raízes laterais podem alcançar 6 m de comprimento (Foldats e Rutkis 1975). A espécie é característica de ambientes com condições distróficas (solos ácidos e com baixo conteúdo de nutrientes) e presumivelmente sobrevive por realocação de nutrientes entre folhas antigas e novas (Furley e Ratter 1988).



Figura 2. Distribuição geográfica de *Curatella americana*, segundo dados do CRIA e MOBOT.

C. americana possui flores brancas com odor, estames numerosos e persistentes (Figura 3). Geralmente a espécie floresce de junho a outubro (Melo *et al.* 1998), em toda sua distribuição geográfica, sendo que a maioria das flores abre durante a noite, indicando provável polinização por insetos noturnos (Foldats e Rutkis 1975). No entanto, no estudo realizado por Silva e Absy (2000) sobre a análise polínica em amostras de mel de *Apis mellifera* L., foi possível identificar uma grande quantidade de pólen de *C. americana* nas amostras de mel, o que pode sugerir que além de atuarem como visitantes florais, abelhas também podem atuar como possíveis polinizadores da espécie.

O gênero é reconhecido por apresentar frutos com coloração marrom quando maduros (Melo *et al.* 1998) e possuir dois carpelos divergentes (Souza e Lorenzi 2005), com pericarpo seco, unidos apenas na base (Barroso *et al.* 1999). Em geral a frutificação ocorre de julho a

dezembro e a maturação dos frutos ocorre principalmente de outubro a novembro. Dessa forma, a dispersão das sementes acontece por um curto período de tempo durante a estação seca (Melo *et al.* 1998). A dispersão das sementes de *C. americana* é realizada por várias espécies de aves das famílias Pipridae (Piratelli 1999) e Tyrannidae (Lopes 2005; Oliveira 2009).



Figura 3. Detalhe da inflorescência de *C. americana*. Autor da foto: André Rech.

1.3 Cenário paleoambiental das savanas

Durante os últimos dois milhões de anos a Terra passou por sucessivos períodos de climas seco/frio (glaciais) e quente/úmido (interglaciais), causados por alterações periódicas (ciclos de Milankovitch) na interceptação e absorção da radiação solar na superfície do planeta (Berger 1988). No que se refere ao último estágio glacial ocorrido no Pleistoceno, os efeitos das reversões climáticas puderam ser observados sob vários aspectos, destacando-se o aumento na temperatura ambiente em 6°- 8° C, mudanças no nível do mar e modificações nos ventos e correntes oceânicas (Brown e Lomolino 2006). Toda essa instabilidade climática desencadeou mudanças ambientais na extensão e configuração dos habitats existentes no

planeta, levando a alterações nos padrões geográficos de ocupação, rotas de dispersão e no grau de especialização das espécies (Dynesius e Jansson 2000).

Mudanças ambientais nas regiões de savana no Neotrópico parecem ter sido espacialmente complexas durante o UMG (Último Máximo Glacial), havendo evidências de sucessivas expansões e contrações dessa vegetação, com vários períodos de conectividade e isolamento entre savanas localizadas em áreas atualmente disjuntas (Behling 1998; Hooghiemstra e Hammen 1998; Hammen e Hooghiemstra 2000).

Em estudo realizado na região central do Brasil, Salgado-Labouriau *et al.* (1997), identificaram por meio de análises de fósseis de pólen, mudanças na extensão da vegetação desde 35.000 AP. Em áreas como Cromínia (GO) e Águas Emendadas, próximas a Brasília, (DF), ambos localizadas na região central do Brasil, Salgado-Labouriau *et al.* (1998) relataram a ocorrência entre 26.000 e 20.000 AP de uma cobertura vegetal marcada por abundância de gramíneas e taxas típicas de cerrado e florestas de galerias. Já por volta de 19.000 a 7.000 AP foi possível identificar uma paisagem com cobertura vegetal reduzida sob condições climáticas muito secas. Com o reestabelecimento de condições climáticas favoráveis, evidências de expansão da vegetação têm sido relatadas para períodos mais recentes e de modo geral, para várias regiões, observou-se um aumento de espécies de plantas características de savanas por volta de 7.000 AP (Behling 1995; Ledru *et al.* 1998; Behling e Hooghiemstra 2001).

Análises paleoambientais com base em dados de pólen também têm sido amplamente realizadas na região amazônica, com registros de alternância de vegetação desde 50.000AP (Absy *et al.* 1991). Análises polínicas realizadas em Katira (Rondônia) mostraram uma diminuição de umidade e um domínio de plantas típicas da vegetação de savanas como *Mauritia* e *Curatella* por volta de 41.000 AP (Hammen e Absy 1994), seguido por vários ciclos de abundância e desaparecimento da vegetação de savanas. No estado do Pará, na região de Carajás, também foram detectadas fases de expansão da vegetação de savanas dentro da região amazônica durante períodos relativamente úmidos, com uma primeira fase ocorrendo por volta de 28.000 AP (Absy *et al.* 1991). Para Humaitá, AM, foi relatada uma maior ocorrência de vegetação típica de savanas e floresta seca por volta de 50.000- 6000 AP (Mayle *et al.* 2000). Análises realizadas a partir de isótopos estáveis de carbono, utilizando

amostras da matéria orgânica do solo, detectaram mudanças significativas da cobertura vegetal no passado em quatro das sete áreas de savanas Amazônicas analisadas (Sanaiotti *et al.* 2002).

Por outro lado em regiões como a Amazônia Equatoriana e Lago Pata, extremo oeste do domínio florestal amazônico do Brasil (Bush *et al.* 1990; Colinvaux 1996), não foram observados evidências de substituição da vegetação de floresta por savanas. Um registro mais recente, por volta de 8.000AP, realizado no Lago Calado, região central da Amazônia, também não detectou indícios de abertura de dossel (Benhing *et al.* 2001). As diferenças encontradas ao longo da região Amazônica devem-se provavelmente à grande heterogeneidade ambiental existente na região, mostrando que as mudanças ambientais ocorridas no passado devem ter sido bastante dinâmicas ao longo do tempo e espaço (Bush 1994).

De um modo geral, o cenário paleoambiental evidenciado por meio da análise de fósseis de pólen e isótopos de carbono indicam a ocorrência de vários ciclos de abundância e desaparecimento da vegetação típica de savanas, tanto na região Amazônica quanto no Brasil central, evidenciando que as áreas de savanas no Neotrópico vêm enfrentando mudanças na sua distribuição desde o UMG.

1.4 Estrutura genética de populações e análise filogeográfica em plantas

A estrutura genética de uma espécie pode ser determinada por meio da distribuição da variabilidade dentro e entre as populações, e é resultado da interação de forças evolutivas tais como mutação, migração, seleção e deriva que operam no contexto biológico e histórico de cada espécie (Loveless e Hamrick 1984). Características relacionadas à história de vida das espécies tais como modo de reprodução, sistema de cruzamento e modo de dispersão, podem influenciar os padrões de trocas gênicas dentro e entre as populações, afetando diretamente a estrutura genética das populações de plantas (Schall *et al.* 1998).

O tipo de reprodução, que determina a formação (sexuada) ou não (assexuada) de gametas (Holsinger 2000) e o sistema de cruzamento, que define a maneira como os gametas

são unidos, são parâmetros importantes na reprodução das plantas. De um modo geral, na reprodução sexuada os gametas podem ser unidos por autogamia, quando os indivíduos se autofertilizam (Lloyd e Schoen 1992), ou alogamia, quando há um intercâmbio genético constante (Lloyd e Schoen 1992; Loveless *et al.* 1998), enquanto na reprodução assexuada não há participação de gametas (Holsinger 2000). Em geral, espécies com fecundação cruzada (alógama) tendem a apresentar baixa divergência interpopulacional, devido ao intercâmbio genético constante ao contrário do que é observado em espécies que se autofertilizam (Cavalli e Winge 2003).

No que concerne à migração gênica, esta pode ocorrer de duas formas nas angiospermas, por meio de pólen e/ou dispersão via sementes (Ennos 1994). As plantas possuem uma diversidade de mecanismos de dispersão os quais influenciam os níveis de variação genética observados dentro e entre as populações (Hamrick e Godt 1990). Plantas que dispersam suas sementes pelo vento ou pela ingestão animal, geralmente mantêm níveis mais altos de variação genética dentro das populações do que espécies que dispersam suas sementes por gravidade (Cavalli e Winge 2003). De modo geral, o fluxo gênico entre as populações reduz a diferenciação interpopulacional, sendo um dos mecanismos responsáveis pela introdução de novas variações genéticas nas populações (Wright 1931).

Estudos genéticos populacionais realizados em espécies arbóreas de plantas tropicais têm demonstrado que grande parte das espécies são alógamas e mantêm altos níveis de variação genética, com a maior parte da variação sendo observada dentro das populações (Hamrick e Murawski 1991; Alvarez-Buylla *et al.* 1996). Tais estudos têm demonstrado a importância que o intercâmbio genético possui na determinação da estrutura genética das populações.

Além de fatores biológicos relacionados à história de vida da espécie, eventos históricos, tais como fragmentação, expansão e colonização, têm sido considerados fatores importantes na determinação da distribuição da diversidade genética dentro das populações (Schall 1998; Avise 2000). Nesse sentido, análises filogeográficas têm sido utilizadas como uma importante ferramenta para o entendimento da estrutura genética das populações, possibilitando detectar associações espacial/temporal de linhagens genealógicas (Templeton 1998). Tal abordagem emprega métodos com base na análise de padrões de diferenciação e

similaridade genética, buscando entender as localizações e disjunções que populações tiveram no passado, bem como a história biogeográfica, que pode ter determinado os padrões que observamos atualmente (Hewitt 2001).

Em regiões temperadas, as análises filogeográficas têm sido importantes na reconstrução da história evolutiva de plantas, principalmente devido ao grande impacto que oscilações climáticas tiveram na distribuição e nos padrões de diversidade genética das espécies (Hewitt 1996). Como observado nos estudos realizados para *Fagus sylvatica* (Demesure *et al.* 1996) e *Heuchera* (Soltis *et al.* 1997) a baixa variação genética encontrada nas populações foi associada a eventos de rápida expansão populacional ocorridos durante períodos interglaciais. Já as espécies *Alnus glutinosa* (King e Ferris 1998), *Dioscorea bulbifera* (Terauchi *et al.* 1991) e *Streptanthus gladulosus* (Mayer e Soltis 1994) tiveram suas populações isoladas dentro de refúgios florestais durante períodos glaciais, sendo possível observar um padrão de estrutura genética altamente estruturado.

Em espécies neotropicais, dados filogeográficos são mais escassos, porém também têm sido considerados importantes para o entendimento da distribuição de espécies no passado e presente (Olsen e Schall 1999; Caron *et al.* 2000; Carvers *et al.* 2003; Collevatti *et al.* 2003; Dutech *et al.* 2003; Grivet e Petit 2003; Lira *et al.* 2003; Ramos *et al.* 2007; Caetano *et al.* 2008; Collevatti *et al.* 2009; Lemes *et al.* 2010; Lorenz-Lemke *et al.* 2010; Novaes *et al.* 2010; Ribeiro *et al.* 2010). No estudo realizado por Caicedo e Schaal (2004) com a espécie *Solanum pimpinellifolium* (Solanaceae) foi possível identificar, por meio de análises filogeográficas, uma interação entre processos populacionais históricos (colonização gradual) e atuais (fluxo gênico contemporâneo) na determinação da estrutura genética das populações. Para a espécie arbórea *Ceiba pentrandia* (Malvaceae), com distribuição nas Américas Central e do Sul, bem como na África, a pouca variação genética observada nas populações, com haplótipos comuns quando analisadas regiões do genoma nuclear e plastidial, foi explicada por eventos de dispersão a longas distâncias por ventos ou correntes marinhas (Dick *et al.* 2007). Lemes *et al.* (2010) observaram padrões filogeográficos bastante distintos em populações de mogno (*Swietenia macrophylla*) localizadas na Amazônia brasileira e na América Central, provavelmente em função de diferenças na história glacial e distúrbios antropogênicos ocorridos no Holoceno tardio nas duas regiões.

Em outros casos, o alto grau de diferenciação genético intrapopulacional foi atribuído a eventos antigos de vicariância, como pode ser observado para as espécies arbóreas *Dalbergia nigra* (Ribeiro *et al.* 2010), *Cedrela odorata* (Cavers *et al.* 2003), *Caesalpinea echinata* (Lira *et al.* 2003) e *Hymenaea coubaril* (Ramos *et al.* 2009) localizadas na floresta Atlântica.

De modo geral, as análises filogeográficas permitem reconstruir a dinâmica temporal da estrutura genética populacional de espécies de plantas, permitindo entender a influência que os acontecimentos históricos tiveram na composição genética atual das populações (Templeton 1998)

1.5 Marcadores Moleculares em estudos de filogeografia

Marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma) (Ferreira e Grattapaglia 1998).

Em espécies de plantas, a informação genética está contida em três genomas distintos: o mitocondrial (mtDNA), o plastidial (cpDNA) e o nuclear (nDNA) (Petit *et al.* 2005). Os genomas mitocondrial (mtDNA) e plastidial possuem herança uniparental e o mtDNA é o que apresenta taxa de evolução mais lenta entre os três genomas (Wolfe *et al.* 1987). Por isso o mtDNA é de pouca utilidade em estudos sobre a variabilidade genética de populações vegetais (Hong e Hipkins 1993; Zhang e Hewitt 2003).

O genoma plastidial (cpDNA), comparado ao mtDNA, apresenta grande flexibilidade para estudos em plantas devido à maior variação encontrada, tamanho e organização. O genoma do cloroplasto é uma molécula de DNA circular, que apresenta tamanhos que variam de 120 kb a 220 kb (Nanhum 2004). O DNA plastidial é um componente abundante do DNA celular total e em geral apresenta herança materna nas angiospermas (McCauley 1995; Ennos *et al.* 1999). Possui diferentes taxas de evolução ao longo do genoma, com taxas lentas de substituição nucleotídicas em regiões codificadoras (Clegg *et al.* 1994) e mais rápidas em regiões não codificadoras (Taberlet *et al.* 1991). O alto grau de conservação das sequências de cpDNA tem facilitado a transferabilidade de iniciadores (*primers*) entre espécies,

possibilitando a amplificação de seqüências codificadoras e não codificadoras, assim como seqüências simples repetidas do cpDNA (Weising e Gardner 1999). Por suas peculiaridades, o cpDNA tem sido amplamente utilizado em estudos filogeográficos e de genética de populações de plantas (Caron *et al.* 2000; Cavers *et al.* 2003; Collevatti *et al.* 2003; Lira *et al.* 2003; Duttech *et al.* 2004; Ge *et al.* 2005; Lorenz-Lemke *et al.* 2005; Azevedo *et al.* 2007; Dick *et al.* 2007; Ramos *et al.* 2007; Collevatti *et al.* 2009; Ramos *et al.* 2009; Lemes *et al.* 2010, Lorenz-Lemke *et al.* 2010; Novaes *et al.* 2010; Ribeiro *et al.* 2010).

Dentre as regiões mais informativas do genoma de cloroplasto destacam-se os DNA satélites, minissatélites e microssatélites, que formam uma família de seqüências repetidas em *tandem*, ocupando uma fração significativa do genoma. Os microssatélites (SSR) são seqüências de DNA relativamente curtas, constituídas de repetições de nucleotídeos que variam de 1 a 6 pb. Os locos microssatélites são altamente polimórficos e a variação se deve principalmente à variação no número de repetições (Powell *et al.* 1995). A natureza desses marcadores provavelmente está relacionada a erros ocorridos na replicação do DNA, causados pela DNA polimerase (Nahum 2004). A abundância e distribuição dos microssatélites variam com a região genômica (éxons, região intergênica) e com o grupo taxonômico (Tóth *et al.* 2000).

A descoberta de DNA microssatélites polimórficos no genoma de cloroplasto de plantas possibilitou novas oportunidades para o estudo de variação citoplasmática com um alto grau de resolução (Provan *et al.* 2001), sendo bastante úteis em análises populacionais, auxiliando na compreensão dos padrões de dispersão e fluxo gênico em espécies neotropicais, bem como em estudos com abordagem filogeográfica (Collevatti *et al.* 2003; Lira *et al.* 2003; Lemes *et al.* 2010).

Além dos SSR, marcadores de seqüências não codificadoras do cpDNA também têm sido bastante empregadas em análises populacionais e evolucionárias (Hamilton 1999). Essas análises são feitas com base nas variações das bases nucleotídicas em uma seqüência específica do DNA, sendo observadas na forma de *indels* (inserção/deleção) ou substituições nucleotídicas (Golenberg *et al.* 1993; Clegg *et al.* 1994; Hamilton *et al.* 2003). Eventos de inserção/deleção (*indels*) são uma categoria relativamente comum de variação de cpDNA como observado por Golenberg *et al.* (1993), porém como os *indels* tendem a ocorrer de

forma não aleatória no cpDNA, homoplasias podem ser geradas (Hamilton *et al.* 2003). Assim, as substituições de nucleotídeos são as variações mais adequadas e têm sido as mais utilizadas em análises de polimorfismos de seqüências de DNA, principalmente em estudos filogenéticos (Golenberg *et al.* 1993).

As regiões não-codificadoras de seqüências do cpDNA destacam-se como um dos marcadores moleculares mais utilizados em estudos populacionais e filogeográficos em espécies de plantas tropicais, devido principalmente à importância que essas regiões têm tido na reconstrução da história evolutiva dessas espécies (Collevatti *et al.* 2003; Lorenz-Lemke *et al.* 2005; Caicedo e Schall 2004; Olsen e Schaal 2005; Dick *et al.* 2007; Novaes *et al.* 2010; Ribeiro *et al.* 2010).

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo geral

Investigar a história biogeográfica da espécie arbórea *Curatella americana* que ocorre nos cerrados da Amazônia e do Brasil Central, por meio de análises filogeográficas e da determinação da estrutura genética de suas populações, utilizando marcadores do genoma do cloroplasto. Espera-se assim contribuir para o melhor conhecimento da biogeografia histórica dos cerrados.

