ROBERTA DOS SANTOS SILVA

FILOGENIA E FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DE *Anadenanthera* SPEG. LEGUMINOSAE (MIMOSOIDEAE)

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S586f
2010

Silva, Roberta dos Santos, 1978-
Filogenia e filogeografia molecular de *Anadenanthera* Speg. Leguminosae (Mimosadeae) / Roberta dos Santos Silva. – Viçosa, MG, 2010.
xii, 64f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Luiz Orlando de Olveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 54-64.

1. *Anadenanthera peregrina* - Distribuição geográfica.
2. *Anadenanthera colubrina* - Distribuição geográfica.
3. Filogeografia. 4. Filogenia. 5. Evolução molecular.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 583.748

ROBERTA DOS SANTOS SILVA

FILOGENIA E FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DE *Anadenanthera* SPEG. LEGUMINOSAE (MIMOSOIDEAE)

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

APROVADA: 10 de dezembro de 2010.

Profª. Flavia Cristina Pinto Garcia
(Co-orientadora)

Prof. Agostinho Lopes de Souza

Prof.ª Andreza Viana Neri

Prof. ª Ana Aparecida Bandini Rossi

Prof. Luiz Orlando de Oliveira
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa por ter me acolhido e tornado possível mais essa etapa de qualificação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro nas coletas.

Ao meu orientador, prof. Dr. Luiz Orlando de Oliveira, pela orientação e ensinamentos ao longo desses anos.

Aos meus co-orientadores, profª Dra.Flávia Cristina Pinto Garcia e prof. Dr. João Augusto Alves Meira Neto, pela colaboração.

Aos professores do programa de pós-graduação em Botânica, por contribuírem com a minha formação.

Aos funcionários do Bioagro, do Herbário VIC e do Departamento de Biologia Vegetal (DBV), pelo auxílio operacional, principalmente ao Ângelo, sempre bem humorado e disposto a ajudar.

Ao Instituto Estadual de Florestas (IEF) de MG e ao Instituto Ambiental do Paraná (IAP), pelas permissões de coletas.

Aos Herbários da EMBRAPA/CENARGEN (CEN), do IBGE/Brasília, da UNB (UB) e da EMBRAPA Gado de Corte (HMS), pela consulta aos materiais depositados e pela permissão de coleta para extração de DNA, em

especial ao Dr. Marcelo Simon, Marina de Lourdes Fonseca Resende, Dra. Cássia Munhoz e Vali Joana Potti.

Aos especialistas Dra. Flávia C. P. Garcia e José Martins Fernandes pela identificação do material botânico.

Aos amigos Christina e Tom pelo Abstract.

A todos aqueles que colaboraram com as coletas de material: Abel Teixeira, Ana A.B. Rossi (UNEMAT), Audálio Rodrigues de Mello (UNEMAT), Braz Cosenza (UEMG), Christopher William Fagg (UNB), Cristiane Santos Pereira, Daniel Meira Arruda (UFV), Dennis Rodrigues da Silva (UNEMAT), Domingos Cardoso (UEFS), Eliziane Maria da Conceição, Ernane R. Martins (UFMG), Fabio Jesus Quintiliano, Fernando Moraes (UNESP), Giliard Lima, Joseph W. Veldman (IBIF), Lorena Cintra (UFG), Luciene Vieira de Arruda (UEPB), Maria Antonia Carniello (UNEMAT), Marina Neves Delgado, Natalia C. Venancio (JBMB), Osvaldo Rossi, Ramiro G.V. Camacho (UERN), Rosania Maura Martins e Silva, Rúbia Santos Fonseca (UFV), Temilze Gomes Duarte, Thiago dos Santos Coser e Wesley Jonathan Cruz.

Ao amigo José Martins, pelas coletas, pela disposição em me ajudar sempre que foi necessário.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Paula, Ana Rossi, Bruna, Camila, Carol, Cassiana, Christina, Denise, Flávia, Larissa, Leonardo, Lídia, Lílian, Lucas, Maíra, Márcia, Mariana Bicalho, Mariana Cardoso, Michellia, Beatriz, Maria Andréia, Pricila, Rafaella, Roméria, Saulo, Talles, Valquíria e Wiliane pelo apoio e agradável convivência, em especial a Magali, minha “irmã científica”, pelo companheirismo e disposição em ajudar a qualquer

hora desde o princípio, começamos juntas, terminamos esta etapa quase juntas!

A família Oliveira, D. Terezinha, Sr Zelito e Cris, minha primeira "família" em Viçosa. Me lembrarei sempre com carinho de vocês.

Aos bons amigos que Viçosa me presenteou, Andreia, Alexandre, Claudio, Cleber, Dayana, Elaine, Érica, Flávia, Glauco, João, Josi Rossine, Juliana, Laura, Malu, Marina, Michellia, Rafael, Thiago e Silvana, vocês são muito especiais!

Às amigas Andréa Miyasaka, Bia, Day, Maria Andréia e Vanessinha, com quem dividi muito mais que uma casa. Obrigada pelo apoio de todas as horas, pela amizade, companheirismo, e pela convivência mais que agradável, em especial a Bia e Maria Andreia pela convivência de quase 24hs diárias e incentivo constante: "não há de ser nada, nós vamos romper!!!" Sentirei muita saudade, lembrarei sempre com carinho de vocês...

Ao Emerson, quem eu não esperava encontrar, mas agradeço sempre por ter me encontrado, você tornou meus dias em Viçosa mais felizes, obrigada pelo carinho constante e por tornar os momentos mais difíceis parecerem mais leves...

À Maria Antonia, sempre disposta a ajudar, pelo incentivo constante, pelos ensinamentos que vão além da vida profissional, por me mostrar que sempre vale à pena cultivar boas amizades, obrigada por estar sempre presente.

Aos amigos Acácio, Cleide, Josiane, Josélia, Marilsa, Izenir, Elianys e Rosangela, amigos de longa data! Vocês me mostram que o tempo e a distância não fazem diferença...

À família Mahy Rodrigues, Dr. Antonio, Sandra, Lorena e Larissa, obrigada por estarem sempre torcendo por mim!

À família Carniello que sempre me apoiaram, em especial a D. Antonia, pelas orações e por todo carinho com que sempre me recebeu, serei eternamente grata a vocês!

À minha família, Irene e Neuber meus pais amados, minhas irmãs Renata e Poliana e meu tio/irmão Ethiene, com quem sei que poderei sempre contar, ao meu sobrinho que está chegando e será também muito amado. Obrigada pelo apoio incondicional, por estarem sempre comigo, amo muito vocês...

Ao meu querido tio Gil, de quem lembro sempre com saudade e sei que está sempre torcendo por mim, obrigada por sempre me apoiar quando precisei!

Ao Ademar e ao Alexandre, vocês também são da família, obrigada pela torcida!

À Deus, por estar sempre comigo, e me abençoar com o dom da vida e permitir que tantas pessoas especiais estivessem no meu caminho e me ajudassem a chegar aqui, e entender que não é o fim, estamos sempre recomeçando.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

ROBERTA DOS SANTOS SILVA, filha de Neuber Fernandes da Silva e Irene dos Santos Silva, nasceu na cidade de Rio Branco, Mato Grosso, em 20 de junho de 1978.

Concluiu o ensino fundamental em 1991, na Escola Estadual Francisco Eduardo Rangel Torres em Rio Branco-MT e o ensino médio na mesma instituição em 1994.

Graduou-se no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado de Mato Grosso em março de 2002.

Em março de 2004, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Botânica, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se aos exames finais de defesa de dissertação para obtenção do título de *Magister Scientiae*, em 21 de abril de 2006.

Em maio de 2006, iniciou o curso de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Botânica na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 10 de dezembro de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO ix

ABSTRACT xi

INTRODUÇÃO 1

MATERIAIS E MÉTODOS 7

Estratégia de Amostragem 7

Identificação das variedades e extração de DNA 8

Amplificação por reação da polimerase em cadeia (PCR) e sequenciamento 9

Análise filogenética 19

Análise filogeográfica 20

Índices de diversidade nucleotídica 24

Estimativa das redes de haplótipos 24

RESULTADOS 25

Análise Filogenética 25

Análise Filogeográfica 30

Distribuição geográfica dos haplótipos 31

Distribuição dos haplótipos em relação às variedades de *Anadenanthera* 36

Diversidade genética 37
DISCUSSÃO 41
Atual circunscrição do gênero *Anadenanthera* 41
Linhagens divergentes para *Anadenanthera* 44
Evidências de expansão recente 45
Baixa diversidade genética na região do Chiquitano X Alta diversidade genética na região Atlântica 45
Conexões entre a região do Chiquitano e o Nordeste da região Atlântica: evidências de fluxo gênico histórico e recente 48
Possível “padrão diagonal” para fluxo gênico entre espécies de *Anadenanthera* 50
CONSIDERAÇÕES FINAIS 53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

RESUMO

SILVA, Roberta dos Santos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2010. **Filogenia e filogeografia molecular de *Anadenanthera* Speg. Leguminosae (Mimosoideae).** Orientador: Luiz Orlando de Oliveira. Co-orientadores: Flávia Cristina Pinto Garcia e João Augusto Alves Meira Neto.

Florestas Estacionais são formações vegetais caracterizadas por dupla estacionalidade climática e encontram-se distribuídas de forma disjunta pela América do Sul. O estudo dos elementos florísticos característicos dessas áreas é de grande importância para conhecer as ligações históricas entre esses fragmentos. Espécies de *Anadenanthera* Speg. ocorrem em toda área de distribuição das Florestas Estacionais, e *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul foi indicada por alguns autores como espécie modelo para estudo da história evolutiva dessas florestas. *Anadenanthera* é um pequeno gênero arbóreo pertencente a tribo Mimoseae (Leguminosae –Mimosoideae). Esse gênero atualmente é circunscrito como duas espécies com duas variedades cada uma: *A. colubrina* (Vell.) Brenan var. *colubrina, A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul, *A. peregrina* (L.) Speg. var. *peregrina* e *A. peregrina* var. *falcata* (Benthan) Altschul, mas já foram consideradas como quatro espécies distintas. Nesse trabalho, foram utilizadas sequências da região do ITS (Internal Transcribed Spacer) do rDNA para o estudo da filogenia e filogeografia do gênero *Anadenanthera*. Os resultados revelaram a monofilia dos espécimes de *Anadenanthera colubrina* var. *colubrina*, mas não confirma a monofila das demais variedades. A diversidade genética de *Anadenanthera* foi desigualmente distribuída, sendo maior para as populações da região Atlântica, que foi considerada o centro de diversidade do gênero. Os resultados sugerem uma ligação pretérita entre as florestas da região do Chiquitano e o nordeste da

região Atlântica. A estrutura filogeográfica também sugere a colonização por diferentes refúgios e eventos de expansão rápida e recente para *Anadenanthera*.

ABSTRACT

SILVA, Roberta dos Santos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2010. **Molecular phylogeny and phylogeography of *Anadenanthera* Speg. Leguminosae (Mimosoideae).** Adviser: Luiz Orlando de Oliveira. Co-advisers: Flávia Cristina Pinto Garcia and João Augusto Alves Meira Neto.

Seasonal Forests are characterized by two seasons and are distributed in a disjointed manner across South America. The study of floristic elements that are characteristic of these areas is of great importance to our understanding of the historical connections between these fragments. *Anadenanthera* Speg. occurs within regions that contain Seasonal Forests, and *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul has been indicated by some authors as a model species for studying the evolutionary history of these forests. *Anadenanthera* is a small genus of trees belonging to the tribe Mimoseae (Leguminosae-Mimosoideae). This genus is now circumscribed as two species with two varieties each: *A. colubrina* (Vell.) Brenan var. *colubrina*, *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul, *A. peregrina* (L.) Speg. var. *peregrina* and *A. peregrina* var. *falcata* (Bentham) Altschul, though they are regarded as four distinct species. In this study, we used sequences from the ITS region (Internal Transcribed Spacer) rDNA to study the phylogeny and phylogeography of the *Anadenanthera* genus. The results revealed the monophyly of *Anadenanthera colubrina* var. *colubrina*, but did not confirm the monophyly of the other varieties. The genetic diversity of *Anadenanthera* was unevenly distributed, being higher for the populations of the Atlantic region, which was considered the center of diversity of the genus. The results suggest a link between the forests of the Chiquitano region and the Northeast Atlantic region. The phylogeographic structure also suggests colonization of

different refuges and of rapid and recent expansion events for *Anadenanthera*.

1. INTRODUÇÃO

As Florestas Estacionais são formações florestais que apresentam distribuição fragmentada ocupando regiões que apresentam dupla estacionalidade bastante marcada: um período chuvoso e quente; e outro com secas prolongadas e baixas temperaturas (Rizzini 1963; Veloso *et al.* 1991).

Veloso *et al.* (1991) dividem as Florestas Estacionais em Semidecídua e Decídua de acordo com a porcentagem de indivíduos arbóreos que perdem suas folhas nos períodos desfavoráveis. Nas Florestas Estacionais Semidecíduas, ocorre queda de folhas em 20 a 50% dos componentes, enquanto nas Florestas Estacionais Decíduas a queda das folhas é observada em mais de 50% dos componentes.

No Brasil, as florestas classificadas como estacionais decíduas ou semidecíduas encontram-se distribuídas de forma fragmentada e disjunta no território nacional (Veloso *et al.*1991) e abrangem as regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste do país (Veloso 1992).

Vários estudos sugerem que as Florestas Estacionais Tropicais passaram por expansões e contrações devido a alterações climáticas ocorridas durante o Quaternário (Ledru 1993; Mayle 2004; Carnaval *et al.* 2009).

A distribuição disjunta das Florestas Estacionais Tropicais é explicada por duas principais teorias: a primeira, conhecida como “Arco Pleistocênico”, proposta por Prado e Gibbs (1993) postula que a distribuição fragmentada dessas florestas observada atualmente constituem relíquias, formadas por eventos vicariantes, de uma vegetação contínua que cobria a América do Sul durante o Pleistoceno. A segunda teoria propõe que a atual disjunção dessas florestas seja resultado da migração e dispersão à longa distância. Dessa forma, florestas secas, restritas a algumas regiões, se espalharam durante o último Máximo Glacial e Holoceno e foram migrando, via dispersão a longa distância, em direção às áreas que elas ocupam atualmente, sendo a atual disjunção explicada pela similaridade em exigências climáticas e edáficas das espécies que ocorrem nesse tipo de floresta (Auler *et al.* 2004; Mayle 2004).