1.6.2 Objetivos específicos

1) Caracterizar os padrões de distribuição da variabilidade genética em populações de *C. americana* que ocorrem na Amazônia e no Brasil Central, utilizando marcadores (regiões não codificadoras e locos microssatélites) do genoma do cloroplasto,

2) Estimar a diferenciação genética entre as populações de *C. americana* que ocorrem na Amazônia e no Brasil Central,

3) Correlacionar medidas de distância genética com distâncias geográficas entre as populações analisadas,

4) Correlacionar os haplótipos e sua distribuição geográfica, buscando compreender os fatores históricos, evolutivos e/ou ecológicos que influenciaram na estruturação genética das populações de *C. americana* nos cerrados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Absy, M.L.; Cleef, A.M.; Fournier, M.; Martin, L.; Servant, M.; Sifeddine, A.; Silva, M.F.; Soubies, F.; Suguio, K.; Turcq, B.; Van der Hammen, T. 1991. Mise en évidence de quatre phases d'ouverture de la forêt dense dans le sud-est de l'Amazonie au cours or dès 60,000 dernières années. Première comparaison avec d'autres régions tropicales. *Comptes Rendus Academie dès Sciences, Paris, Série II*, 312: 673-678.
- Avise, J.C.; Walker, D.; Johns, G.C. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings Royal Society London B.*, 265: 1707-1712.
- Azevedo, V.C.R.; Kanashiro, M.; Ciampi, A.Y.; Grattapaglia, D. 2007. Genetic Structure and Mating System of *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev., a heavily logged Amazonian timber species. *Journal of Heredity*, 98: 646-654.
- Barbosa, R.I.; Nascimento, S.P.; Amorim, P.A.F.; Silva, R.F. 2005. Notas sobre a composição arbórea-arbustiva de uma fisionomia das savanas de Roraima, Amazônia Brasileira. *Acta botânica Brasileira*, 19: 323-329.
- Barroso, G.M.; Morin, M.P.; Peixoto, A.L.; Ichaso, C.L.F. 1999. *Frutos e sementes - morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas*. Editora Viçosa: UFV, 443pp.
- Behling, H. 1995. A high resolution Holocene pollen record from Lago do Pires, SE Brazil: vegetation, climate and fire history. *Journal of Paleolimnology*, 14: 253-268.
- Behling, H. 1998. Late Quaternary vegetational and climatic changes in Brazil. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 99: 143-156.
- Behling, H.; Hooghiemstra, H. 2001. Neotropical savanna environments in space and time: Late quaternary interhemispheric Comparations. In: Markgraf, V. (Ed). *Interhemispheric climate Linkages*. San Diego, CA, Academic, p. 307-323.
- Behling, H.; Keim, G.; Irion, G.; Junk, W.; Nunes de Melo, J. 2001. Holocene environmental changes in the Central Amazon Basin inferred from Lago Calado (Brazil) *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 173: 87-101.

- Berger, A. 1988. Milankovitch theory and climate. *Reviews of Geophysics*, 26: 624-657.
- Brown, J.H.; Lomolino, M.V. 2006. *Biogeografia*. Editora Funpec, Ribeirão Preto, São Paulo. 691pp.
- Bush, M.B.; Colinvaux, P.A.; Wiemann, M.C.; Piperno, D.R.; Liu, K.B. 1990. Pleistocene temperature depression and vegetation change in Ecuadorian Amazonia. *Quaternary Research*, 34: 330-345.
- Bush, M.B. 1994. Amazonian speciation: a necessarily complex model. *Journal of Biogeography*, 21: 5-17.
- Caicedo, A.L.; Schaal, B.A. 2004. Population structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear gene. *Molecular Ecology*, 13: 1871-1882.
- Caetano, S.; Prado, D.; Pennington, R.T.; 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.
- Carneiro, A.F. 1993. Cerrados Amazônicos: Fósseis vivos? Algumas reflexões. *Revista IG*, 14: 63-68.
- Caron, H.; Dumas, S.; Marque, G.; Messier, C.; Bandou, E.; Petit, R. J.; Kremer, A. 2000. Spatial and temporal distribution of chloroplast DNA polymorphisms in a tropical tree species. *Molecular Ecology*, 9: 1089-1098.
- Cavalli, S.S.; Winge, H. 2003. Variabilidade genética em populações naturais. Variabilidade genética em função do modo de reprodução. In: Freitas, L.B.; Bered, F. (Eds). *Genética e Evolução vegetal*. Editora UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. p.165.
- Cavers, S.; Navarro, C.; Lowe, A.J. 2003. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Molecular Ecology*, 12: 1451-1460.

- Clegg, M.T.; Brandon, S.G.; Learn, G.H.; Morton, B.R. 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Science*, 91: 6795-6801.
- Colinvaux, P.A. 1996. Quaternary environmental history and forest diversity in the neotropics. In: Jackson, J.B.C.; Budd, A.F.; Coates, A.G. (Eds). *Evolution and Environment in Tropical America*. Chicago: The University of Chicago Press. p. 359-405.
- Collevatti, R.G.; Grattapaglia, D.; Hay, J.D. 2003. Evidence 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, R.G.; Rabelo, S.G.; Vieira, R.F. 2009. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae) an endangered cerrado shrub species. *Annals of Botany*, 104: 655-664.
- Demesure, B.; Comps, B.; Petit, R.J. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech *Fagus sylvatica* L. in Europe. *Evolution*, 50: 2515-2520.
- Dick, C.W.; Bermingham, E.; Lemes, M.R.; Gribel, R. 2007. Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* L. (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. *Molecular Ecology*, 16: 3039-3049.
- Dutech, C.; Maggia, L.; Tardy, C.; Joly, H.I.; Jarne, P. 2003. Tracking a genetic signal of extinction-recolonization events in a Neotropical tree species: *Vouacapoua americana* Aublet in French Guiana. *Evolution*, 57: 2753-2764.
- Dynesius, M.; Jansson, R. 2000. Evolutionary consequences of changes in species' geographical distributions driven by Milankovitch climate oscillations. *Proceedings of the National Academy of Science*, 97: 9115-20.
- Eichler, A.W. 1863. Dilleniaceae. In: Martius, C.F.P.; Eichler, A.G. (Eds). *Flora Brasiliensis*. Frid Fleischer. Leipzig, vol. 13: 65-120.

- Eiten, G. 1972. The Cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review*, 38: 201-345.
- Ellstrand, N.C.; Elam, D.R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review Ecology Systematic*, 24: 217-242.
- Ennos, R.A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, 72: 250-259.
- Ennos, R.A.; Sinclair, W.T.; Hu, X.S.; Langdon, A. 1999. Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. *In*: Hollingsworth, P.M.; Bateman, R.M.; Gornall, R. J. (Eds). *Molecular Systematics and Plant Evolution*. The Systematics Association Special Volume Series. p.1-19.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília (EMBRAPA-CENARGEN). 222pp.
- Fraga, C.N. 2009. Dilleniaceae. *In*: Giuliatti, A.M.; Rapini, A.; Andrade, M.J.G.; Queiroz, L.P.; Silva, M.J.C. (Orgs). *Plantas raras do Brasil. Conservação Internacional*, Belo Horizonte. P. 159-160.
- Fraga, C.N.; Stehmann, J.R. 2010. Novidades taxonômicas para Dilleniaceae Salisb. Brasileiras. *Rodriguésia*, 61: 01-06.
- Foldats, E.; Rutkis, E. 1975. Ecological studies of chaparro (*Curatella americana* L.) and manteco (*Byrsonima crassifolia* H.B.K.) in Venezuela. *Journal of Biogeography*, 2: 159-178.
- Furley, P.A. 1999. The nature and diversity of neotropical savanna vegetation with particular reference to the Brazilian cerrados. *Global Ecology and Biogeography*, 8: 223-241.
- Furley, P.A.; Ratter, J.A. 1988. Soil resources and plant communities of central Brazilian cerrado and their development. *Journal of Biogeography*, 15: 97-108.

- Ge, X. J.; Liu, M.H.; Wang, W.K.; Schall, A.; Chiang, T.Y. 2005. Population structure of wild bananas, *Musa balbisiana*, in China determined by SSR fingerprinting and cpDNA PCR-RFLP. *Molecular Ecology*, 14: 933-944.
- Grivet, D.; Petit, R.J. 2002. Phylogeography of the common ivy (*Hedera* sp.) in Europe: genetic differentiation through space and time. *Molecular Ecology*, 11: 1351-1362.
- Golenberg, E.M.; Clegg, M.T.; Durbin, M.L.; Doebley, J.; Din, P.M. 1993. Evolution of a noncoding region of the chloroplast genome. *Molecular Phylogenetics and evolution*, 2: 52-64.
- Goldstein, G.; Sarmiento, G.; Meinzer, F. 1986. Daily and seasonal patterns of water relations in evergreen tropical savannas trees. *Acta Oecological*, 7: 107-119.
- Gottsberger, G.; Morawetz, W. 1986. Floristic, structural and Phytogeographical analysis of the savannas of Humaitá (Amazona). *Flora*, 178: 41-71.
- Hamilton, M.B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, 8: 521-523.
- Hamilton, M.B.; Braverman, J.M.; Soria-Hernanz, D.F. 2003. Patterns and relative rates of nucleotide an insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in New World species of the Lecythidaceae. *Molecular Biology and Evolution*, 20: 1710-1721.
- Hammen, V.D.; T.; Hooghiemstra, H. 2000. Neogene and quaternary history of vegetation, climate, and plant diversity in Amazonia. *Quaternary Science Reviews*, 19: 725-742.
- Hammen, V.D.; Absy, M.L. 1994. Amazonia during the last glacial. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 109: 247-261.
- Hewitt, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58: 247-276.
- Hewitt, G.M. 2001. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Quaternary climatic oscillations and genetics*, 359: 183-195.

- Hong, Y.P.; Hipkins, V.D.; Strauss, S.H. 1993. Chloroplast DNA diversity among trees, populations and species in the California closed-cone pines (*Pinus radiata*, *Pinus muricata* and *Pinus attenuata*). *Genetics*, 135: 1187-1196.
- Hooghiemstra, H.; Van der Hammen, T. 1998. Neogene and quaternary development of the Neotropical rain forest: the forest refugia hypothesis, and a literature overview. *Eath-Science Reviews*, 44: 147-183.
- Holsinger, K.E. 2000. Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Colloquium*, 97: 7037-7042.
- Hoot, S.B.; Magallòn, S.; Crane, P.R. 1999. Phylogeny of basal eudicots based on three molecular data sets: atpB, rbcL, and 18S nuclear ribosomal DNA sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 86: 1-32.
- Horn, J.W. 2009. Phylogenetics of Dilleniaceae using sequence data from four plastid loci (rbcL, infa, rps4, rpl16 INTRON). *International Journal of Plants of Sciences*, 170: 794-813.
- Hutchinson, J. 1964. *The genera of flowering plants*. Vol 1. Clarendon, Oxford.
- King, R.A.; Ferris, C. 1998. Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Molecular Ecology*, 7: 1151-1161.
- Kubitzki, K. 1971. *Doliocarpus*, *Davilla*, und verwandte Gattungen (Dilleniaceae). *Mitt. Bot. Staatssamml München*, 9: 1-105.
- Ledru, M.P.; Salgado-Labouriau, M.L.; Lorscheitter, M.L. 1998. Vegetation dynamics in southern and central Brazil during the last 10,000 yr B.P. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 99: 131-142.
- Lemes, M.R.; Dick, C.W.; Navarro, C.; Lowe, A.J.; Cavers, S.; Gribel, R. 2010. Chloroplast DNA microsatellites reveal contrasting phylogeographic structure in Mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) from Amazonia and Central America. *Tropical Plant Biology*, 3: 40-49.

- Lian, C.; Oishi, R.; Miyashita, N.; Nara, K.; Nakaya, H.; Wu B.; Zhou, Z.; Hogetsu, T. 2003. Genetic structure and reproduction dynamics of *Salix reinii* during primary succession on Mount Fuji, as revealed by nuclear and chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 12: 609-618.
- Linnaeus, C. 1759. *Systema naturae*. Salvius. Stockholm, Ed. 10.
- Lira, C.F.; Cardoso, S.R.S.; Ferreira, P.C.G.; Cardoso, M.; Provan, J. 2003. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Molecular Ecology*, 12: 3219-3225.
- Lloyd, D.J.; Schoen, D.J. 1992. Self and cross- fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plants of Sciences*, 153: 358-369.
- Loefling, P. 1758. *Iter hispanicum*. Salvius. Stockholm.
- Lopes, L.E. 2005. Dieta e comportamento de forrageamento de *Suiriri affinis* e *S.islerorum* (Aves, Tyrannidae) em um cerrado do Brasil central. *Iheringia*, Série Zoológica, 95: 341-345.
- Lorenz-Lemke, A.P.; Muschner, V.C.; Bonatto, S.L.; Cervi, A.C.; Salzano, F.M.; Freitas, L.B. 2005. Phylogeographic inferences concerning evolution of brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Annals of Botany*, 95: 799-806.
- Lorenz-Lemke, A.P.; Togni, P.D.; Mader, G.; Kriedt, R.A.; Stehmann, J.R.; Salzano, F.M.; Bonatto, S.L.; Freitas, L.B. 2010. Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South American highlands: a phylogeographic perspective on native *Petunia* (Solanaceae). *Molecular Ecology*, 19: 5240-5251.
- Loveless, M.D.; Hamrick, J.L. 1984. Ecological determinants of genetics structure in plant populations. *Annals Review Ecology and Systematics*, 15: 64-95.
- Loveless, M.D.; Hamrick, J.L.; Foster, R.B. 1998. Population structure and mating system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. *Heredity*, 81: 134-143.

- Mayer, M.S.; Soltis, P.S. 1994. The evolution of serpentine endemics: a chloroplast DNA phylogeny of the *Streptanthus glandulosus* complex (Cruciferae). *Systematic Botany*, 19: 557-574.
- Mayle, F.E.; Burbridge, R.; Killen, T.J. 2000. Millennial-scale dynamics of southern Amazonian rain forests. *Science*, 290: 2291-2294.
- McCauley, D.E. 1995. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of genes flow in plants. *Trends in Ecology e Evolution*, 5: 198-202.
- McNeill, J.; Barrie, F.R.; Burdet, H.M.; Demoulin, V.; Hawksworth, D.L.; Marhold, K.; Nicolson, D.H.; Prado, J.; Silva, P.C.; Skog, J.E.; Wiersema, J.H.; Turland, N.J. 2006. *International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code) adopted by the Seventeenth International Botanical Congress Vienna*. Austria, July 2005. Gantner Verlag, Ruggell, Liechtenstein.
- Melo, J.T.; Silva, J.A.; Torres, R.A.A.; Silveira, C.E.S.; Caldas, L.S. 1998. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do Cerrado. In: Sano, S.M.; Almeida, S.P. (Eds). *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. p. 319-342.
- Miranda, I.Z.; Absy, M.L.; Rebêlo, G.H. 2002. Community structure of Woody plants of Roraima savannahs, Brazil. *Plant Ecology*, 164: 109-123.
- Murawski, D.A.; Hamrick, J.L. 1991. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. *Heredity*, 67: 167-174.
- Nahum, L.A. 2004. Evolução dos genomas. In: Matioli S.R. (Ed). *Biologia Molecular e Evolução*. Holos editora, Ribeirão Preto, São Paulo. p. 82-96.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, New York, USA.
- Novaes, R.M.L.; Lemes-Filho, J.P.; Ribeiro, R.A.; Lovato, M.B. 2010. Phylogeography of *Plathymania reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion

towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology*, 19: 985-998.

Oliveira, A.P. 2009. *Frutificação e frugivoria por aves em remanescente de cerrado Mato Grosso do Sul, Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Brasil. 69pp.

Olsen, K.M.; Schaal, B.A. 1999. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 5586-5591.

Pereira, I.M.; Gomes-Klein, V.L. 2007. Taxonomia e Ecologia da Família Dilleniaceae nos Estados de Goiás e Tocantins. *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 975-977.

Petit, R.J.; Duminil, J.; Fineschi, S.; Hampe, A.; Salvini, D.A.; Vendramim, G.G. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, 14: 689-701.

Piratelli, A.J. 1999. *Comunidades de Aves de sub-bosque na Região leste de Mato grosso do sul*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Instituto de Biologia Rio Claro, São Paulo. 139pp.

Pires, J.M., G.T. Prance. 1985. The vegetation types of the Brazilian Amazon. In: Prance, G.T.; Lovejoy, T.E. (Eds). *Amazonia: Key Environments*. Pergamon Press, Oxford. p. 109-145.

Powell, W.; Morgante, M.; Andre, C.; Mcnicol, J.W.; Marcharay, G.C.; Doyle, J.J.; tingey, S.V.; Rafalski, J.A. 1995. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology*, 5: 1023-1029.

Prance, G.T. 1996. Island in Amazonia. *Proceedings Royal Society London B.*, 351: 823-833

- Provan, J.; Corbett, G.; Powell, W.; McNicol, W. 1997. Chloroplast variability in wild and cultivated rice (*Oryza* spp.) revealed by polymorphic chloroplast simple sequence repeats. *Genome*, 40: 104-110.
- Provan, J.; Powell, W.; Hollingsworth, P.M. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in ecology and Evolution*, 16: 142-147.
- Ramos, A.C.S.; Lemos-Filho, J.P.; Ribeiro, R.A.; Santos, F.R.; Lovato, M.B. 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, A.C.S.; Lemos-Filho, J.P.; Lovato, M.B. 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, J.R.; Ribeiro, J. F.; Bridgewater, S. 1997. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. *Annals of Botany*, 80: 223-230.
- Reatto, A.; Martins, E.S. 2005. Classes de solos em relação aos controles da paisagem do bioma Cerrado. In: Scariot, A.; Souza-Silva, J.C.; Fefili, J.M. (Eds). *Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação*. Ministério do Meio ambiente, Brasília. p.73-92.
- Ribeiro, R.A.; Lemes-Filho, J.P.; Ramos, A.C.S.; Lovato, M.B. 2010. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, 1-12.
- Saint-Hilaire, A. 1824. *Plantes usuelles des Brasiiliens*. Paris, Grimbert Libraire. 475pp.
- Saint-Hilaire, A. 1825. *Flora Brasiliae Meridionalis: accedunt tabulae delineatae Turpinio aeri que incisae. Tomos primus*. Paris, Apud A. Belin, Bibliopolam. 480pp.

- Salgado-Labouriau, M.L.; Caseti, V.; Ferraz-Vicentini, K.R.; Martins, L.; Soubies, F.; Suguio, K.; Turcq, B. 1997. Late Quaternary vegetational and climatic change since in cerrado and palm swamp from central Brazil. *Paleogeography Paleoclimatology, Palaecology*, 128: 215-226.
- Salgado-Labouriau, M.L.; Barberi, M.; Ferraz-Vicentini, K.R.; Parizzi, M.G. 1998. A dry climatic event during the late quaternary of tropical Brazil. *Revision Paleobotanic, Palinology*, 99: 115-129.
- Sanaiotti, T.M.; Martinelli, L.A.; Victoria, R.L.; Trumbore, S.E.; Camargo, P.B. 2002. Past Vegetation Changes in Amazon Savannas Determined Using Carbon Isotopes of Soil Organic Matter. *Biotropica*, 34: 2-16.
- Savolainen, V.; Chase, M.W.; Hoot, S.B.; Morton, C.M.; Soltis, D.E.; Bayer, C.; Fay, M.F.; de Bruijn, A.Y.; Sullivan, S.; Qiu, Y-L. 2000. Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of atpB and rbcL gene sequences. *Systematic Biology*, 49: 306-362.
- Silva, S.J.R.; Absy, M.L. 2000. Análise do pólen encontrado em amostras de mel de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) em uma área de savana de Roraima, Brasil. *Acta Amazonica*, 30: 579-588.
- Souza, V.C.; Lorenzi, H. 2005. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 640 pp.
- Schaal, B.A.; Hayworth, D.A.; Olsen, K.M.; Rauscher, J.T.; Smith, W.A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7: 465-474.
- Shaw, J.; Lickey, E.B.; Beck, J.T. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92: 142-166.

- Soltis, D.E. 1997. Chloroplast DNA intraspecific phylogeography of plants from the Pacific northwest of North America. *Plant Systematics and Evolution*, 206: 353-373.
- Sork, V.L.; Nanson, J.; Campbell, D.R.; Fernandez, J.F. 1999. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 13: 219-224.
- Steane, D.A.; Jones, R.C.; Vaillancourt, R.E. 2005. A set of chloroplast microsatellite primers for *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Molecular Ecology Notes*, 5: 538-541.
- 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.
- Taberlet, P.; Fumagalli, L.; Wust-Saucy, A.G.; Cosson, J.F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7: 453-464.
- Tajima, F. 1989. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Templeton, A.R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7: 381-397.
- Templeton, A.R.; Routman, E.; Phillips, C.A. 1995. Separating Population Structure from Population History: A Cladistic Analysis of the Geographical Distribution of Mitochondrial DNA Haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140: 767-782.
- Terauchi, R.; Terachi, T.; Tsunewaki, K. 1991. Intraspecific variation of chloroplast DNA in *Dioscorea bulbifera* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 81: 461-470.
- Todzia, C.A.; Barrie, F.R. 1991. Neotypification of *Curatella americana* L. (Dilleniaceae). *Taxon*, 40: 488-489.

- Tóth, G.; Gáspári, Z.; Jurka, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis, *Genome Research*.
- Zanettini, M.H.B.; Cavalli, S.S. 2003. Variabilidade genética em função do modo de reprodução. In: Freitas, L.B.; Bered, F. (Eds). *Genética & Evolução vegetal*. Editora UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. p.177.
- Zhang, D.X.; Hewitt, G.M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12: 563-584.
- Weising, K.; Gardner, R.C. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, 42: 9-19.
- Wolfe, K.H.; Li, W.H.; Sharp, P.M. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 84: 9054-9058.

CAPÍTULO 1

Canuto, J.Z. & Lemes, M.R., 2011. Filogeografia de *Curatella americana* L. (Dilleniaceae): uma espécie arbórea das savanas da Amazônia e Brasil Central, Manuscrito formatado para Acta Amazonica

Filogeografia de *Curatella americana* L. (Dilleniaceae): uma espécie arbórea das savanas da Amazônia e Brasil Central

Jaqueline Z. Canuto¹ & Maristerra R. Lemes¹

1. Laboratório de Genética e Biologia Reprodutiva de Plantas (LabGen) e Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

RESUMO

Mudanças ambientais em savanas neotropicais parecem ter sido espacialmente complexas durante o quaternário. A dinâmica dessas mudanças é pouco conhecida, principalmente quanto à manutenção e extensão que a vegetação de cerrado alcançou em períodos mais secos no passado. Neste estudo foi investigada a estrutura filogeográfica de populações de *Curatella americana*, uma espécie arbórea típica dos cerrados que ocorrem no Brasil central e Amazônia, por meio da análise de oito locos de microssatélites e duas regiões não codificadoras do genoma do cloroplasto (cpDNA). Foram amostrados 275 indivíduos, de *C. americana* pertencentes a 22 populações distribuídas em áreas de cerrado situadas na Amazônia e no Brasil central. Foram estimados parâmetros de diversidade genética, bem como determinadas a estrutura genética e as relações entre os haplótipos encontrados nas populações de *C. americana*. A distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações foi definida por meio de uma Análise de Variância Molecular (AMOVA), a qual mostrou que aproximadamente 70% da variação genética observada está contida dentro das populações. O índice médio de diversidade genética foi alto ($H_e = 0.67$), variando de $H_e = 0.924$ a $H_e = 0.167$ na análise dos locos cpSSR. Para as regiões não codificadoras do cpDNA foi identificada variação em apenas três populações. A análise combinada dos oito locos de microssatélites do genoma do cloroplasto mostrou um total de 34 haplótipos, enquanto para as sequências do cpDNA foram observados três sítios polimórficos os quais evidenciaram quatro haplótipos. A estrutura genética populacional evidenciada por ambos marcadores do genoma do cloroplasto, regiões não codificadoras ($F_{ST} = 0.28$) e microssatélites ($F_{ST} = 0.30$), demonstrou uma diferenciação genética moderada entre as populações de *C. americana*. Também foi observado o compartilhamento de haplótipos entre várias populações de *C. americana* ao longo de sua distribuição. A ocorrência de haplótipos comuns presentes na maioria das populações, tanto na Amazônia quanto no Brasil Central, sugere uma recente expansão populacional da espécie, corroborada por testes de neutralidade. Dessa forma a atual estrutura genética das populações de *C. americana* evidencia a possível influência que eventos históricos e fluxo gênico a longas distâncias provavelmente tiveram na distribuição da variabilidade genética nas populações desta espécie.

ABSTRACT

Phylogeography of *Curatella americana* L. (Dilleniaceae): a tree species of the Amazon and savannas of central Brazil

Environmental changes in Neotropical savannas appear to have been spatially complex during the Quaternary. The dynamic of these changes are poorly known, especially concerning to the maintenance and range expansion of the Cerrado (savanna) vegetation. This study investigated the phylogeographic structure of *Curatella americana* populations, a typical tree species found in the Cerrado vegetation in Central Brazil and Amazonia, by analysing eight microsatellite loci and two noncoding regions from the chloroplast genome (cpDNA). A total of 275 individuals were sampled from 22 populations, distributed along cerrado areas located in Amazonia and Central Brazil. Genetic diversity parameters were estimated and genetic structure and haplotype relationships defined among populations. The distribution of the genetic variation within and among populations was detected by an Analysis of Molecular Variance (AMOVA) and showed that approximately 70% of the genetic variation was found within populations. The average gene diversity index was high ($H_e = 0.67$), ranging from $H_e = 0.924$ to $H_e = 0.167$ based on the cpSSR loci. For the cpDNA noncoding regions variation was detected in only three populations. The combined analysis of eight cpDNA microsatellite loci revealed a total of 34 haplotypes while for the cpDNA non coding regions the three polymorphic sites generate a total of four haplotypes. The population genetic structure shown by both markers of the chloroplast genome, non coding regions ($F_{ST} = 0.28$) and microsatellites ($F_{ST} = 0.30$), revealed a moderate genetic differentiation among the *C. americana* populations. Several haplotypes were shared among populations of *C. americana* along its distribution. The occurrence of common haplotypes throughout the species range, in Amazonia and Central Brazil, suggests a recent population expansion, confirmed by neutrality tests. The current population genetic structure of *C. americana* highlights the probable influence of historical events and gene flow over long distances in the distribution of the genetic variation of this species populations. **Keywords:** phylogeography, genetic diversity, *C. americana*, simple sequence repeats, cpDNA.

Introdução

A vegetação de cerrado, também conhecida como savana, cobre cerca de dois milhões de quilômetros quadrados (Ratter *et al.* 1997), abrangendo o Brasil Central e áreas disjuntas distribuídas na região Amazônica (Eiten 1972; Salgado-Laboriau 1997). É caracterizada por um mosaico heterogêneo de fitofisionomias (Eiten 1982), constituído principalmente por gramíneas, herbáceas e um estrato lenhoso não muito denso (Ratter *et al.* 1997). A composição de espécies de plantas varia marcadamente ao longo da distribuição dos cerrados, no entanto, as áreas situadas mais ao sul da Amazônia (ex. Humaitá e Alter do Chão) possuem maior afinidade florística com o Brasil Central quando comparadas às áreas de savanas amazônicas localizadas mais ao norte (ex. Amapá e Roraima) (Ratter *et al.* 1996; Sanaiotti 1996). Porém, algumas espécies arbóreas, como *Curatella americana* L. (Dilleniaceae) são características da flora do cerrado, sendo encontradas ao longo de toda sua distribuição (Goldstein *et al.* 1986).

O conhecimento sobre a história evolutiva do bioma cerrado e os processos históricos responsáveis pelos padrões de distribuição das espécies de plantas que o constituem, ainda é escasso. Registros palinológicos realizados em savanas neotropicais têm comprovado vários períodos de mudanças na cobertura vegetal sendo possível detectar períodos de expansão e contração da vegetação, tanto ao norte quanto ao sul do Equador durante o UMG (Último Máximo Glacial) (Behling e Hooghiemstra 2001). Tais análises indicam que a vegetação de cerrado localizada na região central do Brasil provavelmente se expandiu além de seus limites atuais (Behling e Hooghiemstra 2001; Ledru *et al.* 1996 e 1998; Absy *et al.* 1991) enquanto áreas disjuntas isoladas na região Amazônica são remanescentes de uma área mais contínua que existia no passado (Behling 1998).

Mais recentemente, estudos filogeográficos têm evidenciado diferentes padrões de evolução para espécies de plantas, demonstrando também uma complexa história evolutiva para o bioma. Para a espécie arbórea *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae) foi observada uma subdivisão em três grupos geneticamente distintos (leste, oeste e central) a qual foi atribuída a mudanças climáticas ocorridas durante o quaternário (Ramos *et al.* 2007). Já para a espécie *Plathymenia reticulata*, esse padrão não se manteve, sendo possível detectar oito linhagens divergentes, com populações mais diversas na parte Central do Brasil (GO e MG) apresentando haplótipos comuns entre elas (Novaes *et al.* 2010). A espécie arbustiva *Lyconophora ericoides*, típica de áreas de cerrado rupestre, não apresentou nenhuma similaridade genética entre as populações localizadas nas regiões de Minas Gerais e Goiás, ao contrário do que foi detectado para a última espécie descrita (Collevatti *et al.* 2009). A divergência genética entre populações localizadas na região sudeste (MG) e região centro-oeste (GO) também foi observada para populações do pequiheiro (*Caryocar brasiliense*) (Collevatti *et al.* 2003). Os autores explicam os resultados pela possível restrição na dispersão de sementes, bem como por mudanças ambientais ocorridas durante eventos de glaciação. Neste estudo também foi detectado um compartilhamento de haplótipos entre populações localizadas dos estados de TO, GO, DF, MT e MS (Collevatti *et al.* 2003). Apesar dos trabalhos filogeográficos realizados até o momento com diferentes espécies arbóreas fornecerem informações valiosas sobre a história evolutiva do cerrado, estudos sobre espécies que apresentem distribuições geográficas mais amplas podem revelar cenários ambientais ainda não considerados.

Nesse sentido a espécie *Curatella americana* torna-se um ótimo objeto de estudo para análises filogeográficas, por ser uma espécie típica da vegetação de cerrado e endêmica da

região Neotropical (Hutchinson 1964), com ampla distribuição nas Américas do Sul e Central (Foldats e Rutkis 1975). Sua ampla ocorrência pode estar associada ao fato de ser uma espécie generalista e possuir uma variedade de mecanismos adaptativos, tais como folhas escleromórficas, resistência ao fogo e sistema de raízes especializado (Goldstein *et al.* 1986). O gênero é reconhecido por apresentar frutos com coloração marrom quando maduro (Melo *et al.* 1998), tendo como principais dispersores espécies de aves frugívoras (Piratelli 1999; Lopes 2005; Boss 2009; Oliveira 2009). A espécie é muito abundante em vegetações de cerrado, sendo comumente citada em estudos realizados em áreas de cerrado do Brasil central e da região Amazônica (Carneiro 1993; Sanaiotti 1996; Pereira e Gomes-Klein 2007). A associação de *C. americana* à vegetação de savanas pode sugerir ciclos de abundância e desaparecimento em resposta a mudanças climáticas ocorridas no passado (Behling 1995).

Neste estudo nós analisamos a estrutura filogeográfica de *C. americana* utilizando um grande número (22) de populações distribuídas ao longo da área de distribuição da espécie. Para as análises genéticas utilizamos duas classes de marcadores do genoma do cloroplasto, sendo duas regiões não codificadoras e oito locos de microssatélites, também conhecidos como sequências simples repetidas [cpSSRs]. O genoma do cloroplasto caracteriza-se por não ser recombinante e apresentar herança haplóide (uniparental), geralmente materna na maioria das angiospermas, e por ser transmitido unicamente via sementes (Birky 1995; McCauley 1995), o que possibilita identificar padrões de distribuição da variabilidade genética mais estruturados geograficamente, comparado aos observados no genoma nuclear (Ennos *et al.* 1999; Cavers *et al.* 2003; Petit *et al.* 2005).

Devido à natureza conservada do genoma de cloroplasto (Clegg 1993) nem sempre é possível detectar níveis de variabilidade úteis para aplicação em estudos filogeográficos (Dick

et al. 2003). No entanto, dentro do genoma de cloroplasto é possível observar regiões com diferentes taxas evolutivas (Golenberg *et al.* 1993; Clegg *et al.* 1994). Em geral, as regiões não codificadoras do cpDNA apresentam taxas mais lentas de evolução (Wolfe *et al.* 1987) quando comparados, por exemplo, a regiões de repetições como os locos microssatélites, os quais apresentam maior polimorfismo intraespecífico devido a taxas mais rápidas de evolução dessas regiões (Goldstein e Pollock 1997; Li *et al.* 2002). Dessa forma, os locos microssatélites do cpDNA podem representar uma ferramenta útil em estudos populacionais (Morgante e Olivieri 1993; Powell *et al.* 1995; Provan *et al.* 2001). Mais recentemente, esses marcadores (cpSSR) têm sido utilizados com sucesso na determinação de padrões filogeográficos em plantas (Cafasco *et al.* 2003; Butaud *et al.* 2005; Cubas *et al.* 2005; Lemes *et al.* 2010; Nevill *et al.* 2010).

Assim, a análise conjunta de regiões mais variáveis, como os locos microssatélites e regiões mais conservadas, como as sequências não codificadoras do genoma de cloroplasto, pode contribuir para melhor compreender os padrões de distribuição da variabilidade genética em populações de *C. americana*. Os principais objetivos que motivaram a realização desse estudo foram concebidos com base nas seguintes questões: 1). Como está distribuída a variabilidade genética nas populações de *C. americana*? 2). Existe relação ou diferenciação genética entre as populações de *C. americana* localizadas em áreas de cerrado do Brasil central e da região Amazônica? 3). Quais processos históricos, evolutivos e/ou ecológicos podem estar relacionados com os padrões de distribuição da variabilidade genética encontrados atualmente nas populações de *C. americana* localizadas nos cerrados do Brasil central e da Amazônia?

Material e Métodos

Material Biológico e Locais de Coleta

Amostras de folhas de 275 indivíduos pertencentes a 22 populações de *C. americana* foram coletadas em áreas de cerrado localizadas no Brasil central e Amazônia (Tabela1; Figura 1) As folhas coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos contendo sílica gel e posteriormente armazenadas a -20 °C.

Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico total foi extraído pelo método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (Doyle e Doyle 1987) modificado por Ferreira e Grattapaglia (1998). No protocolo de extração utilizou-se 40 mg de folha seca de cada indivíduo de *C. americana* amostrado, 700 µl de CTAB e 2 µl de β-mercaptoetanol macerados com o auxílio de um disruptor celular FastPrep (Q Biogene, USA); incubação a 60°C por 30 minutos, com agitação manual em intervalos de 10 minutos; emulsão com 600 µl de fenol-clorofórmio (1:1) com os tubos em temperatura ambiente; agitação manual por 5 minutos; centrifugação por 10 minutos a uma velocidade de 12000 a 15000 rpm; recolhimento da fase aquosa; precipitação do DNA com 400µl de isopropanol frio (-20°C absoluto de 1 a 2 horas ou *overnight*); centrifugação por 15 minutos a 6000 ou 7500 rpm e descarte do sobrenadante. Em seguida foi realizada uma dupla lavagem do precipitado com 1 ml de etanol 70°GL; deixando o pellet imerso por 5 a 10 minutos, descarte do sobrenadante; uma lavagem com 1ml de etanol absoluto; ressuspensão do pellet com 75 µl de tampão TE acrescido de RNase. Incubação a 37°C de 30 minutos a 2 horas para digestão com RNase. O *pellet* foi vortexado até sua dissolução.

A concentração final do DNA foi estimada por comparação com marcadores de massa molecular conhecida (fago lambda) por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado

com brometo de etídeo. Para a etapa de amplificação, as amostras de DNA foram diluídas com água ultra-pura na concentração padrão de 2,5 ng/μl.

Amplificação e análise dos locos microssatélites do genoma de cloroplasto (cpDNA)

Para amplificação dos locos microssatélites do cpDNA, foram testados doze oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) universais, dos quais dez foram originalmente desenvolvidos para o tabaco, *Nicotiana tabacum* (Weising e Gardner 1999) e dois desenvolvidos para o eucalipto, *Eucalyptus globulus* (Steane *et al.* 2005). Destes, oito tiveram as condições de amplificação otimizadas para *C. americana*. As reações de PCR (Reação em Cadeia da polimerase) foram realizadas em volume final de 10μL, utilizando 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada DNTP, 3,25 μg de BSA (*Bovine Serum Albumin*), 1 unidade de Taq polimerase, 0,4 μM de cada *primer* (*forward e reverse*), 2,5 ng de DNA e água ultra-pura. A amplificação foi realizada em termociclador *Veriti* (*Applied Biosystems*, Inc) com gradiente de temperatura, seguindo os parâmetros: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 1 minuto, anelamento dos *primers* na temperatura específica para cada par de *primer* durante 1 minuto, extensão a 72 °C durante 1 minuto. Ao final dos 30 ciclos houve extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Após a quantificação, os produtos da PCR foram diluídos em água ultra-pura e analisados em sistema multiplex num seqüenciador automático de DNA 3130 XL (*Applied Biosystems*, Inc.), o qual permite a análise simultânea de vários loci cpSSR numa mesma corrida, utilizando fluorocromos específicos (FAM, HEX). Para a estimativa dos tamanhos dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador interno de peso molecular GeneScan 500 ROX (*Applied Biosystems*, Inc.), seguindo as instruções do fabricante. Os produtos da

amplificação foram posteriormente analisados utilizando o software *GeneMapper* (*Applied Biosystems*, Inc.).

Amplificação e análise de regiões não codificadoras do cpDNA

Para as análises de polimorfismos de seqüências, foram testadas e otimizadas as condições de amplificação de nove regiões não-codificadoras do cpDNA de *C. americana*, utilizando nove pares de *primers* universais que amplificam estas regiões para a maioria das angiospermas: *trnT-trnF*, *intron TrnL* (Taberlet *et al.* 1991), *psbA-trnH*, *psbB-psbF*, *trnS-trnG* (Hamilton 1999), *trnC-yCf6* (Shaw *et al.* 2005), *ndhJ-trnF*, *intron ndhA* (Shaw *et al.* 2007), *psbC-trnS3* (Demesure *et al.* 1995). Das regiões testadas, três (*psbA-trnH*, *ndhJ-trnF*, *intron ndhA*) apresentaram sequências de baixa qualidade após várias tentativas de otimização e não foram utilizadas nas análises posteriores.

Para os testes de polimorfismos de seqüências, foram utilizados quatro indivíduos de *C. americana* pertencentes a populações diferentes, utilizando os seguintes pares de *primers* que amplificam as seis regiões não-codificadoras do cpDNA otimizadas: *trnT-trnF*, *intron TrnL* (Taberlet *et al.* 1991), *psbB-psbF*, *trnS-trnG* (Hamilton 1999), *trnC-yCf6* (Shaw *et al.* 2005), *psbC-trnS3* (Demesure *et al.* 1995). Destas seis regiões testadas, quatro regiões (*trnT-trnF*, *trnG-trnS*, *psbB-psbF*, *trnC-yCf6*) não apresentaram nenhuma variação e apenas duas regiões, o *intron trnL* e o espaçador *psbC-trnS3*, apresentaram polimorfismos e foram posteriormente seqüenciadas para seis indivíduos de *C. americana* por população, totalizando 147 indivíduos analisados para o conjunto das 22 populações.