O estudo de alguns elementos florísticos característicos dessas áreas é de grande importância para se conhecer e entender as ligações históricas entre esses fragmentos, bem como os processos de dispersão ocorridos entre eles. Conhecendo os padrões de distribuição da diversidade genética é possível reconhecer áreas com maior diversidade e auxiliar no desenvolvimento de propostas para áreas prioritárias de conservação.

A fragmentação natural é, historicamente, importante na geração de diversidade biológica (Constantino *et al.* 2003), mas atualmente as Florestas Estacionais Tropicais correm o risco de desaparecer, devido à fragmentação provocada pela grande pressão antrópica a que estão sujeitas (fogo, extrativismo, expansão de fronteiras agrícolas e aquecimento global, por exemplo).

De acordo com Miles *et al.* (2006) já foram destruídas aproximadamente 60% dessas florestas na América Latina. E somente 14% dos estudos sobre Florestas Tropicais foram realizados em Florestas Estacionais (Sánchez-Azofeifa *et al.* 2005).

Várias espécies vegetais não relacionadas são citadas na literatura como espécies características de Florestas Estacionais. Entre elas, as espécies de *Anadenanthera* Speg., que apresentam ocorrência dominante ou frequente na maioria das Florestas Estacionais da América do Sul, e zonas de transição entre Florestas Estacionais e vegetações adjacentes. *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul foi considerada por Prado e Gibbs (1993) como uma espécie modelo a ser estudada, por ocorrer em toda a área correspondente ao "Arco Pleistocênico".

O gênero *Anadenanthera* Speg. *sensu* Altschul (1964), conhecido popularmente no Brasil como angico, é um gênero arbóreo da tribo Mimoseae, subfamilia Mimosoideae, família Leguminosae (Polhill *et al.* 1981; Luckow *et al.* 2003).

Este gênero neotropical está distribuído nas Grandes Antilhas e por todo o Norte da América do Sul, no Peru, Bolívia, Argentina e Paraguai (Altschul 1964; Lewis *et al.* 2005). No Brasil há registros da ocorrência de angicos por diversos Estados em áreas de Florestas Estacionais Decíduas e Semideciduas, nos domínios fitogeográficos: Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Tamashiro 1989; Lorenzi 2002; Morim 2010).

Anadenanthera é reconhecido pela combinação de flores, diplostêmones, folhas com nectário peciolar, inflorescência em glomérulo,

fruto do tipo folículo e sementes compressas com ala estreita e marginal (Queiroz 2009).

O gênero, *sensu* Altschul (1964) é representado por duas espécies com duas variedades cada uma: *A. colubrina* (Vell.) Brenan var*. colubrina, A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul*, A. peregrina* (L.) Speg. var. *peregrina e A. peregrina*. var. *falcata* (Bentham) Altschul.*,* tendo como sinônimos *A. colubrina* (Vell.) Brenan*, A. macrocarpa* (Benth.) Brenan*, A. peregrina* (L.) Speg. e *A. falcata* (Benth.) Speg.*,* respectivamente (Tamashiro 1989).

De acordo com Altschul (1964), as duas espécies de *Anadenanthera* podem ser facilmente diferenciadas pela textura do fruto associada à presença ou ausência de uma diminuta glândula na ponta da antera e a posição de um diminuto invólucro que circunda o pedúnculo. *A. peregrina* apresenta frutos opacos, de textura áspera a verrucosa, anteras eglandulares, e invólucro posicionado aproximadamente no terço superior do pedúnculo. A outra espécie, *A. colubrina*, apresenta frutos brilhantes, lisos a reticulados, antera glandular e invólucro logo abaixo do receptáculo.

Com relação às variedades, *A. peregrina* var. *peregrina* se diferencia da var. *falcata*, por apresentar frutos mais longos e largos e usualmente retos, contrastando com frutos menores e tipicamente falcados da var. *falcata*. *A. colubrina* var. *colubrina* apresenta frutos visivelmente mais alongados, estreitos, escuros e com margens regularmente constritas que a var. *cebil* (Altschul 1964).

As árvores do gênero são semidecíduas e tolerantes a longos períodos secos entremeados com chuvas esporádicas. Suas sementes podem ser dispersas facilmente pela água e pelo vento (Altschul 1964).

Essas espécies apresentam importância econômica e ecológica, sendo utilizadas na indústria moveleira, na construção civil e rural, na extração de taninos para utilização em curtumes e como fonte de combustível (lenha e carvão). Também são recomendadas em sistemas agroflorestais e em projetos de reflorestamento de áreas degradadas por apresentarem rápido crescimento, eficiente fixação de nitrogênio e resistência a ventos fortes. Além disso, têm potencial para o uso em paisagismo, principalmente para arborização urbana e de rodovias e suas flores constituem fonte de matéria prima para abelhas. (Paes *et al.* 2006; Ferraz *et al.* 2006). Vários autores registram o uso das sementes de algumas dessas espécies como poderosos alucinógenos usados por índios americanos na fabricação de rapé em ritos religiosos (Altschul 1964; Pochettino *et al.* 1999; Carvalho 2003; Lewis *et al.* 2005).

Estudos filogenéticos utilizando variações do DNA permitem o estudo de espécies estreitamente relacionadas, possibilitando a identificação de novas linhagens e produzindo dados importantes para a biologia da conservação (Andreasen 2005; Moritz 1995).

A filogeografia estuda as relações entre populações em um contexto geográfico e disponibiliza informações históricas para o entendimento de padrões de fluxo gênico, colonização, expansão e efeitos da distribuição atual da variação genética ao longo de toda a distribuição de uma espécie (Avise 2000).

Estudos filogeográficos têm sido utilizados para investigar os efeitos de mudanças climáticas do passado na estrutura genética de plantas e animais, permitindo inferir sobre a evolução de espécies dentro dos biomas,

o que pode ser utilizado para subsidiar estratégias de conservação (Bermingham e Moritz 1998; Ramos *et al.* 2007).

O sequenciamento de regiões nucleares é um tipo de marcador muito utilizado em estudos filogenéticos e filogeográficos. A região do ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA é bastante utilizada para esse tipo de estudo em baixos níveis taxonômicos devido a sua rápida taxa evolutiva (Karehed *et al.* 2008). De acordo com Baldwin *et al.* (1995) vários trabalhos vem sendo realizados com ITS em diferentes famílias botânicas, e demonstram que essa região do genoma nuclear tem fornecido relevantes informações para estudos infragenéricos e de espécies estreitamente relacionadas.

Neste trabalho sequências do ITS da região do 18S-26S do DNA nuclear ribossomal foram utilizadas para estudo da filogenia e filogeografia do gênero *Anadenanthera*, buscando responder as seguintes perguntas: (1) Os dados moleculares confirmam a atual divisão do gênero *Anadenanthera* em duas espécies com duas variedades cada? (2) Como está distribuída a diversidade genética das populações estudadas em relação a distribuição da espécie? (3) É possível identificar a localização do centro de diversidade genética de *Anadenanthera*? (4) A estrutura filogeografica de *Anadenanthera* sugere a existência de refúgios e áreas recentemente colonizadas?

Os resultados desse trabalho apresentam contribuição para a taxonomia de *Anadenanthera*, além de informações sobre a história evolutiva das Florestas Estacionais, e sobre sua origem e manutenção, indicando áreas de maior diversidade genética que podem auxiliar na elaboração de propostas para conservação da biodiversidade dessas florestas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Estratégia de Amostragem

O presente estudo utilizou 188 indivíduos do gênero *Anadenanthera* Speg. coletados em 67 populações no Brasil e Bolivia (Figura1).

As localidades das populações amostradas foram determinadas de tal forma a abranger a maior parte da região de ocorrência natural das espécies no Brasil e se concentraram em áreas de Floresta Estacional ou em formações vegetacionais adjacentes. Para definir as formações vegetacionais nas quais as populações de *Anadenanthera* foram coletadas, foi consultado o mapa das Ecorregiões Terrestres do Mundo publicado pelo WWF (World Wildlife Fund) (Olson *et al.* 2001). A classificação da Vegetação do Brasil segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2004) foi utilizada para obtenção de mais detalhes a respeito das formações vegetacionais em escala local. As localizações geográficas das populações amostradas foram registradas em mapas topográficos (fonte: http://www.worldwildlife.org) usando o software de GPS.

A amostragem abrangeu 11 ecorregiões: *Madeira-Tapajós moist forests* (NT0135), *Chiquitano dry forests* (NT0212), *Parañá-Paraíba interior forests* (NT0150), *Araucaria moist forests* (NT0101), *Serra do Mar coastal forests* (NT0160), *Bahia interior forests* (NT0104), *Caatinga* (NT1304),

Pernambuco coastal forests (NT0151), *Caatinga enclaves moist forests* (NT0106), *Atlantic dry forests* (NT0202) e *Cerrado* (NT0704).

A maioria das populações amostradas se concentraram em três ecorregiões: *Chiquitano dry forests* (NT0212), *Cerrado* (NT0704) e *Bahia interior forests* (NT0104).

As populações amostradas, suas respectivas localizações geográficas e ecorregiões a que pertencem, bem como o número de espécimes coletados por população estão relacionadas na Tabela 1.

Em cada população, o tamanho amostral variou em função da disponibilidade de árvores encontradas em cada local (1 a 9 espécimes por população), ou do número de amostras depositadas em herbários.

2.2 Identificação taxonômica e extração de DNA

A identificação das espécies e variedades de *Anadenanthera* foi realizada com auxílio de especialistas, baseando-se principalmente pela morfologia dos frutos (Figuras 2 e 3) que foram coletados junto com as folhas utilizadas para a extração de DNA e, quando possível, no caso de material herborizado que apresentava estruturas reprodutivas, também foram utilizadas as características: presença/ausência de glândula na antera da pré-floração, tipo de inflorescência, posição da bráctea involucral no pecíolo e nervação dos foliólulos (Altshul 1964).

Foram coletadas de 1 a 3 folhas completas por espécime amostrado e o material foliar foi desidratado em sílica gel e mantido em temperatura ambiente até que o DNA fosse extraído. Para materiais herborizados foram

coletados 5 a 10 folíolos, que foram armazenados em sacos de papel com sílica gel até o momento da extração do DNA. O DNA genômico total foi extraído segundo o procedimento descrito por Rossi *et al.* (2009).

Quando possível, exsicatas foram preparadas (*vouchers* citados na tabela 1) e depositadas no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC).

2.3 Amplificação por reação da polimerase em cadeia (PCR) e sequenciamento

A região completa dos ITS dos genes nucleares de RNA ribossomal 18S-26S (que inclui o gene 5.8S) foi amplificada com auxílio dos iniciadores ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') de White *et al.* (1990) e ITS_LEU (5'-GTCCACTGAACCTTATCATTTAG-3') descrito por Baum *et al.* (1998). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 15 µL, contendo: 3µl do Tampão IVB-5X (Phoneutria) com 3,5mM de $MgCl_2$; 0,5 µM de cada iniciador; 0,2 mM de cada dNTP; 1,25 U de *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega)**;** 1,25 µl dedimetil-sulfóxido (DMSO); aproximadamente 60 ng de DNA e água Milli-Q.

Todas as amplificações foram conduzidas em termociclador Master Cycler (Eppendorff) programado para as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 94ºC por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de 94º C por 1 minuto, 49ºC por 1 minuto, 72ºC por 45 segundos e 1 ciclo de extensão final de 72ºC por 5 minutos. Os produtos de PCR foram purificados utilizando a enzima *ExoSAP IT* (USB) na proporção de 9µl de reação para

3µl da enzima, resultando num volume final de 12µl, que foi incubado a 37ºC por 15 minutos para degradar os remanescentes de iniciadores e nucleotídeos, e em seguida incubado a 80ºC por 15 minutos para inativar a *ExoSAP*.

O sequenciamento foi realizado pela companhia Sul Coreana Macrogen (www.macrogen.com) utilizando os mesmos iniciadores das reações de PCR.

As sequências obtidas foram importadas para o programa *SEQUENCHER version 4.8* (Gene Codes Corp.) sendo editadas e corrigidas manualmente. O alinhamento completo das sequências foi realizado com a introdução de *gaps* (únicos ou múltiplos) para compensar a presença de *indels* (inserção/deleção).

Com o auxílio do aplicativo *SNAP Workbench* (Price e Carbone 2005) as sequências foram colapsadas em haplótipos excluindo *indels* e sítios que apresentaram mais que uma mudança, uma vez que o modelo de sítios infinitos de Kimura (1969) foi assumido. Este modelo afirma que o número de sítios em uma sequência de DNA é tão grande que uma mutação recém-surgida ocorrerá em um local diferente dos locais onde as mutações anteriores ocorreram (Kimura 1969).