A amplificação das regiões não-codificadoras de cpDNA foi realizada via PCR seguindo o protocolo: 10 mM Tris-HCl , pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ , 200 µM de

cada DNTP, 3,25 µg de BSA (*Bovine Serum Albumin*), 1 unidade de Taq polimerase , 0,4 µM de cada *primer*, 7,5 ng de DNA e água ultrapura para um total de 20 µL de reação final. As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 1 minuto; anelamento na temperatura ótima de amplificação de cada par de *primer* durante 1 minuto; extensão a 72 °C durante 1 minuto. Ao final dos 30 ciclos ocorreu uma etapa de extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Os tamanhos dos produtos da PCR foram estimados utilizando marcador padrão *ladder* 1 Kb *plus*, em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, visualizados em um transiluminador sob luz UV.

Os produtos da PCR foram purificados com polietilenoglicol e cloreto de sódio, antes do seqüenciamento conforme o protocolo a seguir: (1) Adicionar 15µl do produto da PCR e 15µl de PEG e incubar a 37°C por 30 minutos; (2) Centrifugar a velocidade máxima por 20 minutos; (3) Retirar o sobrenadante; (4) Adicionar 125µl de etanol 80% gelado e centrifugar por 2 minutos; (5) Descartar o sobrenadante; (6) Adicionar 125µl de etanol 100% e retirar em seguida; (7) Secar na estufa para evaporar o etanol residual por 10 minutos a 70°C. Em seguida, os produtos purificados foram ressuspensos em 15µl de água ultrapura e mantidos à temperatura ambiente *overnight*.

Para a reação de seqüenciamento foi utilizado o kit *Big Dye 3.1 Sequencing* (*Applied Biosystems*, Inc.) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos da reação de seqüenciamento foram purificados para eliminação de excesso de reagentes não utilizados na reação. Para tal utilizou-se solução de acetato de sódio/EDTA (3M acetato de sódio com PH 5.2; 125 mM EDTA com pH 8.0) e etanol 100%. A seguir, os produtos foram desnaturados a 95°C durante cinco minutos e analisados em um seqüenciador de DNA ABI 3130 XL

(Applied Biosystems, Inc.) seguindo as instruções do fabricante. As sequências de DNA foram analisadas utilizando o programa *Sequencing Analysis 5.3.1* (Applied Biosystems, Inc.) e em seguida foram visualizadas e editadas no programa *Chromas* (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). O alinhamento das sequências foi feito com o auxílio do programa *Bioedit* (Hall 1999).

Análise de dados

Diversidade genética

Para os dados de microssatélites a definição dos haplótipos foi feita por meio de uma análise multi-loci combinando-se os alelos obtidos. Os parâmetros de diversidade genética estimados para cada população foram: número de alelos (A), número de haplótipos (H) e índice de diversidade genética de Nei (H_E) (Nei 1987), inferidos por meio do programa *Arlequin 3.1* (Excoffier *et al.* 2005). Os índices de diversidade molecular estimados para as regiões não codificadoras do cpDNA foram: π , diversidade nucleotídica; h , diversidade haplotípica e κ , número médio de substituições nucleotídicas. Para tal utilizou-se o programa *Arlequin 3.1* (Excoffier *et al.* 2005).

Estrutura genética de populações e análise filogeográfica

Os padrões de distribuição da variabilidade genética nas populações e o nível de diferenciação entre indivíduos de diferentes localidades foram estimados com base nos dados de sequências e microssatélites, analisados separadamente por meio de análise da variação molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) implementada pelo programa *Arlequin 3.1* (Excoffier *et al.* 2005). Esta análise é uma estimativa da estrutura genética das populações que

leva em conta a variação na frequência gênica entre os haplótipos. Os indivíduos são agrupados hierarquicamente em populações que são incluídas em grupos definidos a priori, com base em informações não genéticas (geográfica, ambientais, ecológicas, etc). Os índices de diferenciação genética (F_{ST}) entre as populações também foram estimados através das AMOVAs, cuja significância foi testada por meio de 10000 permutações.

A hipótese de isolamento por distância foi testada utilizando o teste de Mantel (Mantel 1967), apenas para os dados de microssatélites por meio do programa *Arlequin* 3.0 (Excoffier *et al.* 2005). Essa análise correlaciona medidas de distância genética e distância geográfica (Km), entre os pares das populações analisadas.

As relações entre os haplótipos foram estimadas com base no método *Median-joining* (Bandelt *et al.* 1999) utilizando o programa *Network* (Forster *et al.* 2000), tanto para os dados de regiões não codificadoras como de microssatélites. Essa análise baseia-se no critério de máxima parcimônia a partir da qual obtem-se uma rede de relacionamento de haplótipos na qual são agrupadas as sequências e/ou alelos mais semelhantes.

A fim de determinar como a variabilidade genética encontra-se espacialmente distribuída nas populações foi realizada uma análise espacial da variância molecular implementada pelo programa SAMOVA (Dunpaloup *et al.* 2002), para ambos os marcadores, microssatélites e regiões não codificadoras do cpDNA, a qual infere sobre a existência de agrupamentos de populações (com base na localização geográfica) a partir dos dados genéticos. A análise foi computada variando-se o número de K (número de grupos testados) de 2 a 20. Para cada valor de K, 10000 simulações foram testadas para cada grupo.

A existência de estrutura genética nas populações de *C. americana* também foi avaliada por método bayesiano utilizando o programa BAPS (*Bayesian Analysis of Genetic Population Structure*) versão 4.14 (Corander *et al.* (2003), o qual estima a estruturação populacional por meio do agrupamento de populações (localizações geográficas) em grupos panmíticos.

Para as regiões não codificadoras do cpDNA avaliou-se também a hipótese de expansão populacional por meio dos testes de neutralidade de Fu (Fu 1997) e Tajima (Tajima 1989), implementados pelo programa *Arlequin* 3.0 (Excoffier *et al.* 2005). O teste D de Tajima (Tajima, 1989) e o teste Fs de Fu (Fu, 1997) foram utilizados para examinar se as amostras das diferentes regiões se apresentam em equilíbrio. Tais testes são importantes considerando que o desvio significativo do equilíbrio genético do cpDNA é sinal de expansão ou redução do tamanho populacional recente, nas situações onde não existe vantagem seletiva dos haplótipos. O teste de D de Tajima compara o número de sítios segregantes com a diversidade nucleotídica, enquanto o teste do Fs de Fu quantifica a polaridade da mutação e faz uma estimativa de θ , baseado no número de mutações únicas.

A hipótese de expansão populacional também foi testada através da *mismatch distribution* (Schneider e Excoffier, 1999). Esta análise descreve a distribuição de diferenças nucleotídicas entre pares de sequências de DNA e por meio dela é possível analisar a história demográfica das populações. Intervalos de confiança de *mismatch distribution* foram calculados pelo método de percentil e baseados em 1000 réplicas de *bootstrap* e nível de significância com $P=0.05$. Valores de $P >$ que 0.05 conduzem a não rejeição da hipótese nula, ou seja, indicam que a distribuição das diferenças é compatível com a hipótese de expansão populacional súbita. A validade do modelo de expansão súbita foi testada utilizando o desvio

das somas dos quadrados (SSD) entre a distribuição observada e esperada. A análise foi computada por meio do programa *Arlequin* 3.0 (Excoffier *et al.* 2005)

Resultados

Diversidade genética

Microsatélites

Dos 12 pares de *primers* universais de cpSSR testados (Weising e Gardner 1999; Steane *et al.* 2005), oito tiveram suas condições de amplificação otimizadas (anexo I), confirmando assim a transferabilidade desses marcadores para *C. americana*. Todos os locos de cpSSR (ccmp2, ccmp3, ccmp4, ccmp5, ccmp6, ccmp7, ccmp10 e EMCRC74) utilizados mostraram-se polimórficos e foram analisados para os 275 indivíduos coletados nas 22 populações de *C. americana* amostradas (anexo II).

A partir da análise conjunta dos alelos detectados nos oito locos cpSSR foram definidos 34 haplótipos (Tabela 2) cujas frequências variaram de 2,94 a 30,18%. O número total de alelos (A) observados e o índice médio de diversidade genética (H_e) foram 24 e 0,67, respectivamente. As populações mais diversas em termos de número de haplótipos foram Canarana, MT (CAN) ($H= 9$) e Frutal, MG (FRU) ($H= 8$), ambas localizadas no Brasil central. As populações localizadas no Peru, Maranhão, Goiás, Piauí, Amapá, Amazonas e uma população localizada em Roraima, apresentaram apenas três haplótipos cada. Já a população localizada no Tocantins apresentou apenas dois haplótipos (Tabela 2; Figura 2).

O índice médio de diversidade genética encontrado foi elevado ($H_e= 0,67$) quando comparado aos índices obtidos para as populações de Caseara, TO (CAS) ($H_e= 0.166$),

Manaus, AM (MAN) ($H_e = 0.204$) e Humaitá, AM (HUM) ($H_e = 0.215$). As populações que apresentaram os maiores índices de diversidade genética foram as de Surumu, RR (SUR) ($H_e = 1,00$) e Frutal, MG (FRU) ($H_e = 0,924$). Tais valores não parecem estar relacionados ao tamanho amostral, pois a população de Surumu, RR (SUR) foi a que apresentou o menor número de indivíduos coletados.

Regiões não codificadoras do cpDNA

A amplificação das regiões não codificadoras do cpDNA, *psbC-trnS* e intron *trnL*, produziram fragmentos de 553 e 506 pb respectivamente e foram sequenciadas para seis indivíduos por população, com exceção de Surumu, RR (SUR) ($n = 4$). Foram geradas 123 sequências para cada região do cpDNA, as quais foram unidas e analisadas conjuntamente. A maior parte das sequências mostrou-se conservada (789 pb) para todos os 123 indivíduos analisados, sendo observados apenas três sítios polimórficos, representados por uma transição e duas transversões. Os fragmentos amplificados caracterizaram-se por apresentar um alto conteúdo de A (32.17%) e T (30.29%), sendo que as percentagens de G e C foram 20.41 e 17.12, respectivamente.

No total, para o conjunto das 22 populações de *C. americana*, foram identificados quatro haplótipos definidos em função da detecção de três substituições nucleotídicas nas sequências dos dois marcadores analisados. As diversidades haplotípica e nucleotídica variaram de 0 a 0.6 e de 0 a 0.000564, respectivamente (Tabela 1). Como observado na tabela 1 dezenove populações apresentaram um único haplótipo (H1), e dessa forma, os índices de diversidade para estas populações foi zero. Apenas as populações de Frutal, MG (FRU), Campo Grande, MS (CGR) e Surumu, RR (SUR) apresentaram dois haplótipos e o maior

índice de diversidade genética observado ocorreu na população de Campo Grande, MS (CGR).

Estrutura genética populacional e análise filogeográfica

Microsatélites

A análise da distribuição da variabilidade genética inferida pela AMOVA (Análise de Variância Molecular) foi calculada de duas maneiras distintas: (1) considerando todas as populações como um único grupo e (2) considerando quatro grupos distintos com base na localização geográfica e fitofisionomia dos cerrados, sendo assim, as populações foram separadas em quatro grupos: (i) populações localizadas nos cerrados do Brasil Central, (ii) populações localizadas nos cerrados da região Amazônica (iii) população localizada no Peru (iv) população localizada na Venezuela. Os resultados obtidos considerando todas as populações em um único grupo indicam que 30,61% da variância total ocorrem entre as populações, enquanto a maior parte da variação genética foi atribuída à variância dentro das populações (69,39%), com um alto grau de subdivisão populacional ($F_{ST}= 0.30$). Quando as populações foram analisadas considerando quatro grupos, foi evidenciada uma moderada estruturação genética entre as populações (17,8%) com um valor menor de subdivisão populacional ($F_{ST}= 0.17$) (Tabela 3).

Os valores par a par de F_{ST} para os pares de populações foram calculados com o objetivo de verificar se as populações apresentam alguma estrutura genética em comparação com as outras localidades. A maioria destas comparações foi significativa ($P < 0.05$) e quase todas as comparações entre as populações localizadas nos cerrados da Amazônia geraram valores baixos de F_{ST} como, por exemplo, Corumbiara-RO (COR) e Humaitá-AM (HUM)

($F_{ST} = -0.01$), Monse-PI (MON) e Manaus-AM (MAN) ($F_{ST} = -0.0017$). Para as populações localizadas nos cerrados do Brasil Central também foram observados baixos índices de subdivisão populacional como pode ser observado entre as populações de Campo Grande-MS (CGR) e Frutal-MG (FRU) ($F_{ST} = -0.04$). Todas as comparações que envolvem a localidade de Peru e Venezuela foram significativas e geraram altos valores de subdivisão populacional.

O teste da hipótese de isolamento por distância, implementado pelo teste de Mantel, não evidenciou correlação significativa entre as variáveis analisadas, indicando não haver uma relação direta entre distância genética e a distância geográfica entre os pares de populações de *C. americana* analisadas ($r = 0.101$, $P = 0.15$).

Dos 34 haplótipos evidenciados a partir da análise dos oito locos cpSSR, 18 mostraram-se exclusivos de uma determinada população de *C. americana*, sendo que 10 haplótipos foram representados por apenas um indivíduo, enquanto 16 foram compartilhados entre as populações. Os haplótipos mais frequentes (H2, H4) foram observados em 48,36% dos indivíduos e estão distribuídos em 15 das 22 populações amostradas, constituindo os haplótipos de maior amplitude geográfica. Esses haplótipos foram observados em populações separadas geograficamente por cerca de 3.500 Km como as populações de Frutal, MG (FRU) e Venezuela (VEN).

As relações entre os haplótipos, inferidas pela análise de rede (*Network*), com base nos locos cpSSR, são apresentadas na figura 3 e mostram que quase todos os haplótipos encontram-se diferenciados por apenas um passo mutacional, com exceção de dois haplótipos exclusivos localizados na população de Campo Grande, MS (CGR) os quais apresentam-se separados por duas mutações. Na figura 3 também é possível observar que os quatro

haplótipos mais freqüentes (H1, H2, H4, H6) nas populações localizam-se na parte mais central da *network* e que a partir deles os demais haplótipos da rede são derivados indicando serem estes provavelmente os haplótipos mais ancestrais.

Apesar da organização dos haplótipos não demonstrar uma clara delimitação genética entre as populações, mostrando correlação entre haplótipos e as diferentes populações analisadas, foi possível identificar três pequenos agrupamentos de haplótipos que foram compartilhados entre as populações localizadas nos estados de MS, MG e RO (H7, H13, H21) e AP, PA e RR (H18, H19, H20), e o agrupamento formado pela população do Peru que mostrou-se mais diferenciada, com três haplótipos, compartilhando apenas um haplótipo (H31) com um indivíduo de RO (Figura 3).

A análise realizada por meio da SAMOVA não evidenciou estruturação genética espacial capaz de diferenciar geneticamente grupos de indivíduos amostrados nas 22 populações de *C. americana*, com base na variação encontrada nos locos cpSSR. Todos os valores de K (1 a 20) testados foram negativos e não significativos para o índice F_{ct} .

Regiões não codificadoras do cpDNA

A análise de variância molecular (AMOVA) também foi realizada de duas maneiras distintas, conforme descrito para os dados de microssatélites. Para a análise realizada com todas as populações juntas, foi possível evidenciar que 28.14 % da variabilidade genética estava contida entre as populações e 71.86 dentro delas, com um alto valor de subdivisão populacional ($F_{ST} = 0.28$). Quando as populações foram consideradas como quatro grupos distintos, foi possível observar que 85% da variância estava contida dentro das populações,

com um valor menor de subdivisão populacional ($F_{ST}= 0.14$). Os resultados revelaram, tanto para as regiões de sequências não-codificadoras como para os locos cpSSR, a existência de significativa estruturação genética nas populações, quando as populações foram consideradas em um único grupo e em quatro grupos.

As relações entre os quatro haplótipos de *C. americana*, inferidas por meio da análise de rede utilizando o método *Median-Joining*, a partir dos dados de sequências do cpDNA são mostradas na figura 4. O haplótipo mais freqüente (H1) foi observado em 95.4% dos indivíduos analisados, estando presente nas 22 populações amostradas de *C. americana*. O haplótipo H1 diferencia-se dos demais haplótipos (H2, H3 e H4) por apenas uma substituição nas posições 168, 512 e 916, respectivamente (Tabela 4).

Ao contrário da análise realizada para os locos cpSSR, a análise de variância molecular espacial (SAMOVA), realizada a partir da análise das sequências não codificadoras do cpDNA, mostrou que as populações estão geograficamente estruturadas dentro de quatro filogrupos ($K=4$, $F_{ct}=0.73$) (Figura 5). A baixa diversidade haplotípica dentro das populações e a existência de haplótipos únicos na maioria das populações contribui para esta alta estruturação geográfica de *C. americana*.

A análise bayesiana, implementada pelo programa BAPS, para inferir sobre a estrutura genética de populações, mostrou que a probabilidade a *posteriori* mais adequada para explicar a formação de grupos correspondeu a quatro agrupamentos. Nesses agrupamentos foi possível observar que as populações de Campo Grande (CGR), MS; Frutal (FRU), MG e Surumu (SUR), RR, apresentam representantes em mais de um grupo. O

agrupamento (*cluster*) 1, em vermelho, foi o que agrupou um maior número de localidades sendo composto por todas as 22 populações amostradas.

A figura 6 mostra cada agrupamento (*cluster*) identificado por uma barra colorida (programa BAPS). Observa-se que todas as populações são agrupadas dentro do primeiro *cluster*, representado pela cor vermelha. Apenas as localidades de Campo Grande (CGR), MS e Frutal (FRU), MG localizadas nos cerrados do Brasil Central e a localidade de Surumu (SUR), RR localizada nos cerrados da Amazônia são representados por dois *clusters*, o que indica que estes grupos possuem maior heterogeneidade genética.

A história demográfica de *C. americana* foi analisada a partir dos testes de neutralidade (F_s de Fu 1997 e D de Tajima 1989) de três maneiras distintas: (1) considerando um grupo com todas as populações, (2) a partir dos filogrupos identificados pelo SAMOVA (3) considerando os cerrados localizados no Brasil central, região amazônica, Peru e Venezuela em grupos separados.

Quando todas as populações foram analisadas em um único grupo, os testes de neutralidade (D de Tajima e F_s de Fu) apresentaram resultados negativos e significativos. A expansão espacial e demográfica também foi suportada pela distribuição *mismatch* ($P_{SSD} > 0.05$ e $P_{HG} > 0.05$). Considerando os quatro filogrupos obtidos por meio do SAMOVA, apenas o filogrupo I não apresentou sinais de expansão populacional, devido à baixa variabilidade genética encontrada nesse agrupamento, com apenas um haplótipo.