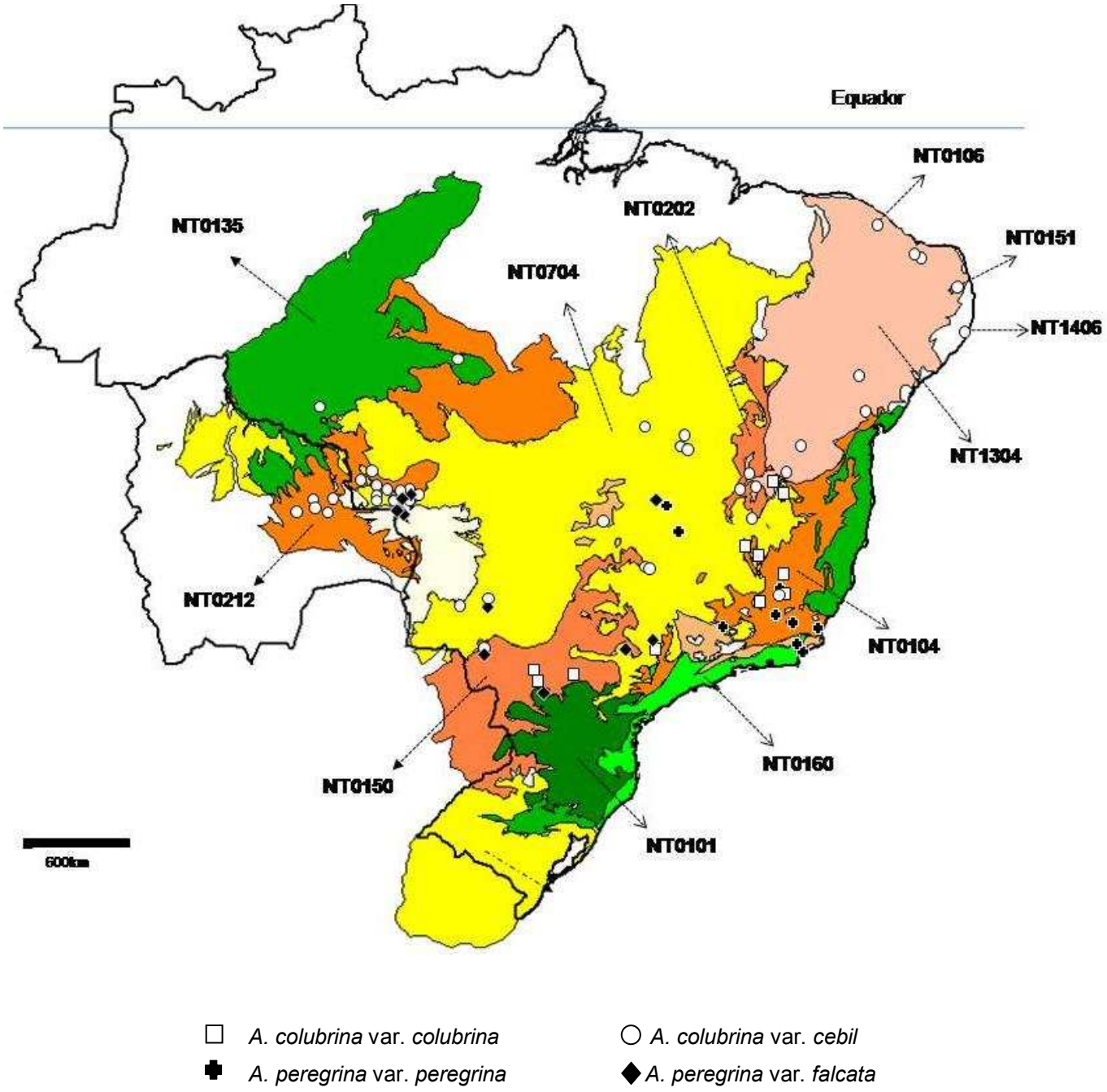

Figura 1. Localização das populações de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *colubrina*, *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul, *A. peregrina* (L.) Speg. var. *peregrina e A. peregrina* var. *falcata* (Bentham) Altschul., nas ecorregiões amostradas e adjacentes. As ecorregiões (Olson *et al.* 2001) incluem: NT0101, *Araucaria moist forests*; NT0104, *Bahia interior forests*; NT0106, *Caatinga Enclaves moist forests*; NT0135, *Madeira-Tapajós moist forests*; NT0150, *Paraná-Paraíba interior forests*; NT0151, *Pernambuco coastal forests*; NT0160, *Serra do Mar coastal forests*; NT0202, *Atlantic dry forests*; NT0212, *Chiquitano dry forests*; NT0704, *Cerrado*; NT1304, *Caatinga*.

Figura 2. Frutos de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *colubrina:* A e B (CEN 9565), *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul, *colubrina:* C e D (CEN 62690).

Figura 3. Frutos de *A. peregrina* (L.) Speg. var*. peregrina:* A e B (VIC 20324) *e A. peregrina* var*. falcata* (Bentham) Altschul: C (VIC 22879) e D (CEN48854).

Tabela 1. Ecorregiões Terrestres e localização das populações de *Anadenanthera* Speg. utilizadas nas análises de filogenia. c= *A. colubrina*, p= *A. peregrina*, co= *A. colubrina* var. *colubrina*, ce= *A. colubrina* var. *cebil*, pp = *A. peregrina* var. *peregrina*, pf= *A. peregrina* var. *falcata.*

Ecorregião	Código da população	Indivíduos amostrados (*voucher* quando houver)	Localização	Coordenadas (lat / lon)
NT0101	CMO	pf345, pf352, pf353	Campo Mourão/PR	-24 03' 06.00"/-52 22' 38.00"
NT0104	UFL	pp13, pp14, pp7, pp8, pp9	UFLA - Lavras/MG	-21 13' 53.580"/-44 59' 36.26"
NT0104	BFE	ce49, ce51, ce52, ce54, ce56	Bonfim de Feira – Feira de Santana/BA	-12 09' 42.00"/-39 11' 02.00"
NT0104	RPM	co114 (Fernandes e Dutra 507)	Rio Pardo de Minas/MG	-15 35' 58.23'/-42 32' 44.82"
NT0104	PRC	co109 (Fernandes 903)	Parque Estadual do Rio Corrente-Açucena/MG	-19 03' 25.38'/-42 32' 39.51"
NT0104	PER	ce169(VIC26246), ce170 (VIC26247), co171 (VIC27046), ce172 (VIC27048), co173 (VIC27050), co174 (VIC27051), pp175 (VIC27052), pp176 (VIC27055), pp177 (VIC27056)	Parque Estadual do Rio Doce-Marliéria/MG	-19 42' 48.05"/-42 43' 55.30"
NT0104	VIC	pp137, pp179 (Fernandes 1171), pp180 (Fernandes 1172), pp182 (Fernandes 1175)	Viçosa/MG	-20 46' 39.60"/-42 51' 45.26"
NT0104	MUR	pp143,pp144 ,pp145,pp147,pp148	Muriaé/MG	-21 07' 35.35'/,-42 14' 36.21"
NT0104	FSA	pp165,pp167	Fazenda Santana-São Francisco do Itabapoana/RJ	-21 20' 08.70"/-41 08' 18.30"
NT0104	MCA	pp162	Mata do Carvão – São Francisco do Itabapoana/RJ	-21 28' 25.41"/-41 07' 12.62"
NT0104	FEU	co131 (Fernandes1073)	Floresta Estadual do Uaimii-Ouro Preto/MG	-20 14' 57.41'/,-43 34' 16.76"

Continua…

Tabela 1 (continuação0

NT0106	RED	ce389	Redenção/CE	-04 13' 33.77"/-38 43' 52.82"
NT0135	SFE	ce64, ce65	São Felipe D'oeste/RO	-11 54' 23.40'/,-61 30' 38.70"
NT0135	AFL	ce15, ce16, ce17, ce18, ce19, ce20	Alta Floresta/MT	-09 54' 09.38"/-55 53' 55.82"
NT0150	AMA	co362, co363, co364	Amaporã/PR	-23 05' 29.14"/-52 47' 00.72"
NT0150	CIA	co354, co356,co357	Cianorte/PR	-23 40' 19.61"/-52 36' 05.76"
NT0150	DOU	pf422 (CGMS10.626), c423(CGMS11.644)	Dourados/MS	-22 13' 31.35",-54 48' 16.17"
NT0150	PGO	ce150,ce151,ce152	Palmeiras de Goiás/GO	-16 47' 20.04"/-49 55' 58.42"
NT0150	LON	co361	Londrina/PR	-23 19' 01.36"/-51 09' 14.46"
NT0151	SJU	ce306,ce307,ce308,ce309	Serra da Jurema, Guarabira/PB	-06 51' 19.86"/-35 29' 24.45"
NT0151	TAM	pp412(Cen 59.981)	Tamandaré, PE	-08 43' 37.00"/-35 10' 41.00"
NT0160	MAC	pp132,pp133,pp134,pp135,pp140,pp142	Macaé/RJ	-22 21' 12.50",-41 53' 03.94"
NT0160	TRA	pp374,pp376,pp377	Serra de Trajano Moraes - Trajano Moraes/RJ	-22 03' 12.00"/-41 59' 39.90"
NT0202	JAN	c322 (Fernandes 1236)	Januária/MG	-15 28' 32.77"/-44 20' 58.90"
NT0202	JAI	ce335 (Fernandes1190),ce339 (Fernandes1194)	P. Nacional Cavernas do PeruaçuJaíba/MG	-15 19' 42.61"/-43 41' 27.40"
NT0202	MCL	ce123	Montes Claros/MG	-16 45' 14.64"/-43 51' 58.89"
NT0212	CRU	ce82,ce78,ce80,ce81	Cármen Ruiz/BO	-15 49' 45.41"/-60 56' 58.28"
NT0212	INP	ce84,ce85,ce86,ce87,ce88,ce89	INPA-Concepción/BO	-16 12' 30.20"/-61 42' 39.83"
NT0212	SRA	ce90,ce91,ce92,ce93,ce94	Coronacion-San Ramón/BO	-16 25' 43.77"/-62 29' 59.65"
NT0212	ESJ	ce97,ce99	Estancia San Juan-San Ignacio/BO	-16 23' 49.25"/-61 10' 45.57"
NT0212	LAG	102,103,104,105,106	La Lagunilla-Concepción/BO	-15 51' 30.21"/-61 46' 46.83"
NT0212	NLA	ce277 (HPAN 0186),ce281(HPAN 0190)	Colônia dos mineiros - Nova Lacerda/MT	-14 41' 31.70"/-59 24' 20.50"

Continua…

Tabela 1 (continuação)

NT0212	FIG	ce2, ce3,ce4, ce 248 (HPAN0237), ce249 (HPAN0238), ce251 (HPAN0240), ce252 (HPAN0241), ce259 (HPAN 0248)	Figueirópolis D'oeste/MT	-15 27' 27.70''/-58 41' 17.10''
NT0212	CAR	pf66, pf67	Caramujo, Cáceres/MT	-15 31' 45.10''/-57 59' 11.60''
NT0212	PLA	ce283 (HPAN 0192), ce289 (HPAN0198), ce292 (HPAN0201), ce71	Pontes e Lacerda/MT	-15 16' 40.60''/-59 17' 19.80''
NT0212	PLB	ce75	BR364 – Cáceres/P.Lacerda Km 150/MT	-15 51' 05.05''/-58 28' 12.57''
NT0212	EXU	ce5	Exu- Cáceres/MT	-15 40' 41.50''/-57 32' 30.30''
NT0212	SOR	pf301 (HPAN0283), p302 (HPAN0284), ce303(HPAN0252)	Soroteca – Curvelândia/MT	-15 36' 42.60''-57 56' 20.10''
NT0212	VIB	ce295 (HPAN0204), ce296(HPAN0205), ce298(HPAN0207)	Vila Bela da Santíssima Trindade/MT	-15 01' 43.60''/-59 50' 19.60''
NT1304	MSR	ce57, ce58, ce59	Mossoró/RN	-05 27' 25.60''/-37 10' 55.80''
NT1304	ACU	ce45, ce46, ce48	Floresta Nacional de Açu, Açu/RN	-05 34' 53.10''/-36 56' 38.20''
NT1304	CAN	ce411 (CEN 57.625)	Cansanção/BA	-10 37' 25.00''/-39 27' 59.00''
NT1304	RCO	ce409 (CEN 50.736)	Rio das Contas/BA	-13 37' 19.00''/-41 48' 06.00''
NT1304	LIC	ce410 (CEN 54.057)	Licinio de Almeida/BA	-14 46' 09.00''/-42 27' 03.00''
NT1304	MAM	co108(Dutra e Fernandes 540)	Mamonas/MG	-15 06' 51.37''/-42 58' 07.32''
NT0704	DIA	co112 (Fernandes e Dutra 598), co111 (Fernandes e Dutra 597)	Diamantina/MG	-18 13' 55.02''/-43 36' 44.29''
NT0704	JFE	co107(Dutra e Fernandes 563)	Joaquim Felicio/MG	-17 47' 08.85''/-44 08' 14.37''

Continua…

Tabela 1 (continuação)

NT0704	PRN	ce413 (CEN60.484), ce414 (CEN 62.690)	Paranã/TO	-12 48' 28.00"/-48 14' 18.00"
NT0704	MAG	ce400 (IBGE 050766)	Monte Alegre de Goias/GO	-13 08' 09.00"/-46 39' 28.00"
NT0704	SDO	ce395 (CEN 55.126), ce397 (IBGE 048309)	São Domingos/GO	-13 36' 51.00"/-46 46' 23.00"
NT0704	GGO	ce401 (IBGE 69696)	Guarani de Goias/GO	-13 48' 00.00"/-46 31' 28.00"
NT0704	FAL	pf126	Fazenda Agua Limpa/DF	-15 55' 59.54"/-47 44' 09.07"
NT0704	CRI	p402 (CEN43240)	Cristalina/GO	-16 13' 14.00"/-47 20' 42.00"
NT0704	PAR	pP332, p333, p334	Paracatú/MG	-17 13' 21.00"/-46 52' 30.00"
NT0704	UB1	ce178	Parque E. Pau Furado – Uberlandia/MG	-18 48' 42.10"/-48 09' 49.30"
NT0704	IND	ce37	Indianópolis/MG	-18 53' 42.70"/-48 02' 17.72"
NT0704	ITI	pf115, pf118, co155	Itirapina/SP	-22 13' 32.52"/-47 49' 13.29"
NT0704	JBB	pf310, pf312, pf313, pf315, pf320, pf321	Jardim Botânico Municipal de Baurú, Bauru/SP	-22 20' 52.90"/-49 00' 40.30"
NT0704	CGR	ce425 (CGMS12281), pf428 (CGMS17942)	Campo Grande/MS	-20 26' 56.07"/-54 39' 05.77"
NT0704	AQD	ce421 (CGMS8698), pf424 (CGMS12150), ce430 (CGMS20123)	Aquidauana/MS	-20 28' 23.48"/-55 47' 17.43"
NT0704	AEF	pf216 (HPAN0292), p214 (HPAN0290)	Área do entroncamento de fazendas, Fronteira Bra/Bol	-16 21' 30.20"/-58 10' 20.90"
NT0704	FJB	ce203 (HPAN0252), pf205 (HPAN0254), pf 207 (HPAN0256), pf210 (HPAN0259),pf211 (HPAN0260), pf213(HPAN0262)	Fazenda João de Barro, Fronteira Bra/Bol	-16 21' 22.40"/-58 18' 28.70"
NT0704	FBP	ce264 (HPAN0297), ce266 (HPAN0299), ce267(HPAN0300)	Fazenda Baia da Pedra, Fronteira Brasil/Bolivia	-16 28' 06.40"/-58 09' 36.20"

Continua...