Considerando os testes demográficos analisados por cerrado (Brasil central, Amazônia, Peru e Venezuela), os valores obtidos para os testes D de Tajima e F_s de Fu foram negativos e significativos para os cerrados localizados no Brasil central e Amazônia, indicando uma expansão populacional recente (Tabela 5). A expansão espacial e demográfica também é suportada pela distribuição *mismatch* para as populações localizadas nos cerrados do Brasil central e Amazônia.

Discussão

As populações de *C. americana* exibiram alta diversidade genética intrapopulacional (H_E médio = 0,67) com base na análise conjunta de oito locos de microssatélites do genoma do cloroplasto. Tal diversidade compara-se aos índices encontrados em estudos de espécies arbóreas que também utilizaram esta classe de marcador molecular tais como: *Vitellaria paradoxa* ($H_e = 0.71$) (Fontaine *et al.* 2004), *Corylus avellana* ($H_e = 0.43$) (Palmé e Vendramim 2002) e *Swietenia macrophylla* ($H_e = 0,63$) (Lemes *et al.* 2010). Outros estudos, no entanto, mostram índices de diversidade superiores ao observado no presente estudo (*Santalum insulare* ($H_e = 0,82$) Butaud *et al.* 2005 e *Dalbergia monticola* ($H_e = 0,88$) Andrianoelina *et al.* 2005).

Em contraste, as análises de diversidade genética realizadas para as regiões de sequência não codificadoras do cpDNA evidenciaram pouca variabilidade genética, detectada em apenas três populações de *C. americana* ($\pi = 0$ a 0.000564). Para as espécies arbóreas *Hymenaea stigonocarpa* (Ramos *et al.* 2007), *Hymenaea courbaril* (Ramos *et al.* 2009), *Lyconophora ericoides* (Collevatti *et al.* 2009), *Dalbergia nigra* (Ribeiro *et al.* 2010) também foi possível evidenciar uma baixa diversidade nucleotídica nas populações com índices variando de (π 0-00267), (π 0-00279), (π 0-0042), (π 0-00084), respectivamente, quando as

análises foram realizadas a partir de regiões de sequências do cpDNA semelhantes às utilizadas no presente estudo.

Locos de microssatélites do genoma de cloroplasto têm sido utilizados em vários estudos genéticos populacionais e filogeográficos devido ao alto polimorfismo intraespecífico observado para essas regiões (Vendramin *et al.* 1999; Provan *et al.* 2001; Mengoni *et al.* 2001; Cafasco *et al.* 2003; Lian *et al.* 2003; Wills e Burk 2006; Butaud *et al.* 2005; Cubas *et al.* 2005; Terrab *et al.* 2006; Lemes *et al.* 2010; Nevill *et al.* 2010). Apesar das regiões de sequências analisadas também pertencerem ao genoma de cloroplasto, a discrepância entre estes resultados pode ser explicada pelas taxas de mutação em locos de microssatélites serem superiores (10^{-2} a 10^{-6}) (Li *et al.* 2002) às observadas nas regiões não codificadoras (Wolfe *et al.* 1987; Clegg 1993; Clegg *et al.* 1994), permitindo assim detectar maior variação genética nas regiões repetitivas (cpSSR).

As análises dos locos cpSSR e regiões de sequências não codificadoras do cpDNA revelaram níveis significativos de estruturação genética das populações de *C americana*. Considerando todas as populações como pertencentes a um único grupo, a AMOVA mostrou que 30,61% e 28,14% da variação foi observada entre as populações, para microssatélites e regiões de sequências não codificadoras, respectivamente. Tal padrão é similar ao encontrado em outras espécies de árvores neotropicais que indicam uma tendência à fixação de muitos haplótipos dentro das populações, gerando níveis significativos de diferenciação populacional, como observado em *Caryocar brasiliense* (Collevatti *et al.* 2003), *Cedrella odorata* (Cavers *et al.* 2003), *Vitellaria paradoxa* (Fontaine *et al.* 2004), *Santalum insulare* (Butaud *et al.* 2005) e *Hymenaea stigonocarpa* (Ramos *et al.* 2007).

Além da significativa estruturação genética das populações de *C. americana* observou-se também um grande compartilhamento de haplótipos entre todas as populações, indicando a provável ocorrência de fluxo gênico mediado por sementes. Para outras espécies arbóreas típicas de cerrado é possível evidenciar uma forte estruturação genética com poucos haplótipos compartilhados entre as populações (Ramos *et al.* 2007; Collevatti *et al.* 2003; 2009). Essa diferença pode estar relacionada com aspectos da história de vida de cada espécie, como modos de dispersão, sistemas de cruzamento e forma de vida (Hamrick e Godt, 1996). A espécie *C. americana* destaca-se quanto à riqueza de espécies de aves que consomem seus diásporos, podendo ser considerada importante fonte de recurso para a avifauna frugívora (Oliveira, 2009).

O teste de Mantel não evidenciou relação direta entre distâncias genética e geográfica nas populações, indicando que a diversidade genética observada dentro das populações de *C. americana* não está sendo influenciada por isolamento dessas populações em função da distância geográfica euclidiana entre as mesmas.

No entanto, a diversidade genética observada dentro das populações de *C. americana* não parece estar aleatoriamente distribuída no espaço, pois padrões contrastantes foram observados nas populações amostradas, com base nos locos cpSSR. As populações localizadas na região mais central da distribuição (Campo Grande, MS (CGR); Frutal, MG (FRU)) e as localizadas mais ao norte (Surumu, RR (SUR)), apresentaram altos índices de diversidade genética, com a presença de haplótipos comuns e únicos. Em contraste, populações localizadas na região central da Amazônia como Manaus, AM (MAN) e Humaitá, AM (HUM) caracterizaram-se por apresentar baixos índices de diversidade genética, apresentando apenas os haplótipos comuns a outras regiões. Apesar das populações terem

apresentado algumas diferenças em relação à distribuição da variabilidade genética e consequentemente haplótipica, o padrão mais evidente observado foi marcado pela existência de alguns haplótipos comuns, compartilhados entre todas as populações.

Embora a estrutura genética populacional observada ao longo do espaço geográfico seja influenciada principalmente pelo fluxo gênico (mediado por sementes) em plantas, outros fatores também são importantes para determinar os padrões filogeográficos, tais como fatores biogeográficos e históricos (Walker e Avise 1998). Sendo assim, os padrões filogeográficos encontrados atualmente para *C. americana* podem estar relacionados com a dinâmica da vegetação durante o quaternário.

As análises filogeográficas aqui apresentadas indicam uma recente expansão demográfica das populações de *C. americana* localizadas tanto nos cerrados do Brasil central quanto da região Amazônica. A ampla distribuição geográfica alcançada por *C. americana* provavelmente se deva a mecanismos eficientes de dispersão de suas sementes bem como em função de condições climáticas favoráveis ocorridas no passado que permitiram a expansão da vegetação de cerrado e a consequente expansão das populações da espécie.

Análises palinológicas realizadas em áreas de cerrado do Brasil central sugerem a ocorrência de mudanças na extensão da vegetação desde os últimos 35.000 AP (Salgado-Laboriau *et al.* 1997). Tais mudanças foram marcadas por períodos com clima muito seco (19.000 AP) e redução da cobertura vegetal, seguido de períodos com condições climáticas mais amenas (7.000 AP), marcados pela expansão da vegetação de cerrado (Behling 1995; Ledru *et al.* 1998). Ao mesmo tempo, em áreas de cerrado localizadas nas regiões Norte e Nordeste também observa-se ciclos de abundância e desaparecimento de vegetação de

cerrados (Absy *et al.* 1991; Mayle *et al.* 2000). Especialmente na região Nordeste do país foi sugerido um período de extrema aridez durante o UMG, o que pode ter favorecido principalmente a ocorrência de espécies típicas de climas mais secos (Behling *et al.* 2000; Ledru *et al.* 2006). Corroborando tais inferências, Caetano *et al.* (2008), por meio de análise filogeográficas de *Astronium urundeuva* (árvore típica de floresta tropical sazonalmente seca), sugerem a expansão da espécie durante o UMG, em áreas atualmente cobertas por cerrado. Dessa maneira, como evidenciado para outras espécies típicas de cerrado (Novaes *et al.* 2010), o aumento da aridez pode ter sido extremo para a ocorrência da espécie *C. americana* em algumas áreas de cerrado durante períodos glaciais. *C. americana* pode ter sido capaz de alcançar diversas áreas de cerrado durante períodos com condições ambientais mais amenas e devido às mudanças ambientais e/ou climáticas muito severas (aridez), ocorridas em algumas áreas de cerrado, a espécie teria desaparecido. Com o retorno de condições climáticas mais amenas durante períodos mais recentes (Holoceno) (Behling *et al.* 2000), a espécie teria se expandido, recolonizando essas regiões.

Tal inferência fica mais evidente quando analisamos a estrutura filogeográfica obtida a partir da análise de rede (dados de sequências não-codificadoras). Nesta análise identifica-se a presença de um haplótipo comum (H1), em toda a área de amostragem e a existência de três haplótipos únicos, presentes nas três áreas extremas de cerrado (MG, MS, RR). O padrão genético observado provavelmente reflete um longo período de existência dessas populações mais diversas sem gargalos populacionais significativos quando comparado as outras populações menos diversas. Espera-se que regiões colonizadas depois de períodos glaciais, tenham níveis reduzidos de variação genética e grandes áreas fixadas por apenas um haplótipo (Hewitt 2000).

A estrutura genética populacional observada para *C. americana* por meio da análise dos locos cpSSR concorda com os resultados obtidos para as regiões não codificadoras do cpDNA, evidenciando maior diferenciação e diversidade genética detectada para o mesmo conjunto de populações. Dados de fósseis de pólen confirmam que as regiões onde se encontram tais populações estão em áreas que permaneceram estáveis durante períodos mais longos. Para a região central do Brasil, estudos palinológicos sugerem que durante a maior parte do Pleistoceno, o clima teria sido mais seco que o atual, mas não severamente árido (Ledru 1993), o que pode ter permitido a permanência da vegetação de cerrado por mais tempo. Já para a região norte do país (RR), análises palinológicas não detectaram nenhuma mudança na vegetação durante o Holoceno (Behling e Hooghiestra 2001).

Além disso, foi possível observar uma maior estrutura genética das populações localizadas nas áreas mais extremas dos cerrados do Brasil central e dos cerrados Amazônicos, com a presença de três filogrupos distintos, enquanto populações localizadas na parte mais central da distribuição geográfica amostrada compartilham um maior número de haplótipos, sendo caracterizada por apenas um filogrupo. Como já relatado, a dispersão de sementes de *C. americana* é realizada por várias espécies de aves (Piratelli 1999; Lopes 2005; Oliveira 2009), sendo que espécies como *Pitangus sulphuratus* e *Tyrannus melancholicus* têm populações que nidificam nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste e migram para a região Amazônica (Sick 1997), podendo auxiliar no fluxo gênico entre essas populações.

O padrão de estruturação genética das populações de *C. americana* no presente estudo é similar ao encontrado para seis espécies de aves típicas de áreas de cerrado (Bates *et al.* 2003). Os autores relatam um alto grau de similaridade genética entre populações de aves localizadas nos cerrados do Brasil central e Amazônia, sugerindo uma expansão populacional

extremamente recente das populações localizadas na área “core” dos cerrados para as áreas localizadas na região Amazônica. Para *C. americana*, também é possível sugerir que a presença de haplótipos comuns em todas as populações amostradas, reflita uma recente expansão populacional a partir de poucos haplótipos e que a espécie foi capaz de alcançar uma grande área geográfica devido a mecanismos eficientes de dispersão de seus propágulos. Tal fato, está de acordo com Vieira *et al.* (2002), os quais sugerem que espécies que apresentam sementes dispersas por aves, possuem maior sucesso na colonização de áreas distantes e/ou isoladas.

A estrutura filogeográfica descrita para *C. americana* apresenta padrões similares ao observado para outras espécies arbóreas típicas de cerrado. A similaridade genética observada entre populações localizadas nas áreas de cerrados da Amazônia e Brasil central também foi relatada para a espécie *Salvertia convallariodora* (Farias 2007). Outro padrão similar foi observado para a espécie *Platymenia reticulata*, que também evidenciou um compartilhamento de haplótipos entre populações localizadas na parte central do Brasil e uma recente expansão populacional (Novaes *et al.* 2010). Além disso, expansão populacional recente para espécies típicas de cerrado, incluindo a espécie *C. americana*, também foi sugerida por meio do estudo de modelagem climática realizado por Bonaccorso *et al.* (2006). Neste estudo os autores consideraram dois centros de modelagem (*Hardley* e *Canadian*) levando em consideração dados atuais de ocorrência das espécies, dados climáticos e informações topográficas e detectaram um aumento recente na distribuição potencial para algumas espécies. Apesar das similaridades genéticas observadas para tais espécies, padrões contrastantes foram registrados para o pequiheiro *Caryocar brasiliense* (Collevatti *et al.* 2003), e o jatobá, *Hymenaea stigonocarpa* (Ramos *et al.* 2007), os quais apresentam

subdivisão geográfica dentro de grupos geneticamente distintos entre as populações presentes na parte central do Brasil. Tais diferenças evidenciam que diferentes espécies responderam de forma diferente às mudanças climáticas ocorridas durante o quaternário na região (Bush 1994).

A subdivisão geográfica observada por meio da análise de microssatélites para *C. americana* demonstra a presença de agrupamentos entre as populações localizadas em áreas mais extremas da distribuição geográfica dos cerrados, tais agrupamentos podem estar associados a fatores climáticos e a dinâmica da vegetação que pode ter flutuado de maneira não uniforme ao longo do tempo (Behling e Hooghiemstra 2001, Gosling e Bush 2005). O agrupamento observado entre as populações de Alter do Chão, PA (ACH), Boa Vista, RR (BVI), Caracará, RR (CAA), Surumu, RR (SUR) e Amapá, AP (AMP), situadas na região mais ao norte da área geográfica amostrada, sugere que elas mantiveram-se geneticamente conectadas até um passado recente. Duas evidências podem sugerir essa conexão: 1) A existência de um corredor mais seco na parte leste da região Amazônica (Carneiro *et al.* 2002; Carneiro *et al.* 2003), que pode ter se expandido permitindo o fluxo gênico entre elas; 2) O fato das populações de Roraima e Suriname, região próxima ao Amapá, pertencerem ao mesmo sistema de savanas (Behling e Hooghiemstra 2001). As análises polínicas realizadas para as savanas localizadas na Guayana (Van der Hammen 1963), no Suriname (Wijmstra 1971) e na Guiana Francesa (Tissot e Marius 1992) evidenciam a presença de vegetação de savanas, inclusive a presença da espécie *C. americana*, durante períodos glaciais, o que pode ter permitido a conexão entre as populações dessas regiões via um corredor de vegetação de savanas.

A conexão genética observada entre as populações do Peru (PE) e Corumbiara, RO (COR), região a oeste da distribuição, pode ser corroborada por análises de sedimentos realizadas na fronteira da Bolívia com o Brasil, que registram a presença de *C. americana* e outro gênero típico de vegetação de savanas entre 11.000 e 7.000 AP (Mayle *et al.* 2000). A extensão da faixa de ocorrência da vegetação de savanas pode ter ocorrido além da fronteira entre o Brasil e a Bolívia, conectando as populações do Peru (PER) e Corumbiara, RO (COR).

Na região mais ao sul da área geográfica amostrada foi encontrado outro agrupamento formado pelas populações de Campo Grande, MS (CGR), Frutal, MG (FRU) e Pimenta Bueno, RO (PBU). O grande compartilhamento de haplótipos observados entre essas populações pode ter sido facilitado pela existência de corredores de vegetação de savanas existentes entre essas localidades, bem como o estabelecimento de rotas de dispersão entre essas populações.

De modo geral, o padrão de distribuição da variabilidade genética encontrado nas populações de *C. americana* no presente estudo sugere a influência que mudanças climáticas ocorridas durante o quaternário, associada à dispersão de sementes, tiveram sobre a estrutura genética atualmente observada nas populações desta espécie. Tais fatores sugerem a migração de indivíduos de *C. americana*, os quais colonizaram novas áreas abertas durante o UMG, desempenhando um papel chave para a manutenção da diversidade genética dentro das populações. Mesmo analisando regiões do cpDNA que possuem herança materna e em geral evidenciam melhor a estruturação genética, observou-se um grande compartilhamento de haplótipos e uma significativa estrutura genética nas populações de *C. americana*. Os resultados aqui apresentados mostram que espécies arbóreas localizadas no mesmo domínio fitogeográfico podem responder de formas diferentes a alterações ambientais ocorridas

durante o UMG em função provavelmente de diferenças em suas histórias de vida, deixando evidente que o melhor entendimento da história evolutiva dos cerrados deve estar embasado em estudos que busquem compreender a estrutura genética das populações de diversas formas de vida.

Tabela 1. Diversidade genética em populações de *C. americana* da Amazônia e Brasil Central com base na análise de duas regiões não-codificadoras do cpDNA (*psbC-trnS* e intron *TrnL*) e oito locos de cpSSR.

Localidade/Estado	Abbr	País	Lat.	Long.	<i>N</i> *	<i>Nh</i> *	π *	<i>H</i> *	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>Nh</i>	<i>He</i>
Campo Grande, MS	CGR	Brasil	20°26'39.89''S	54°38'51.93''O	6	2	0.000564	0.6	15	13	7	0.8762 (0.0516)
Frutal, MG	FRU	Brasil	20°01'19.16''S	48°55'09.99''O	6	2	0.000502	0.53	12	14	8	0.9242 (0.0575)
Pires Belo, GO	PBE	Brasil	18°00'13.81''S	47°28'46.03''O	6	1	0	0	6	10	3	0.6000 (0.2152)
Monsenhor Gil, PI	MON	Brasil	53°34'01.26''S	42°37'08.03''O	6	1	0	0	11	10	3	0.4727 (0.1617)
Alter do Chão, PA	ACH	Brasil	2°31'16.97''S	54°57'32.33''O	6	1	0	0	9	12	5	0.8611 (0.0872)
Amapá, AP	AMP	Brasil	5°26'36.11''S	60°34'43.22''O	6	1	0	0	9	12	3	0.5556 (0.1653)
Barra Bugres, MT	BBU	Brasil	15°13'41.79''S	56°53'16.17''O	6	1	0	0	14	11	5	0.7582 (0.0841)
Boa Vista, RR	BVI	Brasil	2°49'15.40''N	60°40'16.94''O	6	1	0	0	11	12	5	0.8364 (0.0800)
Canarana, MT	CAN	Brasil	13°32'22.12''S	52°09'50.66''O	6	1	0	0	15	14	9	0.8857 (0.0686)
Caracaraí, RR	CAA	Brasil	1°49'13.27''N	61°07'58.37''O	6	1	0	0	13	10	3	0.5641 (0.1117)
Carolina, MA	CAR	Brasil	7°20'11.55''S	47°27'49.97''O	6	1	0	0	9	10	3	0.6667 (0.1318)
Corumbiara, RO	COR	Brasil	12°57'06.27''S	60°48'26.60''O	6	1	0	0	21	12	5	0.4238 (0.1305)
Costa Marques, RO	CMA	Brasil	12°24'56.14''S	64°13'17.84''O	6	1	0	0	11	12	6	0.8727 (0.0707)
Humaitá, AM	HUM	Brasil	8°18'28.59''S	72°02'06.20''O	6	1	0	0	18	10	3	0.2157 (0.1241)
Manaus, AM	MAN	Brasil	3°06'05.70''S	60°01'21.23''O	6	1	0	0	19	11	3	0.2047 (0.1191)
Pimenta Bueno, RO	PBU	Brasil	11°40'25.95''S	61°11'34.54''O	6	1	0	0	15	11	5	0.8190 (0.0600)
Redenção, PA	RED	Brasil	8°02'46.64''S	50°01'11.85''O	6	1	0	0	9	12	5	0.8056 (0.1196)
Serra Araras, MT	SAR	Brasil	15°41'55.81''S	54°05'00.87''O	6	1	0	0	13	13	7	0.8846 (0.0641)
Surumu, RR	SUR	Brasil	4°18'42.72''N	60°42'09.42''O	4	2	0.000470	0.5	5	12	5	1.000 (0.1265)
Caseara, TO	CAS	Brasil	11°24'55.63''S	48°43'07.19''O	6	1	0	0	12	11	2	0.1667 (0.1343)
Peru	PER	Peru	11°94'626''S	75°20'105''O	6	1	0	0	20	11	3	0.6526 (0.0648)
Venezuela	VEM	Venezuela	6°21'19.40''N	66°34'55.51''O	6	1	0	0	9	10	4	0.7778 (0.1100)

N- número de indivíduos amostrados; *Nh*- número de haplótipos; π - diversidade nucleotídica; *H*- diversidade genética; *A*- número de alelos; *He*- índices de diversidade gênica.