Tabela 1 (continuação)

NT0704	RQA	ce223 (HPAN0227), ce224 (HPAN0228), ce225 (HPAN0229), ce226(HPAN0230)	Rodovia Quatro Marcos à Araputanga, São José dos Quatro Marcos/MT	-15 36' 23.30"/-58 13' 02.60"
NT0704	EVC	ce184 (HPAN0263), ce186 (HPAN0265), ce187 (HPAN0266)	Estância Vila Cardoso, Porto Esperidião/MT	-15 47' 09.00"/-59 11' 26.00"
NT0704	FSH	ce192 (HPAN0271), ce193 (HPAN0272),ce199 (HPAN0278)	Estrada Faz. Sta Helena, Porto Esperidião/MT	-15 55' 17.00"/-59 09' 34.00"
NT0704	CAC	ce153 , p235 (HPAN 0215)	Cáceres, MT	-15 49' 06.90"/-57 57' 03.60"

2.4 Análise filogenética

Análise Bayesiana foi realizada com 18 espécimes de *Anadenanthera colubrina* var. *colubrina*, 107 espécimes de *A. colubrina* var. *cebil*, 33 espécimes de *A. peregrina* var. *peregrina*, 23 *A. peregrina* var. *falcata*, e outros sete individuos identificados apenas em nível de espécie, sendo um pertencente a *Anadenanthera colubrina* e 6 a *Anadenanthera peregrina*, além de 1 indivíduo não identificado, totalizando 188 espécimes distribuídos em 67 populações (Tabela 1).

MrModeltest v2.3 (Nylander 2004) foi alimentado com o conjunto de dados de ITS. O *Akaike Information Criteria* (Akaike 1973) indicou HKY como o melhor modelo de evolução molecular entre os 24 modelos testados.

Usando o modelo HKY, *MrBayes v3.1.2* (Ronquist 2003) estimou a filogenia Bayesiana. Cada análise Bayesiana foi realizada usando duas corridas simultâneas de 10 milhões de gerações cada, com uma cadeia fria e três aquecidas em cada corrida. A amostragem foi realizada uma vez a cada mil árvores. As primeiras 250 árvores foram descartadas como amostras *burn-in*. Para cada análise, 50% da maioria das árvores consenso das duas corridas independentes foi obtida com probabilidade posterior (PP) igual à frequência de bipartição.

A espécie *Pseudopiptadenia contorta* (DC) G.P. Lewis & M.P. Lima foi utilizada como grupo externo na análise Bayesiana, pois de acordo com Lewis *et al.* (2005), dentro da tribo Mimoseae, *Pseudopiptadenia* está mais próxima de *Anadenanthera*.

2.5 Análise filogeográfica

As sequências utilizadas nas análises de filogeografia compreendem um subconjunto das sequências usadas na análise Bayesiana. Este subconjunto abrangeu 45 populações nas 11 ecorregiões estudadas (Tabela 2) e foi constituído por 61 sequências obtidas de sequenciamento direto e que não apresentavam ambiguidades e 27 sequências cujos eletroferogramas continham um único sítio apresentando picos duplos (codificados com os códigos de ambiguidade IUPAC: R, Y, K, S, ou M). As sequências que continham um único sítio com pico duplo tiveram sua ambiguidade resolvida, ou seja, cada uma das 27 sequências que apresentavam um único pico duplo deu origem a duas novas sequências idênticas a sequência original, exceto no sítio ambíguo, onde cada sequência apresentou um dos dois nucleotídeos possíveis para o respectivo código de ambiguidade. Dessa forma, o conjunto de dados foi composto pelas 61 sequências livres de pico duplo, pelas 54 sequências originadas dos 27 espécimes que apresentavam um único sítio com pico duplo, totalizando 115 sequências advindas de 88 espécimes, sendo 12 espécimes da var. *falcata*, 18 espécimes da var. *peregrina*, 9 da var. *colubrina* e 49 espécimes da var. *cebil*.

Tabela 2. Ecorregiões Terrestres e localização das populações de *Anadenanthera* Speg. utilizadas nas análises de filogeografia. co= *A. colubrina* var. *colubrina*, ce= *A. colubrina* var. *cebil*, pp = *A. peregrina* var. *peregrina*, pf= *A. peregrina* var. *falcata.* O número de indivíduos utilizados está citado para cada variedade. O número entre parênteses representa o número de sequências utilizadas.

Ecorregião	**Código da população**	**Localização**	**variedades**				**Coordenadas (lat / lon)**
			co	ce	pp	pf	
NT0101	CMO	Campo Mourão/PR				3(3)	-24 03' 06.00"/-52 22' 38.00"
NT0104	UFL	UFLA - Lavras/MG			2(3)		-21 13' 53.580"/-44 59' 36.26"
NT0104	BFE	Bonfim de Feira – Feira de Santana/BA		1(2)			-12 09' 42.00"/-39 11' 02.00"
NT0104	PRC	Parque Estadual do Rio Corrente- Açucena/MG	1(2)				-19 03' 25.38'/-42 32' 39.51"
NT0104	PER	Parque Estadual do Rio Doce- Marliéria/MG	1(2)		3(3)		-19 42' 48.05"/-42 43' 55.30"
NT0104	VIC	Viçosa/MG			2(4)		-20 46' 39.60"/-42 51' 45.26"
NT0104	MUR	Muriaé/MG			4(7)		-21 07' 35.35'/,-42 14' 36.21"
NT0104	FSA	Fazenda Santana-São Francisco do Itabapoana/RJ			2(3)		-21 20' 08.70"/-41 08' 18.30"
NT0104	MCA	Mata do Carvão – São Francisco do Itabapoana/RJ			1(2)		-21 28' 25.41"/-41 07' 12.62"
NT0104	FEU	Floresta Estadual do Uaimii-Ouro Preto/MG	1(1)				-20 14' 57.41'/,-43 34' 16.76"
NT0106	RED	Redenção/CE		1(2)			-04 13' 33.77"/-38 43' 52.82"
NT0135	SFE	São Felipe D'oeste/RO		2(2)			-11 54' 23.40'/,-61 30' 38.70"
NT0135	AFL	Alta Floresta/MT		1(1)			-09 54' 09.38"/-55 53' 55.82"
NT0150	AMA	Amaporã/PR	3(4)				-23 05' 29.14"/-52 47' 00.72"
NT0150	CIA	Cianorte/PR	2(2)				-23 40' 19.61"/-52 36' 05.76"

Continua...

Tabela 2 (continuação)

NT0150	PGO	Palmeiras de Goiás/GO	3(3)			-16 47' 20.04"/-49 55' 58.42"
NT0151	SJU	Serra da Jurema, Guarabira/PB	2(3)			-06 51' 19.86"/-35 29' 24.45"
NT0160	MAC	Macaé/RJ		2(3)		-22 21' 12.50",-41 53' 03.94"
NT0160	TRA	Serra de Trajano Moraes - Trajano Moraes/RJ		2(2)		-22 03' 12.00"/-41 59' 39.90"
NT0202	JAI	P. Nacional Cavernas do PeruaçuJaíba/MG	2(2)			-15 19' 42.61"/-43 41' 27.40"
NT0212	CRU	Cármen Ruiz/BO	1(1)			-15 49' 45.41"/-60 56' 58.28"
NT0212	INP	INPA-Concepción/BO	6(6)			-16 12' 30.20"/-61 42' 39.83"
NT0212	SRA	Coronacion-San Ramón/BO	3(3)			-16 25' 43.77"/-62 29' 59.65"
NT0212	ESJ	Estancia San Juan-San Ignacio/BO	1(1)			-16 23' 49.25"/-61 10' 45.57"
NT0212	LAG	La Lagunilla-Concepción/BO	2(2)			-15 51' 30.21"/-61 46' 46.83"
NT0212	NLA	Colônia dos mineiros - Nova Lacerda/MT	1(1)			-14 41' 31.70"/-59 24' 20.50"
NT0212	CAR	Caramujo, Cáceres/MT			2(3)	-15 31' 45.10"/-57 59' 11.60"
NT0212	PLA	Pontes e Lacerda/MT	3(3)			-15 16' 40.60"/-59 17' 19.80"
NT0212	VIB	Vila Bela da Santíssima Trindade/MT	2(3)			-15 01' 43.60"/-59 50' 19.60"
NT1304	MSR	Mossoró/RN	1(1)			-05 27' 25.60"/-37 10' 55.80"
NT1304	ACU	Floresta Nacional de Açu, Açu/RN	3(3)			-05 34' 53.10"/-36 56' 38.20"
NT1304	RCO	Rio das Contas/BA	1(2)			-13 37' 19.00"/-41 48' 06.00"
NT1304	LIC	Licinio de Almeida/BA	1(2)			-14 46' 09.00"/-42 27' 03.00"
NT0704	MAG	Monte Alegre de Goias/GO	1(2)			-13 08' 09.00"/-46 39' 28.00"
NT0704	SDO	São Domingos/GO	1(1)			-13 36' 51.00"/-46 46' 23.00"
NT0704	CRI	Cristalina/GO		1(1)		-16 13' 14.00"/-47 20' 42.00"

Continua...

Tabela 2 (continuação)

NT0704	IND	Indianópolis/MG		1(1)		-18 53' 42.70"/-48 02' 17.72"
NT0704	ITI	Itirapina/SP	1(2)		1(2)	-22 13' 32.52"/-47 49' 13.29"
NT0704	JBB	Jardim Botânico Municipal de Baurú, Bauru/SP			3(4)	-22 20' 52.90"/-49 00' 40.30"
NT0704	CGR	Campo Grande/MS		1(1)	1(2)	-20 26' 56.07"/-54 39' 05.77"
NT0704	AQD	Aquidauana/MS		2(2)		-20 28' 23.48"/-55 47' 17.43"
NT0704	FJB	Fazenda João de Barro, Fronteira Bra/Bol			2(3)	-16 21' 22.40"/-58 18' 28.70"
NT0704	FBP	Fazenda Baia da Pedra, Fronteira Brasil/Bolivia		3(3)		-16 28' 06.40"/-58 09' 36.20"
NT0704	RQA	Rodovia Quatro Marcos à Araputanga, São José dos Quatro Marcos/MT		2(3)		-15 36' 23.30"/-58 13' 02.60"
NT0704	FSH	Estrada Faz. Sta Helena, Porto Esperidião/MT		1(1)		-15 55' 17.00"/-59 09' 34.00"

2.6 Índices de diversidade nucleotídica

O programa ARLEQUIN v3.0 (Excoffier *et al.* 2005) foi utilizado para estimar o número de haplótipos (H), a diversidade haplotípica (Hd), a diversidade nucleotídica (π), o número de sítios polimórficos (S) e para realizar os testes de neutralidade pelos métodos D de Tajima e Fs de Fu em nível de ribogrupo.

2.7 Estimativa das redes de haplótipos

O programa *DnaSP 5.10* (Librado e Rozas 2009) foi utilizado para determinação dos haplótipos presentes do conjunto de dados. A genealogia de genes foi inferida utilizando o método de *Median Joining (MJ) network* (Bandelt *et al.* 1999) como implementado no aplicativo *Network4.5.1.6* (http://www.fluxus-technology.com).

3. RESULTADOS

3.1. Análise Bayesiana

O comprimento das sequências de ITS dos espécimes de *Anadenanthera* Speg. variou de 585 a 595 bases em *A. colubrina* (Vell.) Brenan var. *colubrina*, 552 a 597 bases em *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altshul, 545 a 587 *em A. peregrina* (L.) Speg.var. *peregrina* e na var. *falcata*. Essa diferença no tamanho dos fragmentos é resultado da presença de 15 *indels* que variaram desde 1 até 50 bases. Devido à inserção de *indels* necessários para o alinhamento das 188 sequências, o alinhamento final do conjunto de dados apresentou 603 bases.

Após a remoção de *indels* e sítios que violavam o modelo de sítios infinitos (Kimura 1969) o alinhamento das 188 sequências apresentou 188 sítios polimórficos.

A topologia da árvore apresentada na Figura 4, revelou quatro grupos distintos sendo: três grupos fortemente suportados pela probabilidade posterior (PP), denominados aqui de clado I (representado na cor azul) clado II (representado pela cor verde), clado III (representado pela cor vermelha) e um quarto grupo com baixo valor de probabilidade posterior, denominado clado IV (destacado pela cor laranja na árvore). A distribuição geográfica das sequências que constituem os clados está representada na Figura 5.

Os resultados permitem confirmar a monofilia de *Anadenanthera colubrina* var. *colubrina*, fortemente suportada (96%), formando um clado que ocupa a posição mais basal na árvore, porém não foi possível, com os dados da região do ITS, confirmar a monofilia das outras três variedades (*A. colubrina* var. *cebil, A. peregrina* var. *peregrina* e *A. peregrina* var. *falcata*), uma vez que foram observados tanto clados que separavam as duas espécies quanto clado que reuniu três das quatro variedades.

Os resultados sugerem um agrupamento relacionado com tempo de diversificação dos espécimes estudados, uma vez que dois clados foram formados agrupando sequências que apresentam ramos mais longos em relação ao clado IV que apresenta uma grande politomia com ramos muito curtos.

O clado I ocupa uma posição mais basal na árvore e agrupou os espécimes de *A. colubrina* var. *colubrina* de cinco ecorregiões da região Atlântica (NT0150, NT1304, NT0202, NT0104, NT0704), e regiões de transição entre as ecorregiões NT0202/NT0704 e NT0202/1304 (Figura 4 e 5).

O clado II agrupou, com 100% de PP, espécimes de *A. colubrina* var. *cebil* da ecorregião NT01212 (*Chiquitano dry forests*) e espécimes da ecorregião NT0151 (*Pernambuco coastal forests*), Nordeste na região Atlântica.

O clado III apresenta dois subconjuntos fortemente suportados (100% PP). Um dos subconjuntos apresenta um ramo bastante curto onde foi alocada uma sequência de *A. colubrina* var. *cebil*. O outro subconjunto desse clado reuniu 11 sequências de *Anadenathera peregrina*. As relações

infraespecificas não foram bem resolvidas nesse clado uma vez que foram observadas tanto sequências da variedade *peregrina* quanto da variedade *falcata*. Todos as sequências do clado III pertencem a espécimes de populações da região Atlântica (NT0101, NT0704/NT0150, NT0160).

No clado IV, com exceção da variedade *colubrina*, todas as demais variedades de *Anadenanthera* formaram uma grande politomia onde 149 sequências distribuíram-se em 42 ramos bastante curtos. As sequências desta politomia são pertencentes a espécimes de populações distribuídas por todas as ecorregiões amostradas neste estudo, excetuando-se a NT0101 (*Araucaria moist forests*). É interessante salientar que na politomia do clado IV espécimes de diferentes espécies e variedades apresentaram a mesma sequência de ITS, como é o caso dos espécimes SOR301 e EVC186 que correspondem à *A. peregrina* variedade *falcata* e *A. colubrina* variedade *cebil,* respectivamente.

.