* refere-se aos dados obtidos para as duas regiões não-codificadoras do cpDNA.

Tabela 2. Haplótipos encontrados em 22 populações de *C. americana* com base na análise de oito locos de cpSSR. N = nº de indivíduos. . CGR- Campo Grande, MS; FRU- Frutal, MG; PBE- PiresBelo, GO; MON- Monsenhor Gil, PI; ACH- Alter do Chão, PA; AMP- Amapá, AP; BBU- Barra Bugres, MT; BVI- Boa Vista, RR; CAN- Canarana, MT; CAA- Caracaraí, RR; CAR- Carolina, MA; COR- Corumbiara, RO; CMA- Costa Marques, RO; HUM- Humaitá, AM; MAN- Manaus, AM; PBU- Pimenta Bueno, RO; RED- Redenção, PA; SAR- Serra Araras, MT; SUR- Surumu, RR; CAS- Caseara, TO; PER- Peru; VEN- Venezuela.

Haplótipo	ccmp2	ccmp3	ccmp4	ccmp5	ccmp6	ccmp7	ccmp10	Emc74	População	N
1	218	112	116	87	96	129	100	128	CAR,SAR,BBU,SUR,BVI,VEM,HUM, ACH,MAN,CMA	19
2	218	112	116	87	96	129	100	129	CAR,MON,SAR,CMA,BBU,CAN,PBE,CGR,FRU,BVI,VEM,COR,CAA,HU M,MAN	83
3	218	112	115	87	96	129	100	129	CAR,CAN	3
4	218	112	116	87	96	129	99	129	MON,SAR,CAN,ACH,PBU,CGR,FRU,BVI,COR,CAA,HUM, CAS,CMA,SUR,MAN	50
5	218	112	116	87	96	129	98	129	MON,SAR,CAN	3
6	219	112	116	87	96	129	100	128	AMP,RED,SAR,BBU,CAN,PBE,CAS	22
7	219	112	116	87	96	129	99	128	PBU,CGR	2
8	219	112	116	87	96	129	98	128	FRU	1
9	219	112	116	87	96	129	100	129	RED,SAR,CMA,BBU,CAN,PBE,PBU,FRU	13
10	219	112	116	87	97	129	100	129	RED,CMA	2
11	219	112	116	87	97	129	98	128	RED	1
12	218	112	116	87	97	129	100	128	SAR,RED	2
13	219	112	116	87	96	129	99	129	CMA,PBU,CGR,FRU	10
14	219	112	114	87	96	129	100	129	BBU	1
15	218	112	115	87	96	129	100	128	CAN	2
16	218	112	115	87	96	129	99	129	CAN	2
17	218	112	115	87	96	129	100	127	CAN	1
18	218	112	116	85	96	129	100	129	ACH,SUR,BVI,CAA	8
19	219	112	116	85	96	129	99	129	AMP,ACH,BVI	5
20	218	112	116	85	96	129	99	129	ACH,SUR	3
21	218	112	116	87	96	129	99	128	PBU,CGR,FRU	5
22	218	112	116	85	96	129	98	128	CGR	2
23	219	112	116	85	96	129	98	128	CGR	1
24	218	112	116	85	96	129	100	128	AMP	1
25	218	112	116	84	96	129	99	129	FRU	1
26	218	113	116	87	96	128	99	129	FRU	1
27	218	112	116	86	96	129	100	128	SUR	1
28	218	112	116	87	95	129	100	129	VEM	4
29	218	112	116	87	95	129	99	129	PER	10
30	218	112	116	87	95	129	100	128	VEM	2
31	218	112	117	87	96	129	100	129	PER,COR	7
32	218	112	117	87	95	129	99	129	PER	4
33	217	112	116	87	96	129	100	129	COR	2
34	218	113	116	87	96	129	100	129	COR	1

Tabela 3. Distribuição da variabilidade genética em 22 populações de *C. americana*, com base na análise de variância molecular (AMOVA) em duas regiões não-codificadoras de cpDNA (*psbC-trnS* e intron *trnL*) e oito locos de cpSSR.

Fonte da variação	df	Soma dos quadrados	Componentes variantes	% da variação
Microssatélites- Único grupo				
Entre as populações	21	80.23	0.25 Va	30.61
Dentro das populações	254	149.18	0.58 Vb	69.39
Total	275	229.42	0.84	
Microssatélites- Quatro grupos				
Entre as populações	3	25.562	0.1594	17.82
Dentro das populações	272	199.0	0.7344	82.18
Total	275	225	0.89	
Regiões não-codificadoras- Único grupo				
Entre as populações	21	2.309	0.013 Va	28.14
Dentro das populações	108	3.583	0.033 Vb	71.86
Total	129	5.892	0.0461	
Regiões não-codificadoras- Quatro grupos				
Entre as populações	3	0.266	0.0019 Va	14.17
Dentro das populações	126	5.627	0.0446Vb	85.83
Total	129	5.89	0.0466	

Tabela 5. Estimativas de expansão populacional com base em dados demográficos e genéticos para populações de *C. americana* utilizando os testes de neutralidade D (Tajima, 1989) e FS (Fu, 1997). $P < 0.05$ e $*P < 0.01$. As análises foram realizadas de três formas distintas (1) considerando um grupo com todas as populações, (2) a partir dos filogrupos identificados pelo SAMOVA (3) considerando os cerrados localizados no Brasil central, região amazônica, Peru e Venezuela em grupos separados

Parâmetros	Todas as populações	Filogrupo 1 (SAMOVA)	Filogrupo 2 (SAMOVA)	Cerrado (Brasil central)	Cerrado (Amazônia)	Cerrado (Peru)	Cerrado (Venezuela)
Tamanho amostral	130	124	6	36	82	6	6
Número de populações	22	21	1	6	14	1	1
Número de sítios variáveis	3	2	1	2	1	0	0
Número de haplótipos	4	3	2	3	2	1	1
Diversidade haplotípica	0.09	0.047	0.6	0.255	0.02	0	0
Diversidade nucleotídica	0.000086	0.000045	0.00056	0.000249	0.000023	0	0
Teste D de Tajima	-1.430	-1.286	1.445	-0.87	-1.049	-	-
Teste Fs de Fu	-4.421*	-3.600*	0.795	-1.02	-2.05	-	-

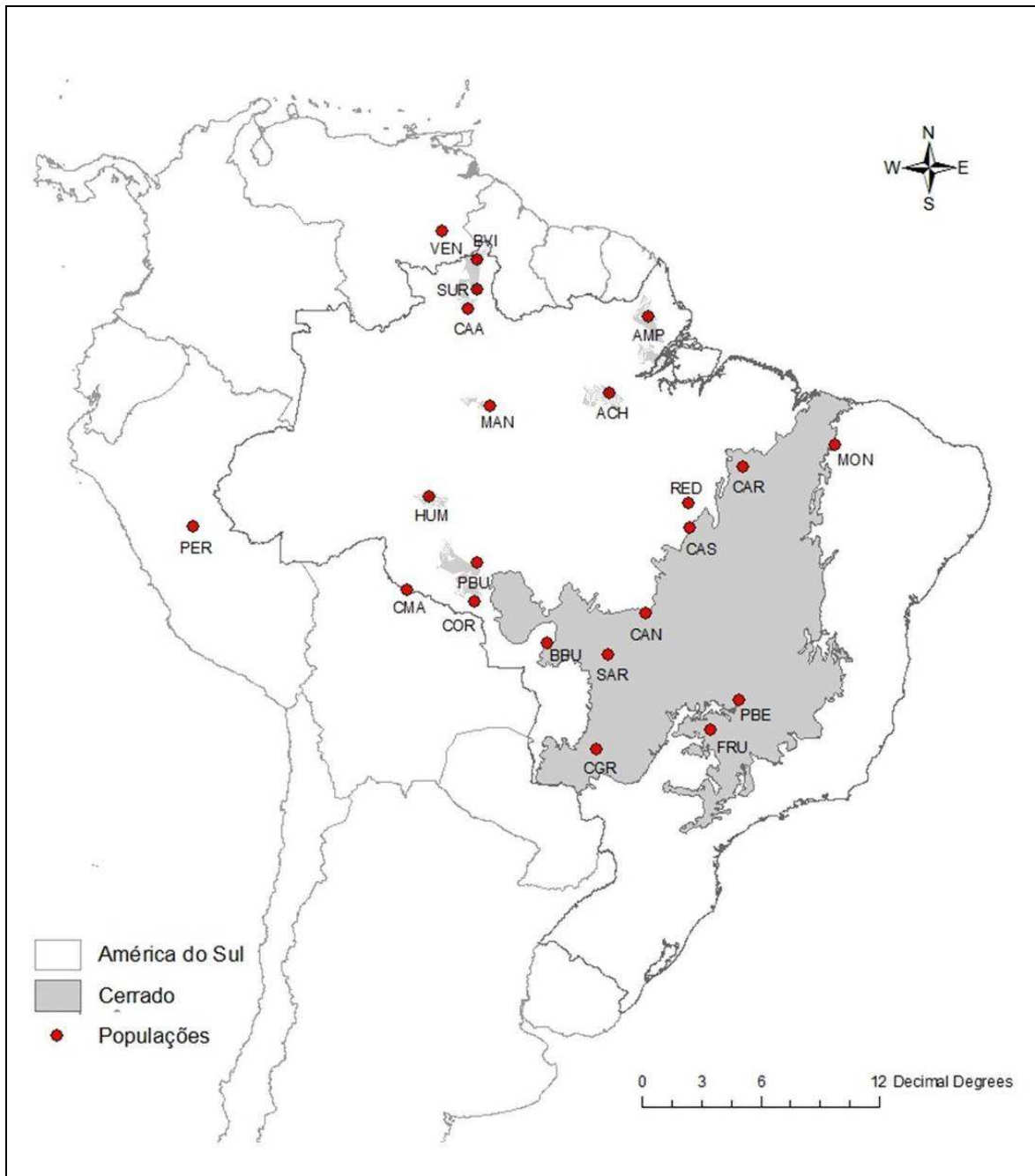


Figura 1. Locais de coleta das populações de *C. americana*. CGR- Campo Grande, MS; FRU- Frutal, MG; PBE- Pires Belo, GO; MON- Monsenhor Gil, PI; ACH- Alter do Chão, PA; AMP- Amapá, AP; BBU- Barra Bugres, MT; BVI- Boa Vista, RR; CAN- Canarana, MT; CAA- Caracaraí, RR; CAR- Carolina, MA; COR- Corumbiara, RO; CMA- Costa Marques, RO; HUM- Humaitá, AM; MAN- Manaus, AM; PBU- Pimenta Bueno, RO; RED- Redenção, PA; SAR- Serra Araras, MT; SUR- Surumu, RR; CAS- Caseara, TO; PER- Peru; VEN- Venezuela.

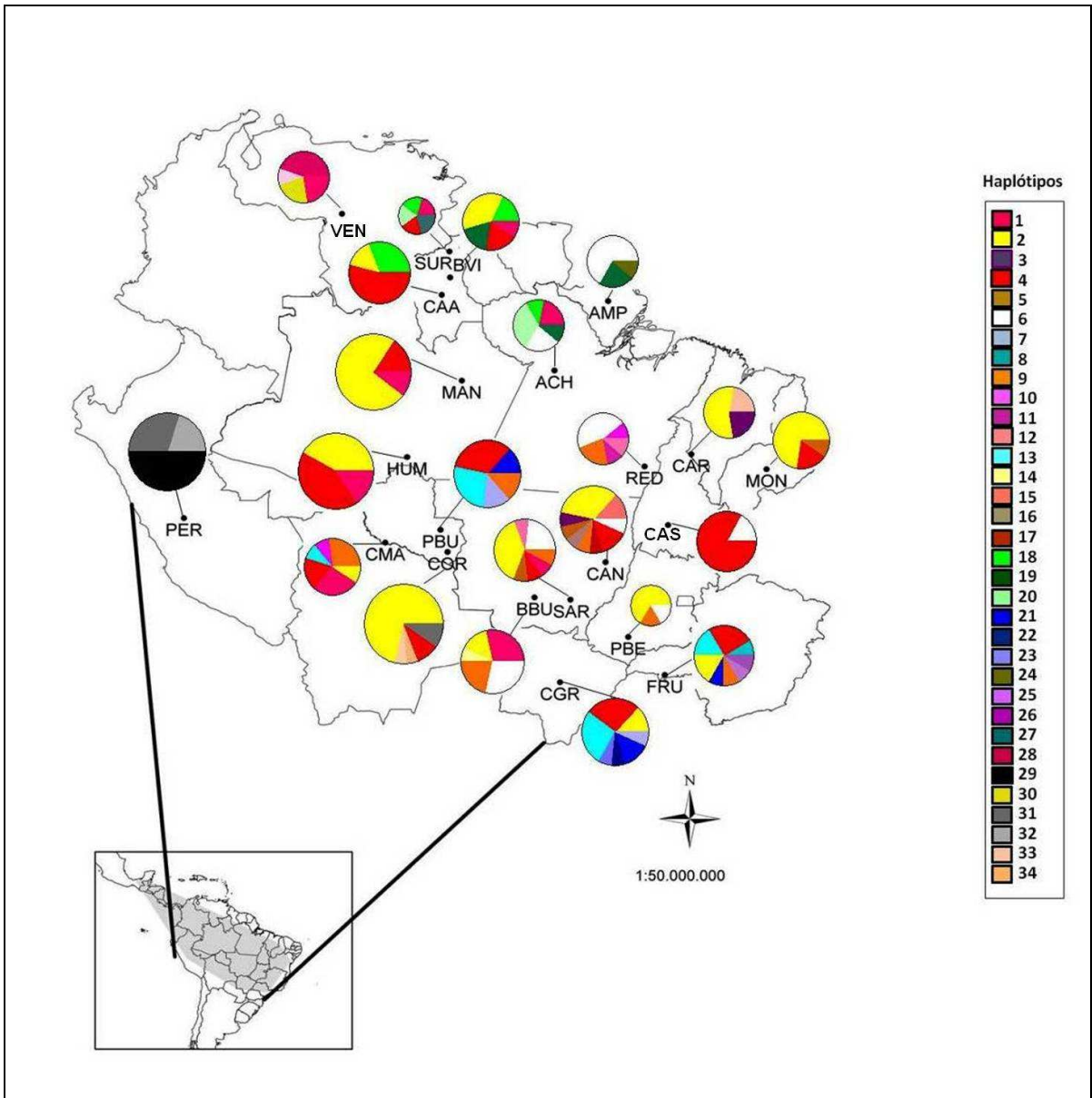


Figura 2. Distribuição geográfica dos haplótipos observados em 22 populações de *C. americana* com base na análise de oito locos de cpSSR. Os tamanhos dos círculos são proporcionais ao tamanho amostral e cada cor representa um haplótipo conforme legenda ao lado. O mapa menor mostra a área de distribuição de *C. americana* na América Latina segundo dados de ocorrência da espécie fornecidos pelo CRIA (Centro de Referência de Informação Ambiental, São Paulo, SP) e MOBOT (*Missouri Botanical Garden*, USA).

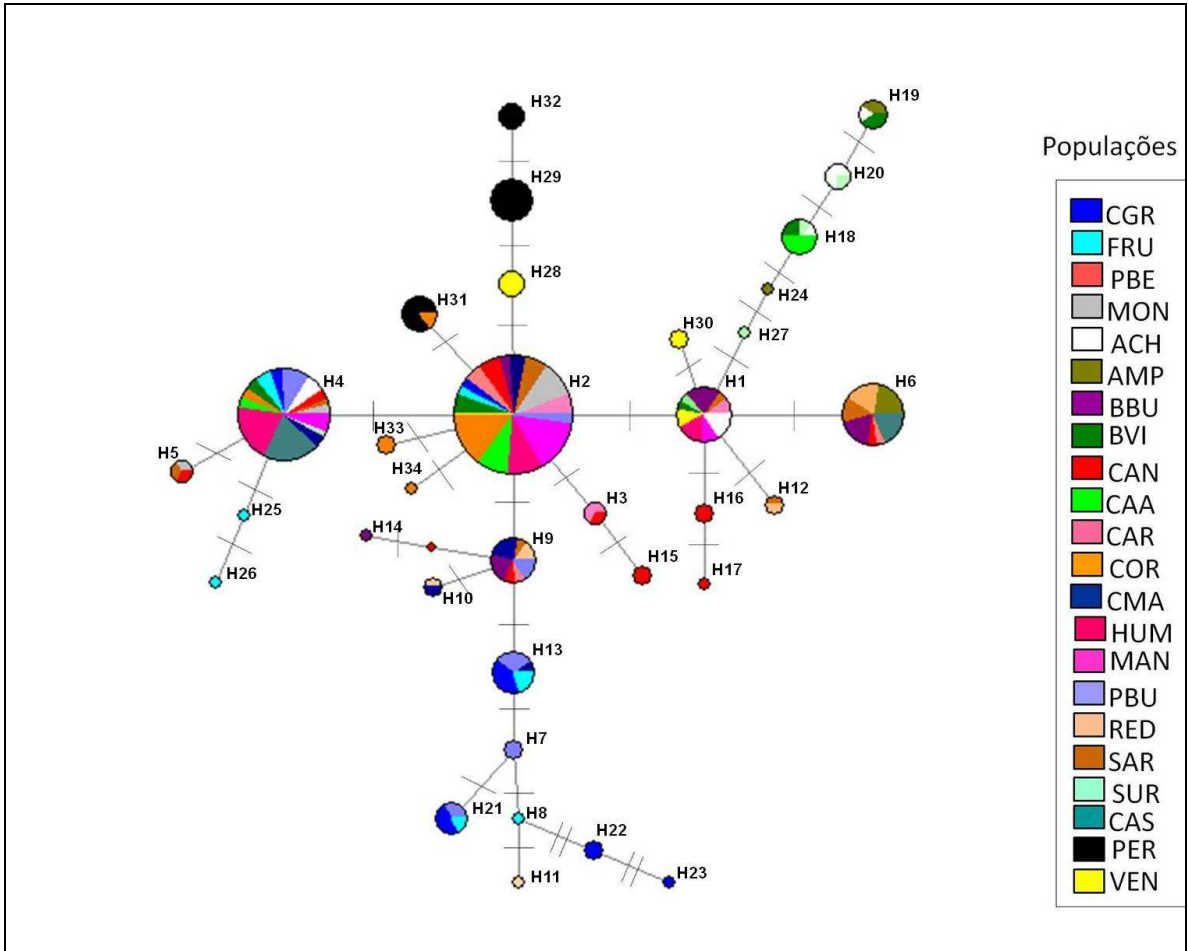


Figura 3. Relações entre haplótipos inferida a partir da análise *Median-Joining* implementada pelo programa *Network*, com base na análise de oito locos de cpSSR de *C. americana*. Cada círculo corresponde a um haplótipo e sua área é proporcional à frequência do haplótipo. Cada traço observado nas linhas que unem os haplótipos representa um evento mutacional. O ponto mv representa um haplótipo hipotético (*median vector*). As cores representam as populações, conforme legenda ao lado.