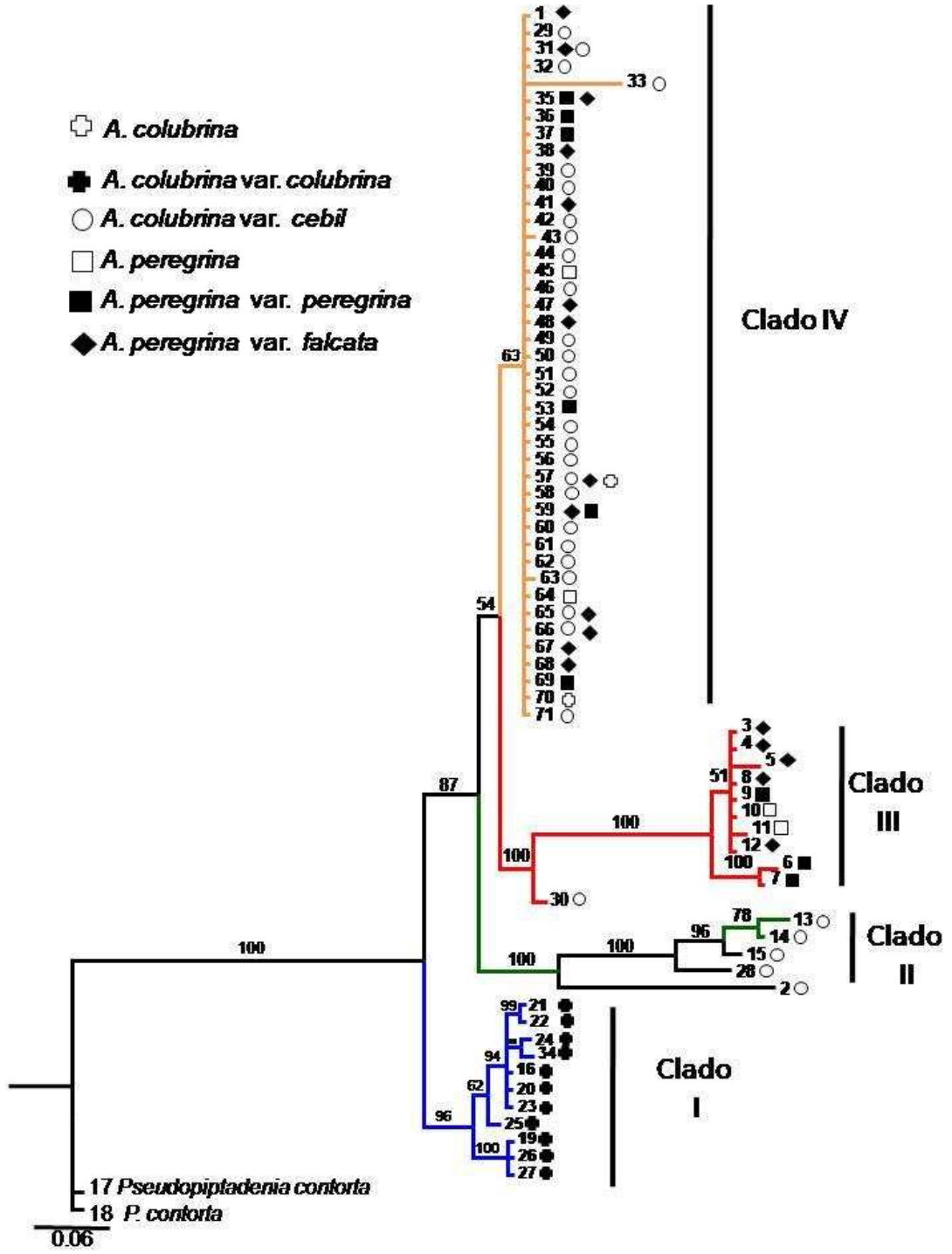

Figura 4. Filogenia Bayesiana (árvore consenso) do conjunto de dados de ITS para 188 sequências de *Anadenanthera* Speg. e *Pseudopiptadenia contorta* (DC) G.P. Lewis & M.P. Lima como grupo externo. Comprimento dos ramos é desenhado por escala, os valores de suporte dos nós são dados como probabilidade posterior (%) sobre os ramos. A escala da barra corresponde ao número esperado de substituições por sítio .

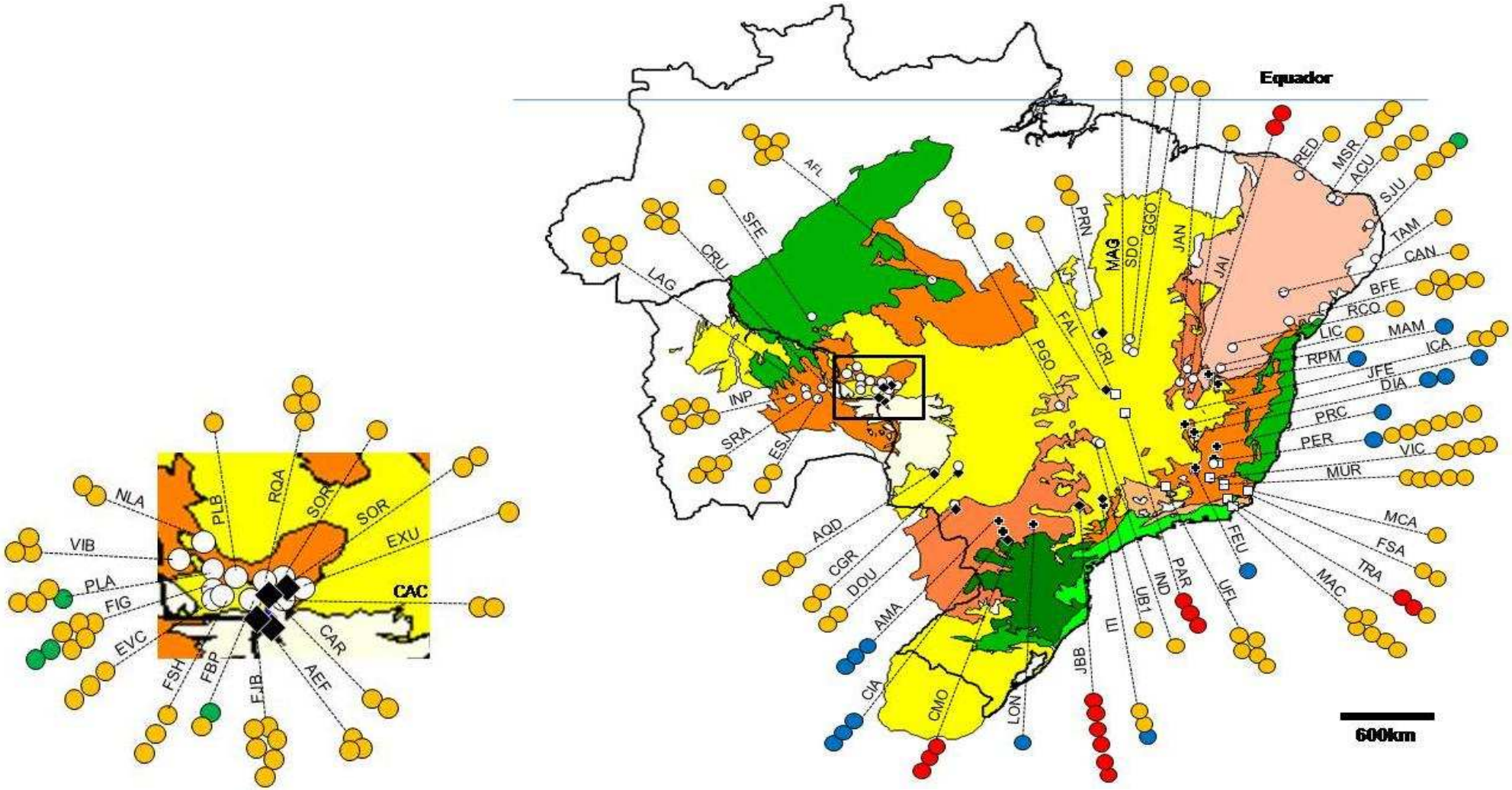

Figura 5. Distribuição geográfica dos clados apresentados na árvore da análise Bayesiana. Cada circulo representa uma sequência de ITS. As cores correspondem aos clados da árvore da análise Bayesiana: azul = clado I; verde= clado II, vermelho = clado III e laranja = clado IV. Populações estão representadas por códigos de três letras de acordo com a Tabela 1**.** **.**

3.2. Análise Filogeográfica

O conjunto de dados para o estudo de filogeografia foi constituído por 115 sequências provenientes de 88 espécimes de *Anadenanthera*. O número de sequências de cada variedade, bem como a localização dos espécimes de cada variedade utilizados nesse estudo estão listados na Tabela 2.

A exclusão de *indels* e sítios que violavam o modelo de sítios infinitos das 115 sequências de ITS que compõem o conjunto de dados produziu um fragmento com 471 bases, que foram colapsadas em 21 haplótipos, nos quais foram identificados 131 sítios polimórficos. Esses sítios polimórficos apresentaram 110 substituições do tipo transição e 21 do tipo transversões. Os polimorfismos em relação ao haplótipo 1 (H1) estão apresentados na Figura 6.

Na rede da Figura 7, observa-se que a variação genética encontra-se distribuída em cinco linhagens distintas, a partir de agora denominados: ribogrupo I (destacado em azul na rede de haplótipos), ribogrupo II (destacado em verde), ribogrupo III (destacado em rosa), ribogrupo IV (destacado em vermelho) e ribogrupo V (destacado em preto). Os cinco ribogrupos se encontram bem separados na rede de haplótipos com muitos passos de mutação entre cada ribogrupo.

O centro da rede é ocupado por quatro haplótipos hipotéticos ou não amostrados (representados por círculos brancos na Figura 7), não sendo possível a observação de um haplótipo central comum. Um desses haplótipos hipotéticos dá origem ao ribogrupo III, constituído por um único

haplótipo (H14). Esse haplótipo foi considerado bastante raro, tendo sido encontrado em dois espécimes coletados na população JAI, no Norte de Minas, em uma área de transição entre as ecorregiões NT0202 (*Atlantic dry Forest*) e NT1304 (Caatinga).

3.3 Distribuição geográfica dos haplótipos

Dos 21 haplótipos encontrados nos cinco ribogrupos, 13 (61,90%) são restritos a populações da região Atlântica, 4 haplótipos (19,05%) são exclusivos da região do Chiquitano e 1 (4,76%) da região Central do Brasil. Um haplótipo é compartilhado por populações da região Atlântica e do Brasil Central, e dois haplótipos compartilhados por populações da região Atlântica, do Chiquitano e Brasil Central (Figura 8).

Os ribogrupos também apresentaram diferenciação de acordo com a distribuição geográfica. Os ribogrupos I, III e IV são restritos a região Atlântica distribuídos em seis ecorregiões (NT0101, NT0104, NT0150, NT0160, NT0202, NT0704). O ribogrupo II inclui 3 haplótipos bastante divergentes (Hd= 1,00) separados entre si por muitos passos mutacionais e distribuídos por duas ecorregiões adjacentes na região do Chiquitano (NT0212, NT704) e na ecorregião NT0151, no nordeste da região Altântica.

O ribogrupo V apresenta o maior número de haplótipos (8) além dos haplótipos mais freqüentes (H16, H20 e H15). Os haplótipos desse ribogrupo encontram-se dispersos por quase toda a área de ocorrência de *Anadenanthera*, e inclui sequências de três das quatro variedades do

gênero, mas ainda mantêm um padrão geográfico de distribuição quando considerados os haplótipos que constituem esse ribogrupo individualmente.

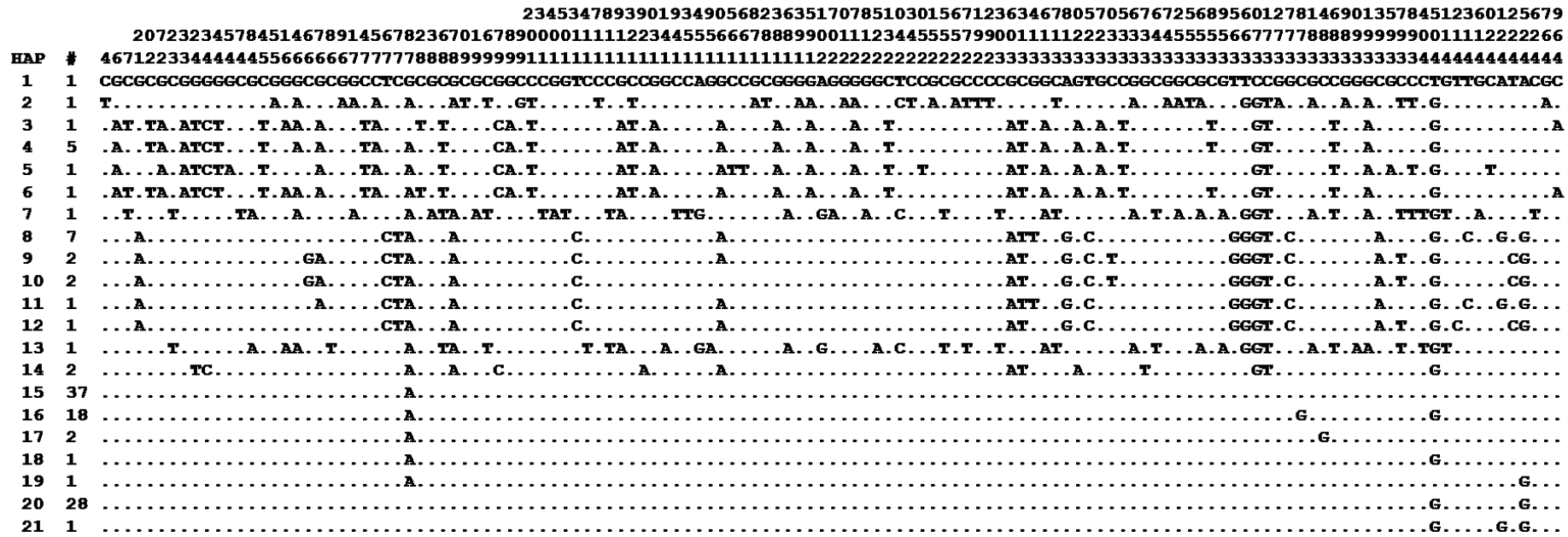

Figura 6. Alinhamento dos sítios polimórficos da região de ITS do genoma nuclear que definem os 21 haplótipos em *Anadenanthera* Speg. Cada fragmento inclui 471 bases. Os números acima do alinhamento representam a posição do sítio polimórfico no alinhamento e os pontos indicam similaridade ao Haplótipo 1. O número de ocorrências de cada haplótipo entre as sequências obtidas por sequênciamento direto (#) são indicadas.

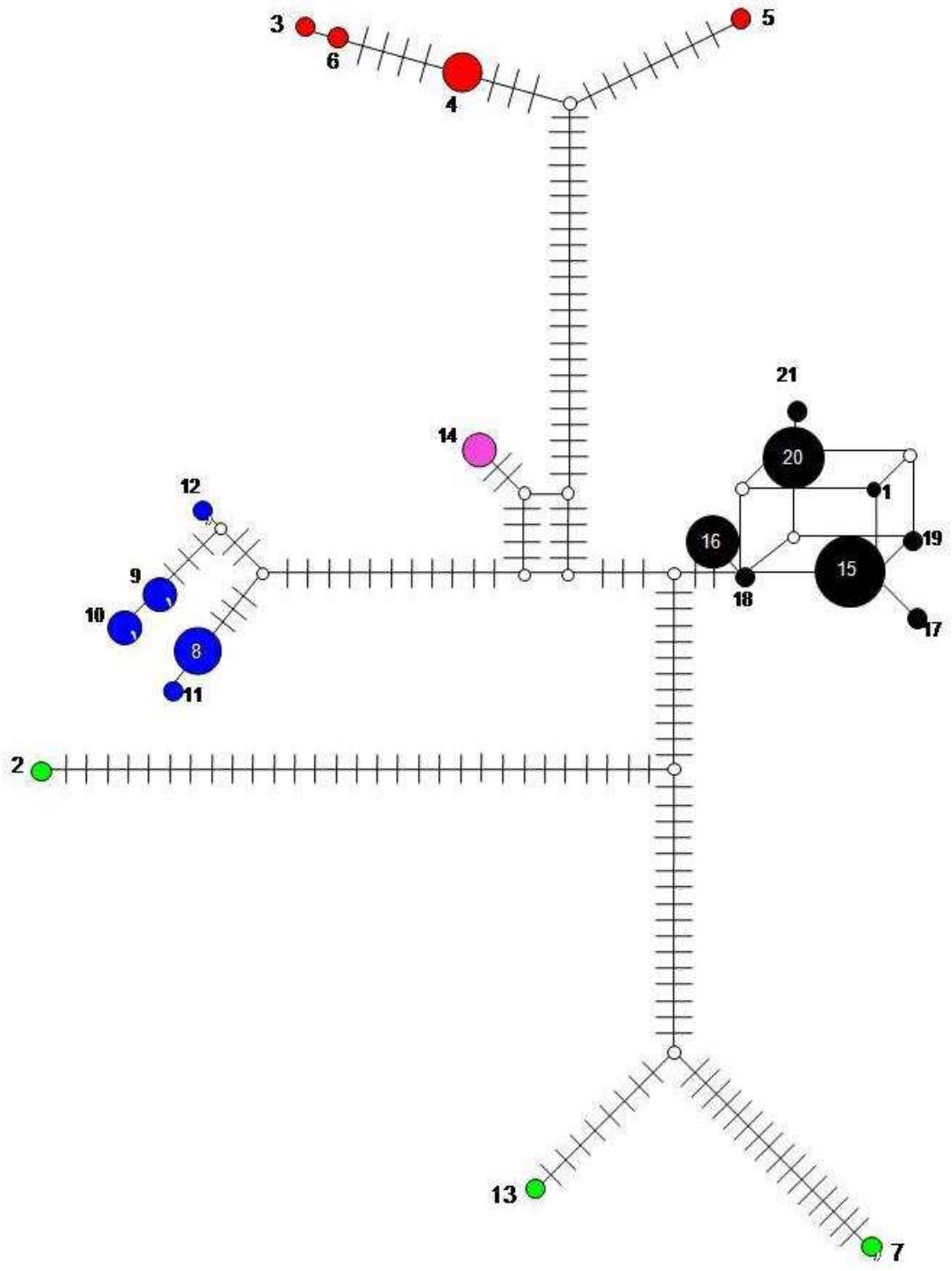

Figura 7. Rede de haplótipos *Median-joining* mostrando as relações entre as linhagens genealógicas em *Anadenanthera* Speg., baseado nos haplótipos de ITS. Círculos representam haplótipos (codificados por números), o tamanho do círculo é proporcional à frequência relativa do haplótipo, as cores dentro do círculo denotam os ribogrupos (azul, ribogrupo I; verde, ribogrupo II; rosa, ribogrupo III; vermelho, ribogrupo IV e preto, ribogrupo V). Haplótipos hipotéticos estão representados por círculos brancos. Números de substituições são indicados por barras quando mais do que uma substituição ocorreu.

O haplótipo H15 é o haplótipo mais freqüente (Tabela 3), e foi observado em 37 espécimes dos 115 incluídos nesse estudo e encontra-se distribuído em 20 populações por quatro ecorregiões (NT0135, NT0150, NT0212 e NT0704). Apesar de ser o haplótipo presente em um maior número de populações, a maioria dessas populações (15) estão localizadas na região do Chiquitano. Na região do Brasil Central ele ocorreu em três populações, e em outras duas populações no interior da região Atlântica (IND e PGO).

O haplótipo H20, observado em 28 espécimes, é o segundo haplótipo mais freqüente. Esses 28 espécimes que apresentaram o haplótipo H20 estão distribuídos em 10 populações de três ecorregiões (NT0104, NT0160 e NT0704), sendo nove populações localizadas na parte sudeste da região Atlântica, e uma população localizada em uma área de Cerrado do Brasil Central.

O haplótipo H16 foi observado em 11 populações. Embora este haplótipo tenha sido encontrado em menor número de populações, quando comparado ao haplótipo H15, considerando-se a distribuição geográfica, o haplótipo H16 ocorreu em 16 espécimes que estão distribuídos em sete das 11 ecorregiões apresentadas nesse estudo (NT0104, NT0106, NT0150, NT0151, NT0212, NT0704, e NT1304). A maior parte das populações (7), em que o haplótipo H16 foi observado estão localizadas no Nordeste da região Atlântica, enquanto as outras 4 populações onde esse haplótipo foi encontrado estão divididas entre a região do Chiquitano (2) e o Brasil Central (2).

3.4 Distribuição dos haplótipos em relação às variedades de *Anadenanthera*

De maneira geral, a rede de haplótipos reflete os clados formados na árvore da análise Bayesiana. Pode-se observar a formação de um ribogrupo variedade específico (ribogrupo I), no qual todos os haplótipos desse ribogrupo (H8, H9, H10, H11, H12) pertencem à espécimes de *Anadenanthera colubrina* var. *colubrina*. Os haplótipos H2, H7 e H13 que compõem o ribogrupo II, e o haplótipo H14, único haplótipo do ribogrupo III, são de espécimes de *A. colubrina* var. *cebil*. O ribogrupo IV apresenta haplótipos das duas variedades da espécie *A. peregrina*. No ribogrupo V foram observados quatro haplótipos exclusivos de *A. peregrina* var. *falcata* (H1, H18, H19, H21), um haplótipo (H17) exclusivo de um espécime de *A. colubrina* var. *cebil*, dois haplótipos compartilhados por espécimes de *A. colubrina* var. *cebil*, e *A. peregrina* var. *falcata*, e um haplótipo (H20) compartilhado por espécimes das duas variedades de *A. peregrina*.

3.5 Diversidade genética

Com relação aos índices de diversidade genética dos ribogrupos, os valores obtidos foram relativamente altos para a diversidade haplotípica, variando de 0,64 no ribogrupo IV a 1,00 no ribogrupo II. A diversidade nucleotídica (π) apresentou valores baixos, que variam de 0,01 a 0,33, valores obtidos para ribogrupo V e ribogrupo II respectivamente (Tabela 4).

O teste de neutralidade D de Tajima apresentou valor negativo apenas para o ribogrupo IV (-1,16), porém não foi significativo. Os demais ribogrupos apresentaram valores positivos, também não significativos. O teste Fs de Fu apresentou valor negativo para o ribogrupo V, valores positivos para os demais ribogrupos, e nenhum resultado significativo.

As expectativas para teste D e Fs são quase zero em populações de tamanho constante. Valores negativos e significativos indicam uma expansão súbita no tamanho da população, enquanto valores positivos e significativos indicam processos como uma subdivisão da população ou pontos de estrangulamento recentes na população.

Não foi possível obter os índices de diversidade genética e dos testes de neutralidade para o ribogrupo III, uma vez que esse grupo é constituído por apenas duas sequências e um único haplótipo.

.

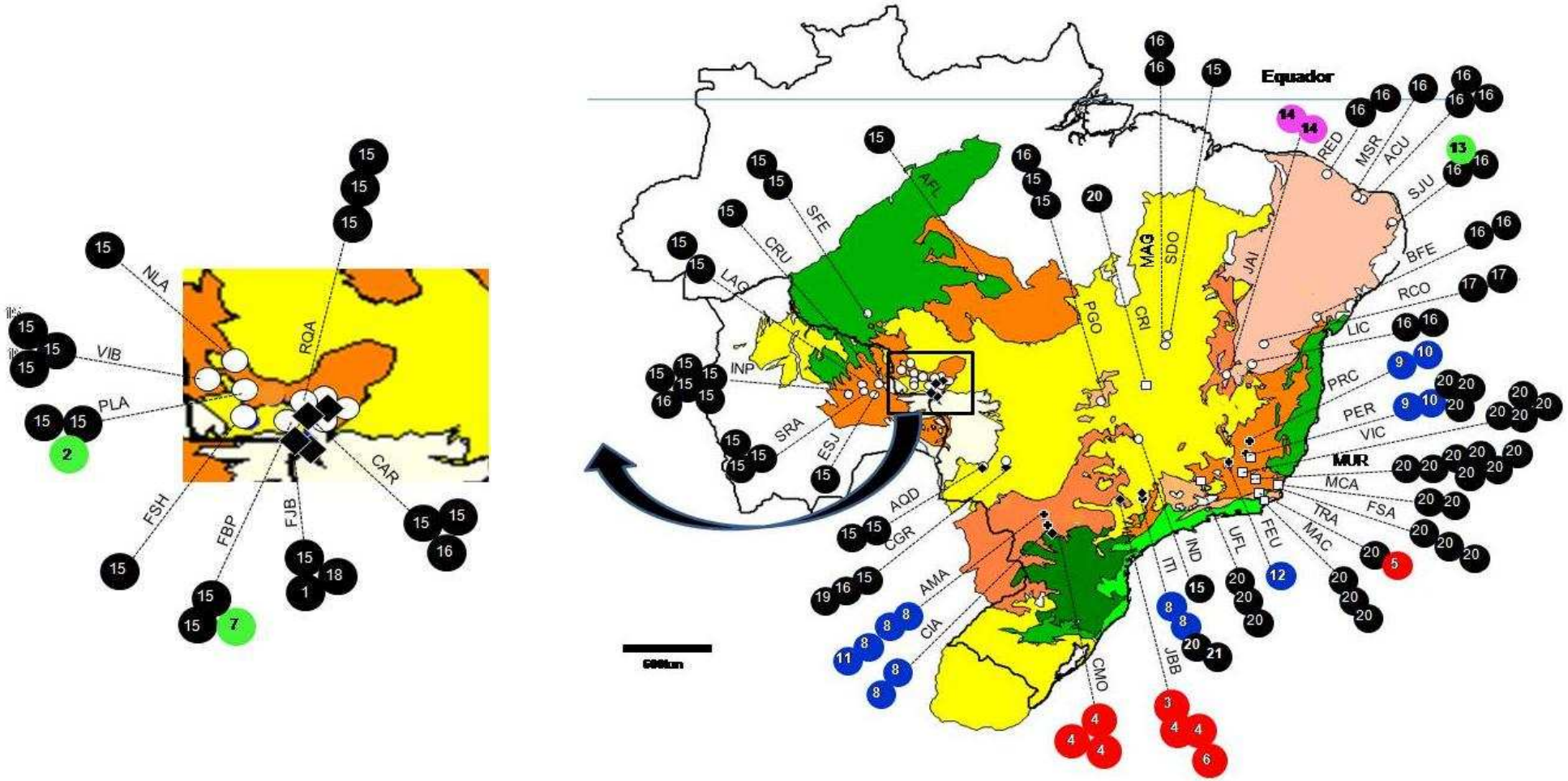

Figura 8. Distribuição geográfica dos 21 haplótipos de ITS de *Anadenanthera* Speg. Cada círculo representa um haplótipo; as cores dentro do círculo denotam os ribogrupos (azul, ribogrupo I; verde, ribogrupo II; rosa, ribogrupo III; vermelho, ribogrupo IV e preto, ribogrupo V). Populações estão representadas por códigos de três letras que correspondem aos códigos da Tabela 2.

Tabela 3. Distribuição dos 21 haplótipos de ITS obtidos a partir da análise de 115 sequências de *Anadenanthera* Speg. O número de populações, de sequências analisadas (N) e o número total de haplótipos (NH) encontrados por ecorregião são indicados.

Ecorregiões	**Número de Populações**	**N**	**Distribuição dos haplótipos**																					NH
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	21
NT0101	**1**	**3**				3																		1
NT0104	**9**	**29**									2	2		1				2				22		5
NT0106	**1**	**2**																2						1
NT0135	**2**	**3**															3							1
NT0150	**3**	**9**								5			1				2	1						4
NT0151	**1**	**3**													1			2						2
NT0160	**2**	**5**					1															4		2
NT0202	**1**	**2**														2								1
NT0212	**9**	**23**		1													20	2						3
NT0704	**12**	**28**	1		1	2		1	1	2							12	3		1	1	2	1	12
NT1304	**4**	**8**																6	2					2
TOTAL	**45**	**115**	1	1	1	5	1	1	1	7	2	2	1	1	1	2	37	18	2	1	1	28	1	

Tabela 4. Medidas de diversidade nucleotídica e testes de neutralidade para *as espécies de Anadenanthera* Speg. por ribogrupos da rede de haplótipos, estimadas a partir da região de ITS do genoma nuclear.