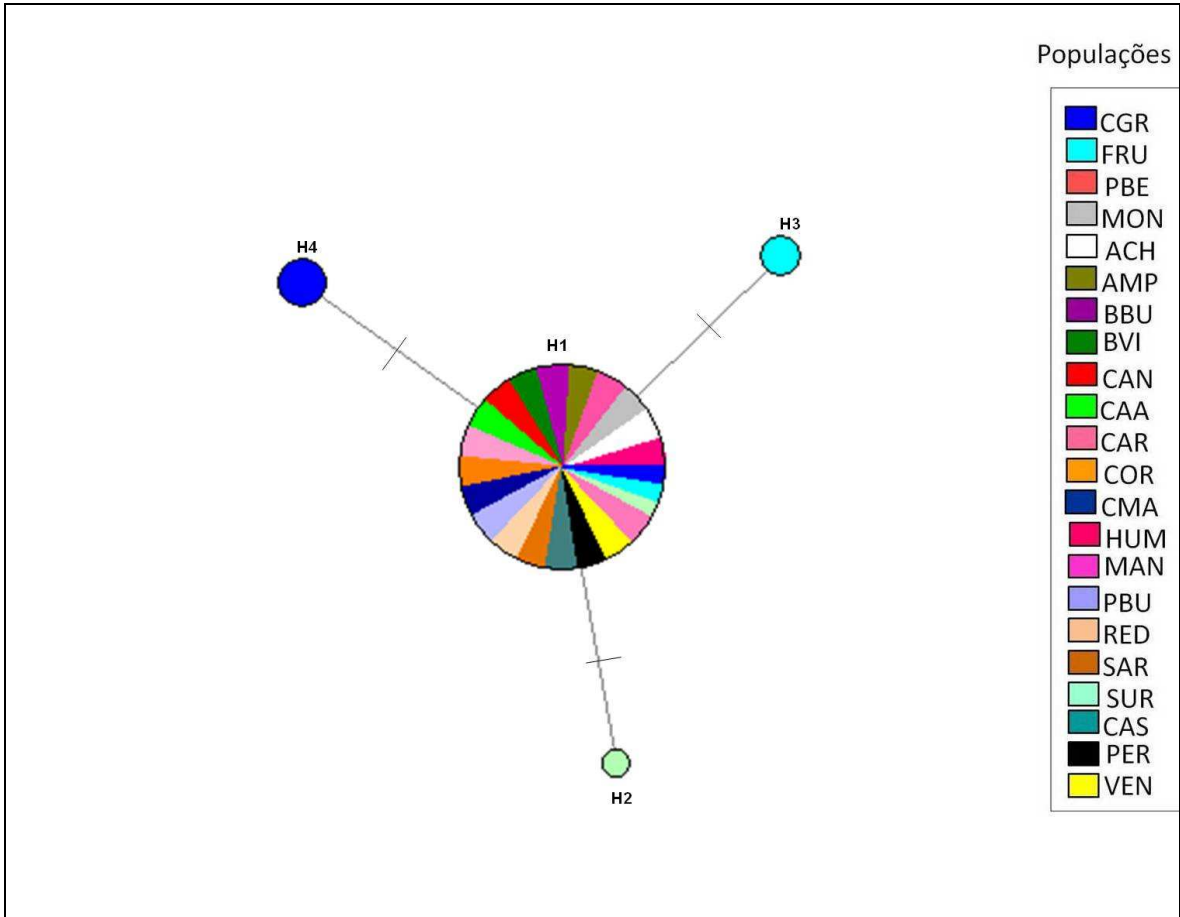


Figura 4. Relações entre haplótipos inferida a partir de análise *Median-Joining* implementada pelo programa *Network*, com base na análise de duas regiões não codificadoras (*psbC-trnS* e *intron trnL*) do *cpDNA* de *C. americana*. Cada círculo representa um haplótipo e a área do círculo é proporcional à frequência do haplótipo. Cada traço representa um passo mutação. Cada cor representa uma população conforme legenda ao lado.

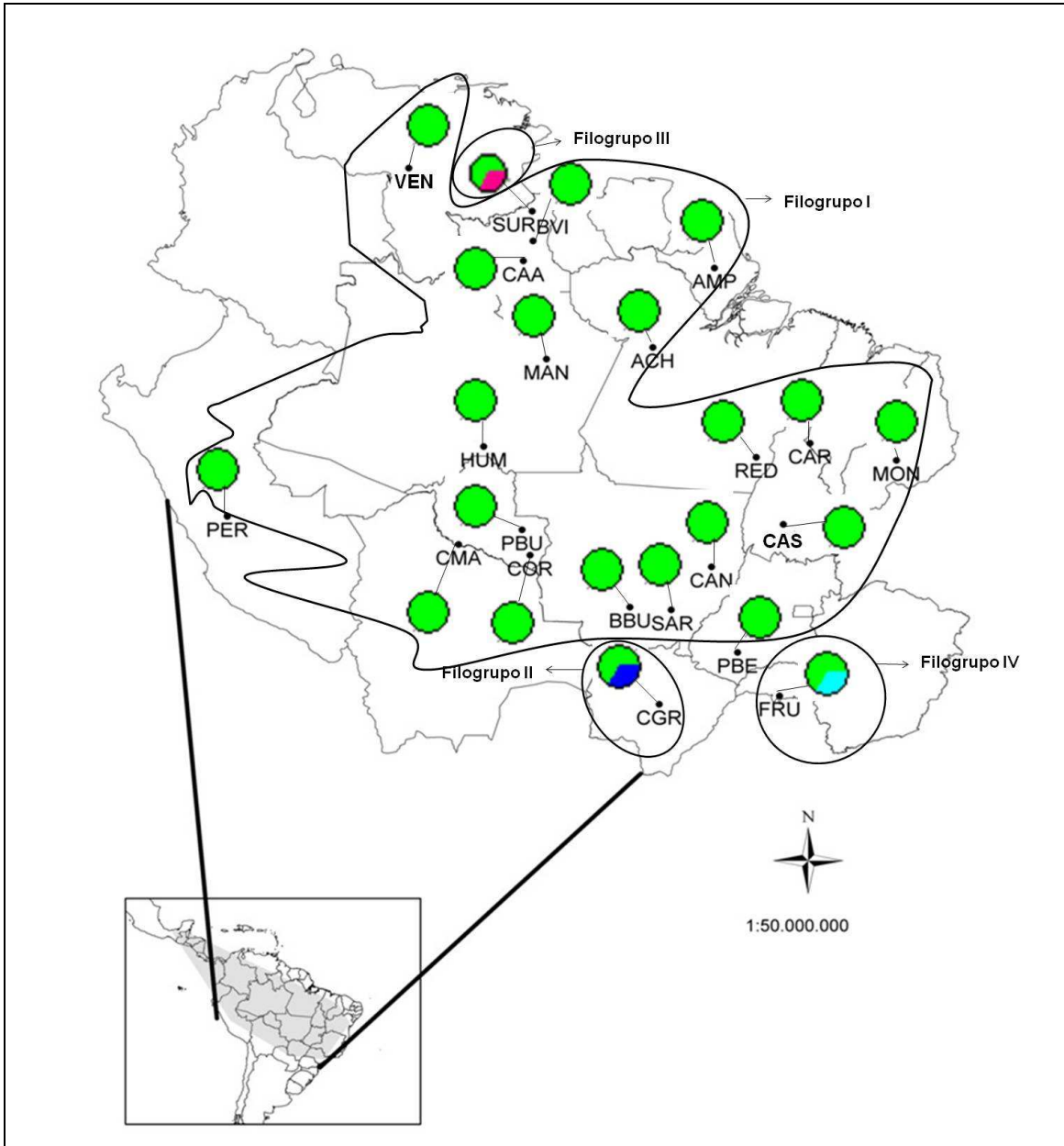


Figura 5. Representação dos quatro filogrupos de *C. americana* segundo análise da SAMOVA. Cada círculo indica um filogrupo distinto.

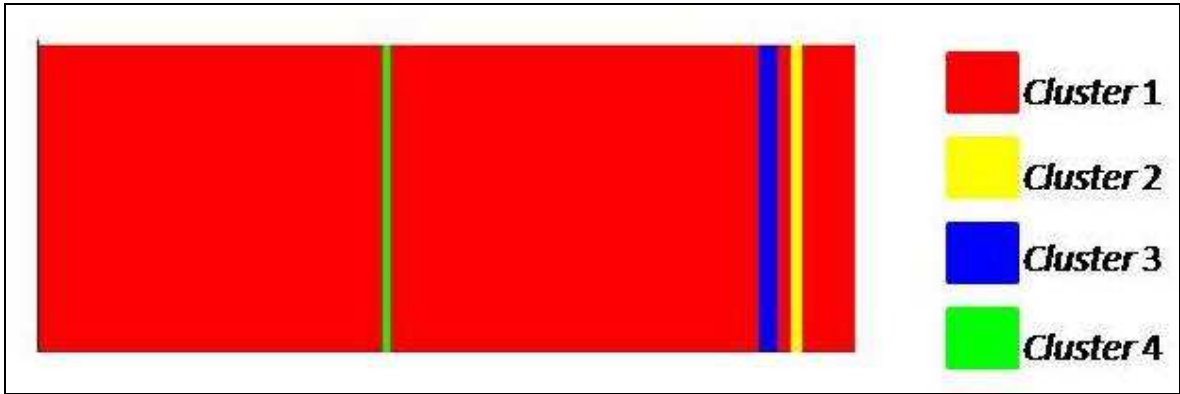


Figura 6. Agrupamentos populacionais de *C. americana* inferidos por meio de análise bayesiana implementada pelo programa BAPS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Absy, M.L.; Cleef, A.M.; Fournier, M.; Martin, L.; Servant, M.; Sifeddine, A.; Silva, M.F.; Soubies, F.; Suguio, K.; Turcq, B.; Van der Hammen, T. 1991. Mise en évidence de quatre phases d'ouverture de la forêt dense dans le sud-est de l'Amazonie au cours or dès 60,000 dernières années. Première comparaison avec d'autres régions tropicales. *Comptes Rendus Academie dês Sciences, Paris, Série II*, 312: 673-678.
- Adrianoelina, O.; Rakotondraoelina, H.; Ramamonjisoa, L.; Maley, J.; Danthu, P.; Bouvet, J-M. 2006. Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae) an endangered tree species in the fragmented oriental forest of Madagascar. *Biodiversity and Conservation*, 15: 1109-1128.
- Avice, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3-15.
- Bandelt, H.J.; Forster, P.; Rohl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.
- Battes, J.M.; Tello, J.G.; da Silva, J.M.C. 2003. Initial assessment of genetic diversity in tem BIRD species of South American cerrado. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 3: 87-94.
- Behling, H. 1995. A high resolution Holocene pollen record from Lago do Pires, SE Brazil: vegetation, climate and fire history. *Journal of Paleolimnology*, 14: 253-268.
- Behling, H. 1998. Late Quaternary vegetational and climatic changes in Brazil. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 99: 143-156.
- Behling, H.; Hooghiemstra, H. 2001. Neotropical savanna environments in space and time: Late quaternary interhemispheric Comparations. *In: Markgraf, V. (Ed). Interhemispheric Climate Linkages*, Capítulo 18. Academic pres, p. 307-323.

- Birky, C.W. 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 11331-11338.
- Bonaccorso, E.; Koch, I.; Peterson, A.T. 2006. Pleistocene fragmentation of Amazon species ranges. *Biodiversity Research*, 12: 157-164.
- Boss, R.L. 2009. *Variações espaciais e temporais em comunidades de aves de uma savana amazônica no estado do Amapá*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Amapá, Amapá. 85pp.
- Butaud, J.F.; Rives, F.; Verhaegen, D.; Bouvet, J.M. 2005. Phylogeography of Eastern Polynesian sandalwood (*Santalum insulare*), an endangered tree species from the Pacific: a study based on chloroplast microsatellites. *Journal of Biogeography*, 32: 1763-1774.
- Caetano, S.; Prado, D.; Pennington, R.T. 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.
- Carneiro, A.F. 1993. Cerrados Amazônicos: Fósseis vivos? Algumas reflexões. *Revista IG*, 14: 63-68.
- Carneiro, A.F.; Schwartz, D.; Tatumi, S.H.; Rosique, T. 2002. Amazonian paleodunes provide evidence for drier climate phases during the late Pleistocene-Holocene. *Quaternary Research*, 58: 205-209.
- Carneiro, A.F.; Tatumi, S. H.; Yee, M. 2003. Dunas fósseis na Amazônia. *Ciência Hoje*, 191: 24-29.
- Cavers, S.; Navarro, C.; Lowe, A.J. 2003. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Molecular Ecology*, 12: 1451-1460.

- Clegg, M.T. 1993. Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 363-367.
- Clegg, M.T.; Gaut, B.S.; Learn, G.H.; Morton, B.R. 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 6795-6801.
- Collevatti, R.G.; Grattapaglia, D.; Hay, J.D. 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, R.G.; Rabelo, S.G.; Vieira, R.F. 2009. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), in endangered cerrado shrub species. *Annals of Botany*, 104: 655-664.
- Corander, J.; Waldmann, P.; Sillanpaa, M.J. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163: 367-374.
- Cubas, P.; Pardo, C.; Tahiri, H. 2005. Genetic variation and relationships among *Ulex* (Fabaceae) species in southern Spain and northern Morocco assessed by chloroplast microsatellite (cpSSR) markers. *American Journal of Botany*, 92: 2031-2043.
- Degen, B.; Bandou, E.; Caron, H. 2004. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. *Heredity*, 93: 55-591.
- Demesure, B.; Sodzi, N.; Petit, R.J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, 4: 129-131.
- Dick, C.W.; Bermingham, E.; Lemes, M.R.; Gribel, R. 2007. Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* L. (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. *Molecular Ecology*, 16: 3039-3049.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.

- Dupanloup, S.I.; Schneider, S.; Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11: 2571-2581.
- Eiten, G. 1972. The Cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review*, 38: 201-345.
- Eiten G. 1982. Brazilian 'Savannas'. In: Huntley, B.J.; Walker, B.H. (Eds). *Ecology of tropical savannas*. Ecological Studies. Berlin-Heidelberg, Germany: Springer. p. 25-47.
- Ennos, R.A.; Sinclair, W.T.; Hu, X-S.; Langdon, A. 1999. Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In: Hollingsworth, P.M.; Bateman, R.M.; Gornall, R. J. (Eds). *Molecular Systematics and Plant Evolution*. The Systematics Association Special. London, Taylor, Francis. p.1-19.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics*, 131: 479-491.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinform Online*, 1: 47-50.
- Farias, G.S. 2006. *Variabilidade genética em populações de Salvertia convallariodora (Vochysiaceae) com base na análise de microssatélites do genoma do cloroplasto: uma abordagem filogeográfica*. Monografia, Universidade federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 49pp.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3 edição. Brasília (EMBRAPA-CENARGEN). 222pp.
- Foldats, E.; Rutkis, E. 1975. Ecological studies of chaparro (*Curatella americana* L.) and manteco (*Byrsonima crassifolia* H.B.K.) in Venezuela. *Journal of Biogeography*, 2: 159-178.

- Fontaine, C.; Lovett, P.N.; Sanou, H.; Maley, J.; Bouvet, J.M. 2004. Genetic diversity of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn.), detected by RAPD and chloroplast microsatellite markers. *Heredity*, 93: 639-648.
- Forster, P.; Bandelt, H.J.; Rohl, A. 2000. *NETWORK 3.1.1.0*. (www.fluxus-engineering.com). Acesso 20/06/2010. Fu, Y-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 1447: 915-925.
- Goldstein, G.; Sarmiento, G.; Meinzer, F. 1986. Daily and seasonal patterns of water relations in evergreen tropical savannas trees. *Acta Oecological*, 7: 107-119.
- Goldstein, D.B.; Pollock, D.D. 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity*, 88: 335-342.
- Golemberg, E.M.; Clegg, M.T.; Durbin, M.L.; Doebley, J.; Pow Mass, D. 1993. Evolution of a noncoding region of the chloroplast genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2: 52-64.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hammen, V.D.T. 1963. A palynological study on the Quaternary of British Guyana. *Lidse Geologische Mededelingen*, 29: 726-168.
- Hammen, V.D.T.; Absy, M.L. 1994. Amazonia during the last glacial. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 109: 247-261.
- Hamilton, M.B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, 8: 521-523.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the quaternary ices ages. *Nature*, 405:907-913.
- Hutchinson, J. 1964. *The genera of flowering plants*. Volume 1. Clarendon, Oxford.