Grupos	Tamanho da amostra (N)	Número de haplótipos (H)	Diversidade haplotípica (H_d)	Diversidade nucleotídica (pi)	Número de sítios polimórficos (S)	Tajima's D	Fu's Fs
Total	115	21	0,81	0,09	131	-1,59	4,38
Ribogrupo I	13	5	0,70	0,03	10	1,50	2,07
Ribogrupo II	3	3	1,00	0,33	65	0	2,65
Ribogrupo III	2	1	0,00	0,00	0	0	0
Ribogrupo IV	8	4	0,64	0,03	15	-1,168	1,91
Ribogrupo V	89	8	0,69	0,01	6	1,18	-0,01

4. DISCUSSÃO

4.1 Atual circunscrição do gênero *Anadenanthera* Speg.

O gênero *Anadenanthera* Speg. foi criado por Spegazzini (1923) para acomodar as espécies *Piptadenia peregrina* (L.) Bentham e *P. falcata* Bentham, e já foi formalmente considerado como seção *Niopa* do gênero *Piptadenia* Benth. (Bentham 1840). Britton & Rose (1927) propuseram elevar toda a seção *Niopa* para um gênero, mas não reconheceram a prioridade do nome *Anadenanthera*. Brenan (1955), propôs a revisão do gênero *Piptadenia* e resgatou o nome *Anadenanthera* como um dos oito *gêneros* do "complexo Piptadenia". *Anadenanthera* sensu Brenan é circunscrito como quatro espécies distintas: *A. colubrina* (Vell.) Brenan*, A. macrocarpa* (Benth.) Brenan*, A. peregrina* (L.) Speg. *e A. falcata* (Benth.) Speg.

A espécie *A. peregrina* foi descrita por Linneu em 1753 como *Mimosa peregrina*, e posteriormente alocada na seção *Niopa* como *Piptadenia peregrina* por Bentham em 1841. Mais tarde, Britton e Rose em 1928, elevaram essa seção a gênero nomeando a espécie como *Niopa peregrina* e Brenan (1955), resgata o nome genérico *Anadenanthera* reconhecendo a espécie *A. peregrina.*

A. colubrina foi primeiramente descrita como *Mimosa colubrina* por Vellozo em 1835 na Flora Fluminensis, Bentham transferiu essa espécie

para o gênero *Piptadenia* em 1841 que foi reconhecida por Brenan (1955) no gênero *Anadenanthera*.

As espécies *A. falcata* e *A. macrocarpa* foram descritas por Bentham em 1841 no gênero *Piptadenia*. Spegazzini (1923) transferiu *P. falcata* para *A. falcata*, e *P. macrocarpa* foi reconhecida como *A. macrocarpa* por Brenan (1955).

Altschu (1964) considera o gênero Anadenanthera composto por duas espécies: *A. colubrina* e *A. peregrina*, ambas com duas variedades cada, *A. colubrina* (Vell.) Brenan var*. colubrina*, *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul*, A. peregrina* (L.) Speg. var. *peregrina e A. peregrina*. var. *falcata* (Bentham) Altschul.

A topologia da árvore gerada pela análise Bayesiana com dados de ITS não suportou essas divisões, pois esperava-se apresentação de dois clados distintos separando *A. colubrina* de *A. peregrina*, com subconjuntos desses clados em concordância com Altshul (1964) ou a apresentação de quatro clados concordando com a divisão de Brenan (1955). Mas o que se observa é que apenas os espécimes da var. *colubrina* (Clado I, Figura 4) formaram um clado consistente (96% PP), podendo ser considerado até como uma espécie distinta dos demais, corroborando a espécie *A. colubrina*, reconhecida por Brenan (1955) como sendo uma espécie sem variedades, uma vez que os espécimes que compõem o clado I parecem ter se diversificado primeiro que os demais clados.

Todas as populações amostradas no clado I estão distribuídas na região Atlântica. Apesar de terem sido amostradas 22 populações na região do Chiquitano (NT0212 e NT0135) nenhum espécime da var. *colubrina* foi

coletado. Em um estudo sobre o gênero *Anadenanthera,* Altschul (1964) cita que Luetzelberg (1922) e Souza (1945) registraram a ocorrência dessa variedade na Caatinga Arbórea, em matas ribeirinhas do Piauí, ao Nordeste da Bahia e nas montanhas do extremo Nordeste do Brasil. No entanto, ao examinar esses espécimes, Altschul concluiu que se tratava de espécimes da var. *cebil*. Queiroz (2009) relata que essa variedade é menos comum na Caatinga, apresentando uma distribuição mais contínua ao longo da Cadeia do Espinhaço (Bahia e Espírito Santo), matas de planalto do sudeste (São Paulo e norte do Paraná) e cerradões do Brasil Central. Apesar dos esforços em amostrar todas as áreas de ocorrência dessa espécie não foi possível obter amostras da var. *colubrina* em nenhuma das populações amostradas nesse estudo para a região do Brasil Central ou Nordeste da região Atlântica. É necessária, ainda, uma maior amostragem abrangendo um maior número de populações do Brasil Central e Bahia, para que maiores inferências possam ser feitas a respeito dessa variedade.

Outros dois pequenos clados formados, também apresentaram altos valores de probabilidade posterior (100%PP) e separam alguns espécimes de *A. peregrina* var. *peregrina* e var. *falcata* em um clado e *A. colubrina* variedade *cebil* em outro. Entretanto, a politomia do clado IV reúne sequências dessas três variedades, sendo esse clado fracamente suportado (63%).

Como evidenciado na análise de filogeografia e pelos índices de diversidade e neutralidade, os espécimes que compõem o clado IV provavelmente são bastante recentes na historia evolutiva do gênero, em comparação com os membros dos demais clados. Possivelmente ainda não

houve tempo para acumular mutações suficientes na região do rDNA para que ocorra diferenciação e seja possível separá-los. De acordo com Yuan & Olmsted (2008), em espécies com diversificação rápida e recente, o tempo de divergência entre as espécies é muito curto para a perda do polimorfismo ancestral.

A separação de *A. colubrina* e *A. peregrina* foi observada nos estudos de Luckow *et al.* (2003) e Jobson e Luckow (2007), porém, esses trabalhos não eram exclusivos de *Anadenanthera* e poucas sequências de poucos indivíduos foram utilizadas no estudo.

Diante dos resultados apresentados, é necessário, portanto, incluir sequências de outras regiões do genoma, e realizar uma reavaliação de caracteres morfológicos, para que, somados aos dados de ITS, possam auxiliar na resolução da politomia apresentada para esse gênero, e inferir com mais precisão sobre a circunscrição do gênero.

4.2 Linhagens divergentes para *Anadenanthera*

Os dados na análise de filogeografia mostram a formação de cinco grupos separados entre si por muitos passos de mutação, organizados em torno de haplótipos hipotéticos (extintos ou não amostrados) (Figura 7). Isso sugere que a separação entre essas linhagens é antiga. Como conseqüência essas linhagens divergentes provavelmente for c submetidas a contrastantes histórias demográficas.

4.3 Evidências de expansão recente

O ribogrupo V corrobora a grande politomia apresentada na árvore gerada a partir da análise Bayesiana. Esse ribogrupo engloba os três haplótipos com as maiores frequências (H15, H16, H20) interligados com haplótipos únicos e hipotéticos que se separam por apenas um evento de mutação, formando uma estrutura central em forma de cubo. Esta configuração, somada a ampla distribuição dos haplótipos desse grupo por quase todas as ecorregiões, ao baixo índice de diversidade nucleotídica (0,01) e ao índice negativo, embora não significativo, obtido pelo teste de neutralidade (Fu's Fs = -0,017), sugerem um cenário de expansão a longa distância rápida e recente.

4.4 Baixa diversidade genética na região do Chiquitano X Alta diversidade genética na região Atlântica

Os resultados mostram que a diversidade gênica para *Anadenanthera* na região Atlântica é maior que na região do Chiquitano. Este resultado corrobora o observado para *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson (Oliveira *et al.* 2010) e para *Cedrela fissilis* Vell. (Garcia 2010). No entanto, apesar de menor diversidade genética na região do Chiquitano quando comparada a região Atlântica, *Anadenanthera* apresentou quatro haplótipos de ITS exclusivos para essa região, diferente do padrão monomórfico observado por Oliveira *et al.* (2010) para *C. ipecacuanha*.

Estudos sugerem que as florestas secas da região do Chiquitano tenham surgido há aproximadamente nove mil anos (Burbridge *et al.* 2004; Mayle 2004) indicando uma origem muito recente para essas florestas. Isso é confirmado por estudos palinológicos que registraram diferente composição florística nessa região para o Pleistoceno e a vegetação atual. A presença de *Anadenanthera* é mais recente, foi registrada a partir do Holoceno e não no Pleistoceno (Anhuf 2006). Esses estudos palinológicos têm sido utilizados como argumentos contra a teoria do "Arco Pleistocênico" (Mayle 2004; 2006). Um dos principais argumentos é a ausência de registro palinológico para espécies de *Anadenanthera* na região durante o Pleistoceno, uma vez que *A. colubrina* var*. cebil* foi considerada por Prado e Gibbs (1993) e Pennington *et al.* (2000) como espécie modelo de ocorrência em toda a extensão do Arco Pleistocênico. Nesse sentido, a ausência de pólen dessa espécie nos sedimentos do Pleistoceno e o surgimento, e contínua ocorrência, em sedimentos do Holoceno, sugerem uma ocupação mais recente para as Florestas Estacionais do que o proposto pelos autores dessa teoria.

Estudos de paleoecologia têm sugerido que a depressão periférica do lado Oeste do Cerrado foi muito mais influenciada pelas drásticas flutuações climáticas no Quaternário do que os platôs do lado leste, que apresentam solos mais ricos e que foram mais estáveis durante as flutuações climáticas (Ab'Saber e Brown 1979 *apud* Silva 1996).

Carnaval *et al.* (2009), a partir de estudos de modelagem paleoambiental associados a padrões filogeográficos, sugerem a existência de três áreas historicamente estáveis na região Atlântica que provavelmente

constituíram refúgios durante o Pleistoceno. O maior deles inclui o norte dos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia, os outros dois de tamanho menor estão localizados em Pernambuco e no Sudeste de São Paulo.

Carnaval e Moritz (2008) destacam que regiões com altos índices de diversidade podem ter resultado tanto de presença de refúgio naquele local, uma vez que a estabilidade durante as flutuações climáticas favorece a manutenção da diversidade genética, ou ainda que essa seja uma região intermediária recebendo imigrantes de refúgios adjacentes.

Três dos cinco ribogrupos da rede de haplótipos (ribogrupo I, III e IV) encontram-se distribuídos pelo sudeste da região Atlântica, não sendo observado o compartilhamento de haplótipos com populações das ecorregiões do Chiquitano. Esses ribogrupos se limitam as ecorregiões NT0101, NT0150, NT0104, NT0202 e NT0160, em uma extensão que vai desde o Paraná até a região do Vale do Rio Doce. Os elevados índices de diversidade gênica registrados para esses ribogrupos sugerem a existência de refúgios nessas áreas como proposto por Carnaval *et al.* (2009).

De acordo com Briggs (1984), a região onde um determinado grupo ocorreu na maior parte de sua história evolutiva é onde poderá ser encontrada a maior diversidade, sendo esse local considerado seu centro de diversidade. O sudeste da região Atlântica apresenta altos índices de diversidade genética, bem como o maior número de haplótipos (11 dos 21 referidos nesse trabalho), podendo, portanto, ser considerada o centro de diversidade do gênero *Anadenanthera*.

4.5 Conexões entre a região do Chiquitano e o Nordeste da região Atlântica: evidências de fluxo gênico histórico e recente

Os três haplótipos do ribogrupo II estão distribuidos entre a população SJU no nordeste da região Atlântica e as populações PLA e FBP da região do Chiquitano. Estes haplótipos são separados por muitos passos mutacionais, o que sugere um longo período de separação genética entre eles. A presença desses haplótipos em populações tão distantes geograficamente sugere fluxo gênico histórico com retenção de polimorfismo ancestral devido uma ligação entre essas duas áreas no passado.

Atualmente essas populações encontram-se geograficamente distantes e separadas por um corredor seco com vegetação aberta formado pelo Cerrado no Brasil Central que se conecta com a Caatinga no Nordeste do Brasil e o Chaco BA Bolivia/Paraguai/Argentina (Rizzini 1963; Oliveira-Filho e Ratter 1995)

Segundo Prado e Gibbs (1993) esse corredor diagonal seco já foi ocupado por uma Floresta Estacional de abrangência muito maior no passado do que as manchas observadas atualmente e que essas manchas são relictos resultantes de diversos eventos de expansão e retração dessas florestas devido a intensas oscilações climáticas ocorridas durante o Pleistoceno (Prado e Gibbs 1993, Pennignton *et al.* 2000).

Esse cenário, proposto pela teoria do Arco Pleistocênico, parece explicar a atual separação e baixa freqüência dos haplótipos do ribogrupo II, onde eventos vicariantes segregaram as populações do Chiquitano e do Nordeste da região Atlântica no passado, durante períodos de condições

climáticas desfavoráveis, propiciando um isolamento por longa distância entre essas populações, provavelmente contínuas no passado. Esse evento vicariante somado ao longo período de isolamento, explicariam os altos índices de diversidade entre os espécimes dessas populações.

No entanto, essa não é a única explicação para a atual distribuição desses haplótipos. Outra possibilidade é a ocorrência de eventos de migração e dispersão a longa distância entre os fragmentos de Floresta Estacional espalhados pelo Cerrado, em que os haplótipos intermediários entre essas populações podem ter sido extintos ou não puderam ser amostrados devido a baixa frequência em que se encontravam.

Os biogeógrafos costumam reconhecer três modos diferentes por meio dos quais os organismos conseguem se espalhar de uma área para a outra, sendo o mais fácil deles conhecido como corredor. Esse tipo de caminho pode incluir uma grande variedade de habitats, de tal forma que a maioria dos organismos encontrados nas duas extremidades do corredor enfrentarão pouca dificuldade em atravessá-lo. Desse modo, as duas pontas passam a ser quase idênticas em sua biota (Cox e Moore 2009).

O Cerrado apresenta manchas de Florestas Estacionais com variação no grau de umidade, florestas ribeirinhas e complexas faixas de transição entre savanas e Florestas Estacionais formando um mosaico (IBGE 1993; Oliveira-Filho e Ratter 1995, Silva e Bates 2002) que ocupa aproximadamente 24% do bioma (Silva e Bates 2002). Diversos trabalhos sugerem a existência de corredores florestais que funcionaram como rotas de migração no passado, entre a Amazônia e Floresta Atlântica (Rizzini 1963, Bigarella *et al.* 1975, Oliveira-Filho e Ratter 1995, Costa 2003). E esse

padrão de distribuição, indicando conexão pretérita entre a região do Chiquitano e o Nordeste da região Atlântica, observado para *Anadenanthera* já havia sido citado por Bigarella *et al*. (1975) e não é único, sendo também observado para outras espécies vegetais e animais, como por exemplo *Myroxillon, Vatairea macrocarpa, Pterogyne nitens,* algumas espécies de *Geoffroea* e *Acromyrmex rugosus rugosus* (Bigarella *et al.* 1975).