- Ledru, M.L. 1993. Late quaternary environmental and climatic changes in central Brazil. *Quaternary Research*, 39: 90-98.
- Ledru, M.P.; Soares-Braga, P.I.; Soubiès, F.; Fourniet, M.; Martin, L.; Suguio, K.; Turcq, B. 1996. The last 50,000 years in the neotropics (southern Brazil): Evolution of vegetation and climate. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 123: 239-257.
- Ledru, M.P.; Salgado-Labouriau, M.L.; Lorscheitter, M.L. 1998. Vegetation dynamics in southern and central Brazil during the last 10,000 yr B.P. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 99: 131-142.
- Lemes, M.R.; Dick, C.; Navarro, C.; Lowe, A.; Cavers, S.; Gribel, R. 2010. Chloroplast DNA microsatellites reveal contrasting phylogeographic structure in mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) from Amazonia and Central America. *Tropical Plant Biology*, 3: 40-49.
- Lopes, L.E. 2005. Dieta e comportamento de forrageamento de *Suiriri affinis* e *S. islerorum* (Aves, Tyrannidae) em um cerrado do Brasil central. *Iheringia, Série Zoológica*, 95: 341-345.
- Li, Y. C.; Korol, A. B.; Fahima, T.; Beiles, A.; Nevo, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453-2465.
- Lian, C.; Oishi, R.; Miyashita, N.; Nara, K.; Nakaya, H.; Wu, B.; Zhou, Z.; Hogetsu, T. 2003. Genetic structure and reproduction dynamics of *Salix reinii* during primary succession on Mount Fuji, as revealed by nuclear and chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 12: 609-618.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220

- Mayle, F.E.; Burbridge, R.; Killen, T.J. 2000. Millennial-scale dynamics of southern Amazonian rain forest. *Science*, 290: 2291-2294.
- McCauley, D.E. 1995. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of genes flow in plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 5: 198-202.
- Melo, J.T.; Silva, J.A.; Torres, R.A.A.; Silveira, C.E.S.; Caldas, L.S. 1998. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do Cerrado. In: Sano, S.M.; Almeida, S. P. (Eds). *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. p. 319-342.
- Mengoni, A.; Barabesi, C.; Gonnelli, C.; Galardi, F.; Gabbrielli, R.; Bazzicalupo, M. 2001. Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 10: 1909-1916.
- Morgante, M.; Olivieri, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3: 175-182.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, New York, USA.
- Nevill, P.J.; Bossinger, G.; Ades, P.K. 2010. Phylogeography of the world's tallest angiosperm, *Eucalyptus regnans*: evidence for multiple isolated quaternary refugia. *Journal of Biogeography*, 37: 179-172.
- Novaes, R.M.L.; Lemos-Filho, J.P.; Ribeiro, R.A.; Lovato, M.A. 2010. Phylogeography of *Plathymentia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology*, 19: 985-998.
- Oliveira, A.P. 2009. *Frutificação e frugivoria por aves em remanescente de cerrado Mato Grosso do Sul, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Brasil. 69 pp.

- Palmé, A.E.; Vendramin, G.G. 2002. Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. *Molecular Ecology*, 11: 1769-1780.
- Pereira, I.M.; Gomes-Klein, V.L. 2007. Taxonomia e ecologia da família Dilleniaceae nos Estados de Goiás e Tocantins. *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 975-977.
- Petit, R.J.; Duminil, J.; Fineschi, S.; Hampe, A.; Salvini, D.; Vendramin, G.G. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, 14: 689-701.
- Piratelli, A.J. 1999. *Comunidades de Aves de sub-bosque na Região leste de Mato grosso do sul*. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biologia, Rio Claro, São Paulo. 139 pp.
- Powell, W.; Morgante, M.; McDevitt, R.; Vendramin, G.G.; Rafalski, J.A. 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes - applications to the population-genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 7759-7763.
- Provan, J.; Powell, W.; Hollingsworth, P.M. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 142-147.
- Ramos, A.C.S.; Lemos-Filho, J.P.; Ribeiro, R.A.; Santos, F.R.; Lovato, M.B. 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, A.C.S.; Lemos-Filho, J.P.; Lovato, M.B. 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, J. A.; Bridgewater, S.; Atkinson, R.; Ribeiro, J. F. 1996. Analysis of the floristic composition of the cerrado vegetation II: Composition of the woody vegetation of 98 areas. *Edinburgh Journal of Botany*, 53: 153-180.
- Ratter, J. R.; Ribeiro, J. F.; Bridgewater, S. 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*, 80: 223-230.
- Ribeiro, R.A.; Lemes-Filho, J.P.; Ramos, A.C.S.; Lovato, M.B. 2010. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, 1-12.
- Salgado-Labouriau, M.L.; Casseti, V.; Ferraz-Vicentini, K.R.; Martins, L.; Soubies, F.; Suguio, K.; Turcq, B. 1997. Late Quaternary vegetational and climatic change since in cerrado and palm swamp from central Brazil. *Paleogeography Paleoclimatology, Palaeocology*, 128: 215-226.
- Sanaiotti, T.M. 1996. *The woody flora and soils of seven Brazilian Amazonian dry savanna areas*. PhD. Thesis University of Stirling, Stirling, UK.
- Shaw, J.; Lickey, E.B.; Beck, J.T. 2005. The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92: 142-166.
- Shaw, J.; Lickey, E.B.; Schilling, E.E.; Small, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetics studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94: 275-288.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. 2 ed. Editora Nova Fronteira. Rio de Janeiro, Brasil. 921pp.
- Schneider, S.; Excoffier, L. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152: 1079-1089.

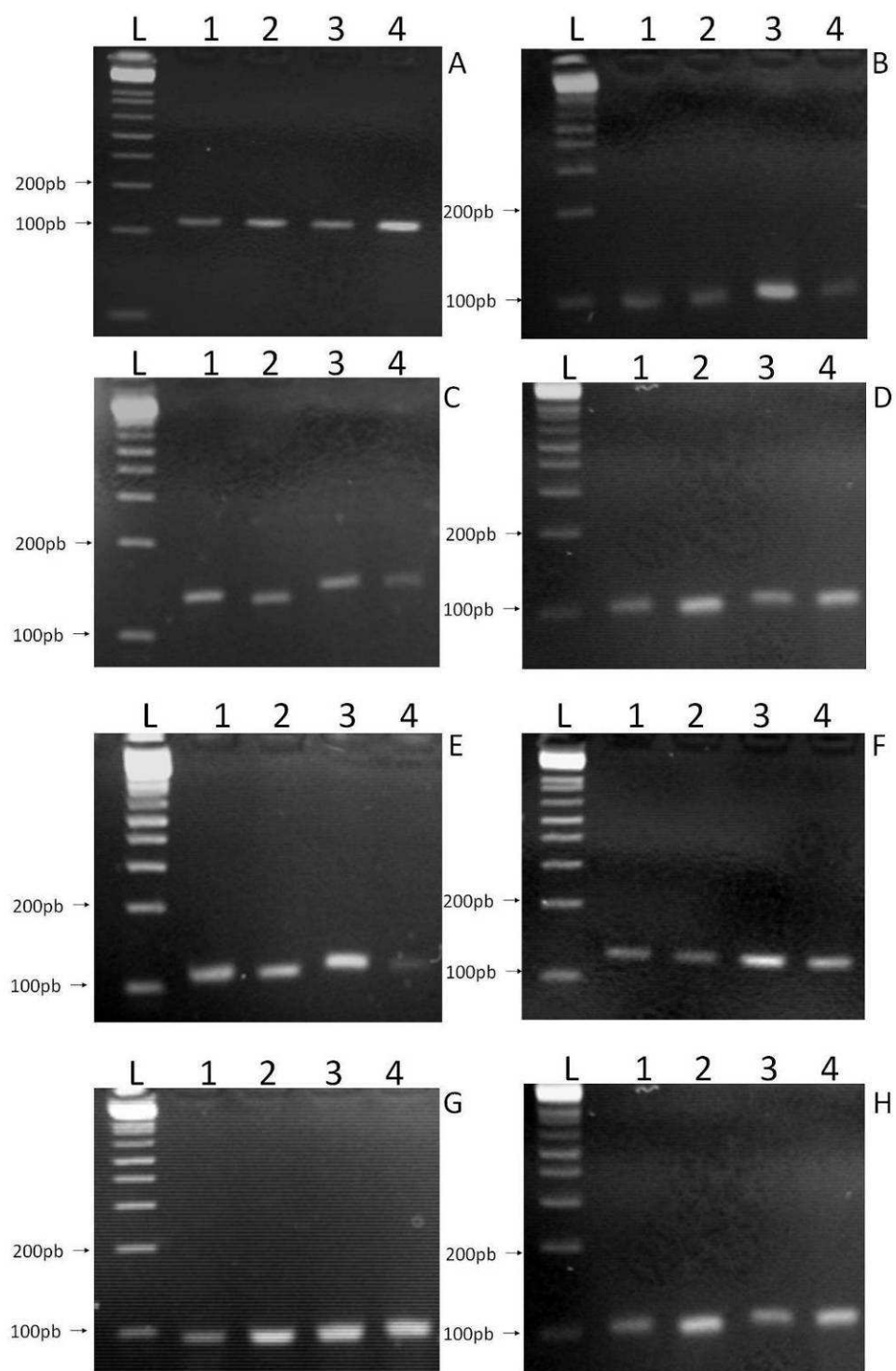
- Steane, D.A.; Jones, R.C.; Vaillancourt, R.E. 2005. A set of chloroplast microsatellite primers for *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Molecular Ecology Notes*, 5: 538-541.
- Taberlet, P.; Gielly, L.; Pautou, G.; Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17: 1105-1109.
- Tajima, F. 1989. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Terrab, A.; Paun, O.; Talavera, S.; Tremetsberger, K.; Arista, M.; Stuessy, T.F. 2006. Genetic diversity and population structure in natural populations of Moroccan Atlas cedar (*Cedrus atlantica*: Pinaceae) determined with cpSSR markers. *American Journal of Botany*, 93: 1274-1280.
- Tissot, C.; Djuwansah, M.R.; Marius, C. 1988. Evolution de la mangrove en Guyane au cours de l'Holocène Etude palynologique. *Inst. Fr. Pondichéry*, 125-137.
- Vendramin, B.; Degen, B.; Petit, R.J.; Anzidei, M.; Madaghiele, A.; Ziegenhagen, B. 1999. High level of variation at *Abies alba* chloroplast microsatellite loci in Europe. *Molecular Ecology*, 8: 1117-1126.
- Vieira, D.L.M.; Aquino, F.G.; Brito, M.A.; Fernandes-Bulhão, C.; Henriques, R.P.B. 2002. Síndromes de dispersão de espécies arbustivo-arbóreas em cerrado sensu stricto do Brasil Central e savanas amazônicas. *Revista Brasileira de Botânica*, 25: 215-220.
- Walker, D.; Avise, J.C. 1998. Principles of phylogeography as illustrated by freshwater and terrestrial turtles in the southeastern united states. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29:23-58.
- Weising, K.; Gardner, R.C. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, 42: 9-19.

- Wijmstra, T.A. 1971. *The palynology of the Guiana coastal basin*. Dissertação da Universidade de Amsterdam, 63pp.
- Wills, D.M.; Burke, J.M. 2006. Chloroplast DNA variation confirms a single origin of domesticated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Heredity*, 97: 403-408.
- Wolfe, K.H.; Li, W.H.; Sharp, P.M. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84: 9054-9058.

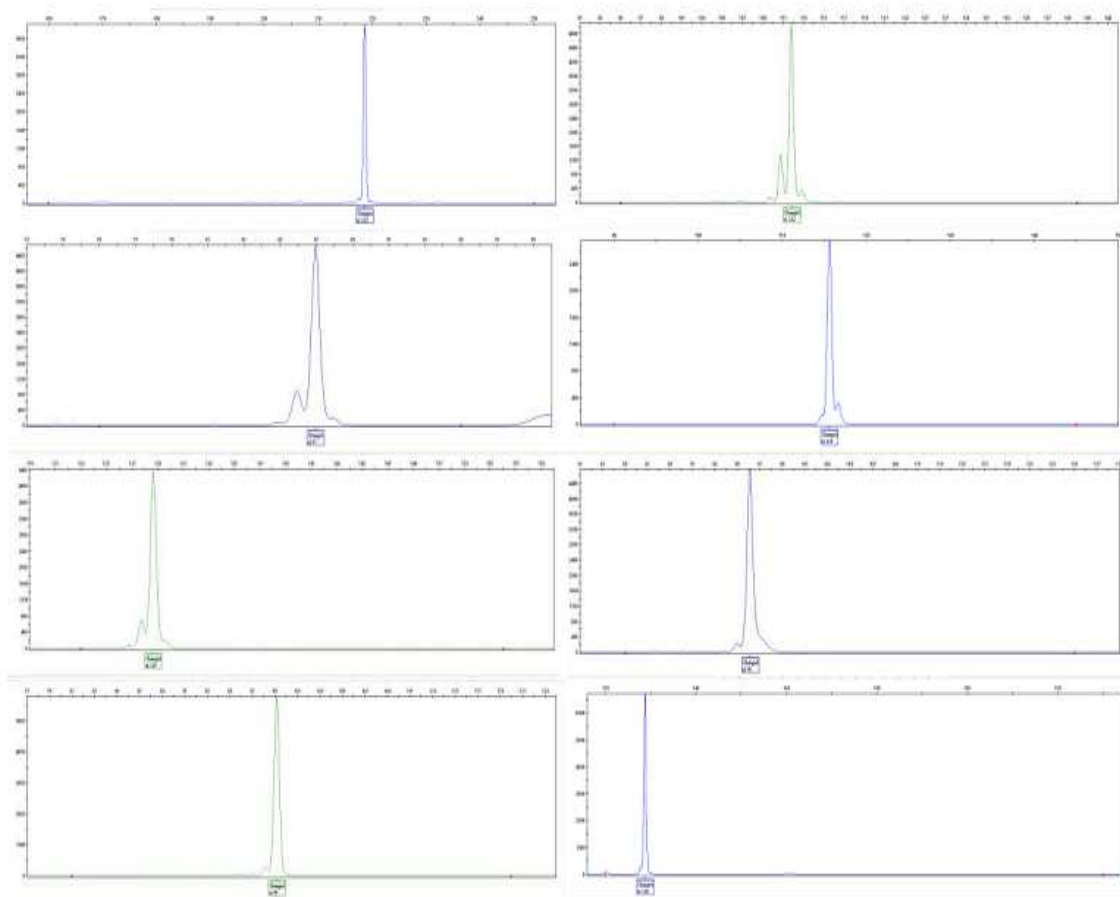
CONCLUSÕES

- 1) O estudo revelou que as populações de *C. americana* localizadas nos cerrados do Brasil central e Amazônia apresentam alta diversidade genética intrapopulacional.
- 2) A estrutura genética populacional evidenciada por ambos marcadores do genoma do cloroplasto (regiões não codificadoras e microssatélites) demonstrou diferenciação genética moderada entre as populações de *C. americana*, evidenciando a ocorrência de fluxo gênico entre as populações.
- 3) Observou-se um compartilhamento significativo de haplótipos entre as populações analisadas, também para as duas classes de marcadores utilizados. A ocorrência de haplótipos comuns presentes na maioria das populações de *C. americana* sugere uma recente expansão populacional da espécie, corroborada por meio de testes de neutralidade.
- 4) As relações entre os haplótipos e o compartilhamento de haplótipos entre as duas regiões geográficas amostradas (Brasil central e Amazônia), sugerem a ocorrência de episódios de expansão dinâmica da vegetação do cerrado, ocasionados provavelmente por mudanças climáticas ocorridas no passado recente (Quaternário). Estudos acerca dos padrões filogeográficos em outras espécies arbóreas do cerrado podem auxiliar no melhor entendimento da biogeografia histórica do bioma cerrado.
- 5) A estrutura genética observada atualmente nas populações de *C. americana* evidencia a possível influência que eventos históricos e fluxo gênico a longas distâncias provavelmente tiveram na distribuição da variabilidade genética nas populações desta espécie.

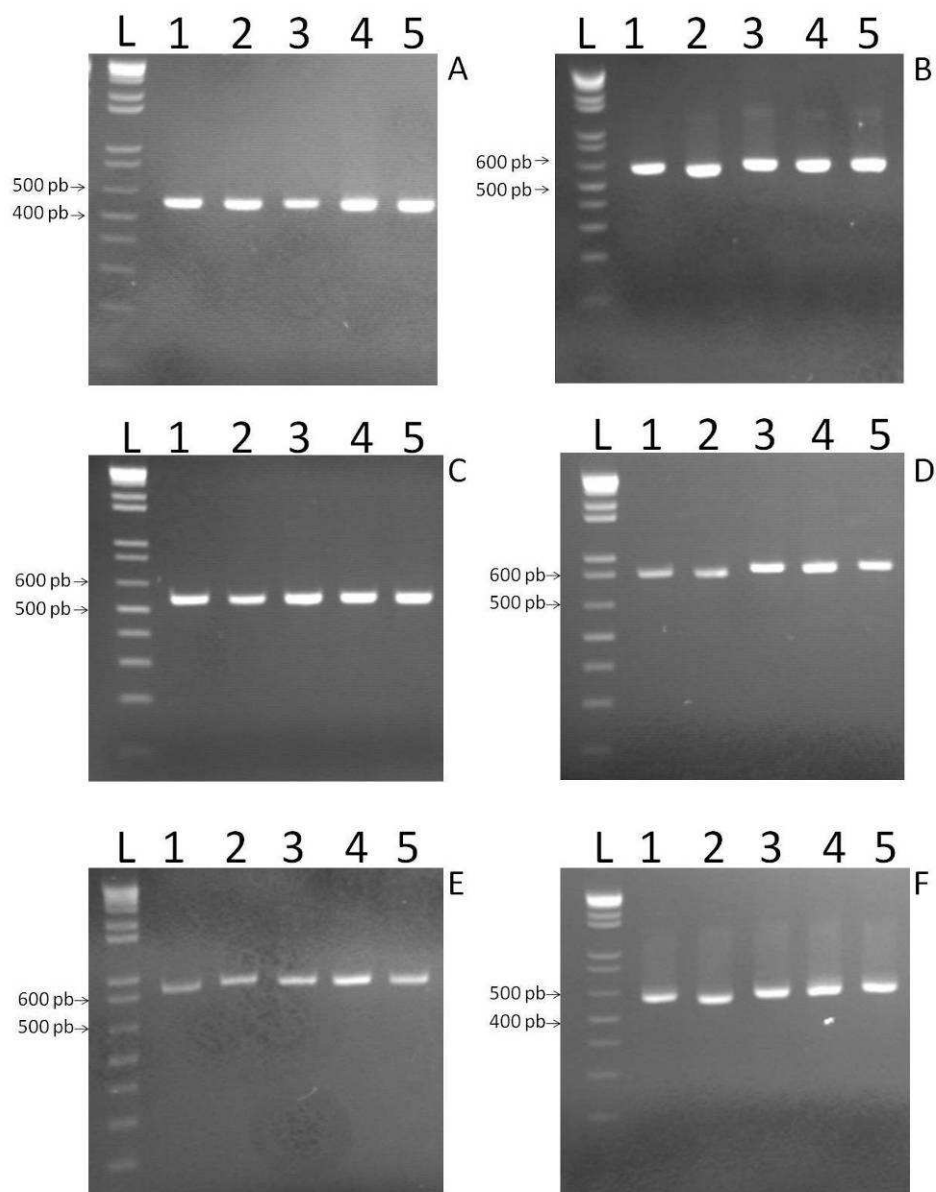
ANEXO I. Produtos amplificados referente a oito locos de cpSSR de *C. americana*, visualizados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, e visualizados sob luz ultravioleta. A primeira canaleta do gel refere-se marcador padrão *ladder* 1 Kb *plus*.



ANEXO II. Eletroferogramas mostrando a estimativa do tamanho de alelos amplificados para oito loci cpSSR de *C. americana*. A) ccmp2, B) ccmp3, C) ccmp4, D) ccmp5, E) ccmp6, F) ccmp7, G) ccmp10 e H) emcrc74.



ANEXO III. Produtos amplificados referente a seis regiões não-codificadoras de cpDNA de *C. americana*, visualizados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, e visualizados sob luz ultravioleta. A primeira canaleta do gel refere-se marcador padrão *ladder 1 Kb plus*.



ANEXO IV. Eletroferogramas mostrando parte da sequência nucleotídica referente a região do *intron trnL* para dois indivíduos de *C. americana*. A parte grifada indica uma substituição do tipo transição (A-C).