A genealogia gênica de *Anadenanthera* reforça o cenário de expansão recente discutido anteriormente e revela moderna conexão entre essas duas regiões. Isso é evidenciado, por exemplo, pela presença do haplótipo 17, que é derivado de um haplótipo amplamente distribuído na região do Chiquitano (H15), mas apresenta ocorrência exclusiva no nordeste da região Atlântica. O contrário também pode ser observado, com os haplótipos H18 e H16, sendo o primeiro exclusivo da região do Chiquitano e derivado do H16, muito frequente no nordeste da região Atlântica, além da presença de ambos haplótipos H15 e H16, em populações localizadas na região do Brasil Central (SDO, MAG, PGO, CGR).

4.6. Possível "padrão diagonal" para fluxo gênico entre espécies de *Anadenanthera*.

O fluxo gênico entre as populações de cada ribogrupo parece seguir um padrão diagonal, ocorrendo entre as populações do sudeste da região Atlântica e entre populações do Chiquitano, passando pelo corredor seco que ocupa o Brasil Central e o nordeste da região Atlântica.

A distribuição dos haplótipos observada na Figura 8 sugere que esse corredor seco central atua mais fortemente como uma barreira do fluxo gênico entre as populações do Chiquitano e Sudeste da região Atlântica, promovendo o contato entre o Chiquitano e o Nordeste da região Atlântica. Isso pode ser observado tanto na rede de haplótipos, quanto nos clados mais estáveis da análise Bayesiana, em que as sequências de espécimes da variedade *falcata* da região Atlântica, não se agruparam com as sequências dessa mesma variedade, provenientes da região do Chiquitano e também pela distribuição do haplótipo H16. Ramos *et al.* (2007) encontraram um padrão de distribuição semelhante, ao qual eles se referem como uma radiação Norte/Sul paralela em toda extensão do Cerrado para os haplótipos de *Hymeneae stigonocarpa*.

Nenhum haplótipo em comum foi observado entre as populações do nordeste e populações do sudeste da região Atlântica, sugerindo uma possível barreira ao fluxo gênico entre as populações do nordeste e sudeste da região Atlântica.

Alguns estudos mostram separação de populações da região nordeste em clados distintos das populações encontradas mais ao sul (Lira *et al.* 2003; Andrade *et al.* 2009) considerando-as como duas unidades distintas (Oliveira-filho *et al.* 2006). Porém, nesse trabalho, um menor número de populações foram amostradas no nordeste da região Atlântica, incluindo enclaves de florestas na Caatinga, quando comparada com o número de populações amostradas na parte sudeste da região Atlântica. Portanto, será necessário maior esforço amostral nessas regiões antes de se realizarem inferências sobre eventual barreira entre essas duas regiões.

Embora muitos autores tenham insistido em considerar dispersão e vicariância como hipóteses contraditórias onde um ou outro evento desempenharia um papel mais proeminente na evolução da diversidade (Prado e Gibbs 1993, Pennington *et al.* 2000, Auler *et al.* 2004; Mayle 2004, 2006), métodos de reconstrução da história biogeográfica tem mostrado que tanto a dispersão quanto a vicariância são permitidas para explicar a história evolutiva dos organismos (Ronquist 1997) como observado também para as espécies de *Anadenanthera*.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os dados de ITS confirmam a monofilia de *A. colubrina* var. *colubrina,* mas não sustenta a monofila dos demais táxons que constituem o gênero.
- A região Atlântica apresenta maior diversidade genética que a região do Chiquitano e pode ser considerada como centro de diversidade para *Anadenanthera*.
- Eventos de vicariância seguidos de repovoamento por eventos de dispersão a longa distância por espécimes de diferentes refúgios moldaram a historia evolutiva de *Anadenanthera*.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akaike, H. 1973. Information theory and an extension of maximum likelihood principle. In: Petrov, B.N.; Csaki, F. (Eds.), *Second International Symposium on Information Theory*. Akademiai Kiado, Budapest, pp. 267–281.

Altschul, S. von R. 1964. A taxonomic study of the genus *Anadenanthera*. *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard Universit* 193: 1-65.

Andrade, I.M.; Mayo, S.J.; Van Den Berg, C.; Fay, M.F.; Chester, M.; Lexer, C.; Kirkup, D. 2009. Genetic variation in natural populations of *Anthurium sinuatum* and *A. pentaphyllum* var. *pentaphyllum* (Araceae) from north-east Brazil using AFLP molecular markers. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159: 88–105.

Andreasen, K. 2005. Implications of molecular systematic analyses on the conservation of rare and threatened taxa: Contrasting examples from Malvaceae. *Conservation Genetics* 6: 399-412.

Anhuf, D.; Ledru, M.P.; Behling, H.; Da Cruz, Jr. F.W.; Cordeiro, R.C.; Van der Hammen, T.; Karmann, I.; Marengo, J.A.; De Oliveira, P.E.; Pessenda, L.; Siffedine, A.; Albuquerque, A.L.; Da Silva Dias, P.L. 2006. Paleo-

environmental change in Amazonian and African rainforest during the LGM. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 239: 510-527.

Auler, A. S.; Wang, X.; Edwards, R.L.; Cheng, H.; Cristalli, P.S.; Smart, P.L.; Richards, D.A. 2004. Palaeoenvironments in semi-arid northeastern Brazil inferred from high precision mass spectrometric speleothem and travertine ages and the dynamics of South American rainforests. *Speleogenesis and Evolution of Karst Aquifers* 2: 1-4.

Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species.* Harvard University Press, Cambridge. 447p.

Baldwin, B.G; Sanderson, M.J.; Porter, J.M.; Wojciechowski, M.F.; Campbell, C.S.; Donoghue, M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.

Bandelt, H.J.; Forster, P.; Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.

Baum, D.A.; Small, R.L.; Wendel, J.F. 1998. Biogeography and floral evolution of baobabs (*Adansonia*, Bombacaceae) as inferred from multiple data sets. *Systematic Biology* 47: 181–207.

Bermingham, E.; Moritz, C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7: 367-369.

Bigarella, J.J.; Andrade-Limam, D.; Riehs, P.J. 1975. Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 47(suplemento): 411-464.

Brenan , J.P.M. 1955. Notes on Mimosoideae I. Kew Bulletin 2: 170-183.

Briggs, J.C. 1984. Centers of Origin in Biogeography. *Biogeographical Monographs* 1: 1-79.

Burbridge, R.E.; Mayle, F.E.; Killeen, T.J. 2004. Fifty-thousand-year vegetation and climate history of Noel Kempff Mercado National Park, Bolivian Amazon. *Quaternary Research* 61: 215-230.

Carnaval, A.C.; Hickerson, M.J.; Haddad, C.F.B.; Rodrigues, M.T.; Moritz, C. 2009. Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science* 323: 785-789.

Carnaval, A.C.; Moritz, C. 2008. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35: 1187-1201.

Carvalho, P.E.R. 2003. *Espécies Arbóreas Brasileiras*. Vol. 1, Embrapa Florestas. 1040 p.

Constantino, R.; Britez, R.M.; Cerqueira, R.; Espindola, E.L.G.; Grelle, C.E.V.; Lopes, A.T.L.; Nascimento, M.T.; Rocha, O.; Rodrigues, A.A.F.; Scariot, A.; Sevilha, A.C.; Tiepolo, G. 2003. Causas Naturais. Pp. 43-64 In: D.M., Rambaldi e Oliveira, D.A.S. (Orgs.). *Fragmentação de Ecossistemas: Causas, Efeitos sobre a Biodiversidade e Recomendações de Políticas***.** Biodiversidade 6, MMA/SBF, Brasília.

Costa, L.P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography* 30: 71-86.

Cox, C.B.; Moore, P.D. 2009. *Biogeografia – uma abordagem ecológica e evolucionária.* 7ª edição. 398p**.**

Excoffier, L.; Lawlor, S.; Schhneider, S. 2005. Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.

Ferraz, J.S.F.; Albuquerque, U.P.; Meunier, I.M.J. 2006. Valor de uso e estrutura da vegetação lenhosa às margens do riacho do Navio, Floresta, PE, Brasil. *Acta Botanica Brasílica* 20: 125 – 134.

Garcia, M.G. 2010. História evolutiva de *Cedrela fissilis* Vell. (Maliaceae)e species relacionadas em Florestas Estacionais. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa. 96p.

IBGE, 2004. *Mapa de vegetação do Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*, Rio de Janeiro.

Jobson, R.W.; Luckow, M. 2007. Phylogenetic study of the genus *Piptadenia* (Mimosodeae: Leguminosae) using plastid *trnL-F* and *trnK/matK* sequence data. *Systematic Botany* 32: 569–575.

Karehed, J.; Groeninckx, I.; Dessein, S.; Motley, T.J.; Bremer, B. 2008. The phylogenetic utility of chloroplast and nuclear DNA markers and the phylogeny of the Rubiaceae tribe Spermacoceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 843-866.

Kimura, M. 1969. The number of heterozygous nucleotide sites maintained in a finite population due to steady flux of mutations. *Genetics* 61: 893-903.

Ledru, M. 1993. Late quaternary environmental and climatic changes in central Brazil. *Quaternary Research* 39: 90-98.

Lewis, G.P.; Schrire, B.; Mackinder, B.; Lock M. 2005. *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew. 577p.

Librado, P.; Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Lira, C.F.; Cardoso, S.R.S.; Ferreira, P.C.G.; Cardoso, M.A.; 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.

Lorenzi, H. 2002. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil***.** vol 1, 4º ed, São Paulo: Plantarum. 368p.

Luckow, M.; Millar, J.T.; Murphy, D.J.; Livshultz, T. 2003. A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. In: Klitgaard, B.B. e Bruneau, A. (ed.). *Advances in Legume Systematics,* part 10, Higher level Systematics. Pp.197-220. Royal Botanic Gardens, Kew.

Mayle, F.E. 2004. Assessment of the Neotropical dry forest refugia hypothesis in the light of palaeoecological data and vegetation model simulations. *Journal of Quaternary Science* 19: 713-720.

Mayle, F.E. 2006. The Late Quaternary biogeographic history of South American seasonally dry tropical forests: insights from palaeoecological data. In: Pennington, R.T.; Lewis, G.P.; Ratter, J.A. (eds.), Neotropical Savannas and Dry Forests: Plant Diversity, Biogeography and Conservation. pp. 395-

416. Systematics Association, special volume, no. 69. CRC Press, Taylor & Francis.

Miles, L.; Newton, A.C.; Defries, R.S.; Ravilious, C.; May, I., Blyth, S.; Kapos, V.; Gordon, J.E. 2006. A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *Journal of Biogeography 33*: 491-505.

Morim, M.P. 2010. *Anadenanthera in* **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (*http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB022782*).

Moritz, C. 1995. Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 349:113-118.

Nylander, J.A.A. 2004. MrModeltest v2.Computer program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Oliveira, L.O.; Rossi, A.A.B.; Martins, E.R.; Batista, F.R.C.; Silva, R.S. 2010. Molecular phylogeography of *Carapichea ipecacuanha*, an amphitropical shrub that occurs in the understory of both semideciduous and evergreen forests. *Molecular Ecology* 19: 1410-1422.

Oliveira-Filho, A.T.; Ratter, J.A. 1995. A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edinburgh Journal of Botany* 52: 141– 194.

Oliveira-Filho, A.T.; Jarenkow, J.A.; Rodal M.J.N.; 2006. Floristic relationships of seasonally dry forests of eastern South America based on tree species distribution patterns. In: Pennington, R.T., Ratter, J.A., Lewis, G.P. (Eds), Neotropical Savannas and Seasonally Dry Forests: *Diversity, Biogeography and Conservation*, CRC Press, Boca Raton, pp. 159-192.

Olson, D.M.; Dinerstein, E.; Wikramanayake, E.D.; Burgess, N.D.; Powell, G.V.N.; Underwood, E.C.; D'Amico, J.A.; Itoua, I.; Strand, H.E.; Morrison, J.C.; Louks, C.J.; Allnutt, T.F.; Ricketts, T.H.; Kura, Y.; Lamoreux, J.F.; Wettengel, W.W.; Hedao, P.; Kassem, K.R. 2001. Terrestrial ecoregions of the world: a new map of life on earth. *BioScience* 51: 933-938.

Paes, J.B.; Diniz, C.E.F.; Marinho I.V.; Lima, C.R. 2006. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro. *Cerne* 12: 232-238.

Pennington, R.T.; Prado, D.E.; Pendry, C.A. 2000. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography* 27: 261–273.

Pochettino, M.L.; Cortella , A.R.; Ruiz, M. 1999. Hallucinogenic snuff from northwestern argentina: Microscopical identification of *Anadenanthera colubrina* var. *Cebil* (Fabaceae) in powdered Archaeological material. *Economic Botany* 53: 127-134.

Polhill, R.M.; Raven, P.H.; Stirton, C.H. 1981. Evolution and systematics of the Leguminosae. Pp. 1-26. In: Polhill, R. M. e Raven, P. H. (Ed.). *Advances in Legume Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew, 1049p.

Prado, D.E.; Gibbs, P.E. 1993. Patterns of species distribution in the dry seasonal forest of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 902-927.

Price, E.W.; Carbone, I. 2005. SNAP: workbench management tool for evolutionary population genetic analysis. *Bioinformatics* 21: 402-404.

Queiroz, L.P. 2009. *Leguminosas da Caatinga*. Feira de Santana: Editora Universitária da UEFS. 443 p.

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.

Rizzini, C. T. 1963. Nota prévia sobre a divisão fitogeográfica (florístico-sociológica) do Brasil. *Revista Brasileira de Geografia* 25: 3-64.

Ronquist, F. 1997 Dispersal vicariance analysis: a new approach to the quantication of historical biogeography. *Systematic Biologists 46:* 195-203.

Ronquist, F.; Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Rossi, A.A.B.; Oliveira, L.O.; Venturini, B.A.; Silva, R.S.; 2009. Genetic diversity and geographic differentiation of disjunct Atlantic and Amazonian population of *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). *Genetica* 136: 57-67.

Sanchez-Azofeifa, G.A.; Quesada, M.; Rodriguez, J.P.; Nassar, J.M.; Stoner, K.E.; Castillo, A.; Garvin, T.; Zent, E.L.; Calvo-Alvarado, J.C.; Kalacska, M.E.R.; Fajardo, L.; Gamon, J.A.; Cuevas-Reyes, P. 2005. Research priorities for Neotropical dry forests. *Biotropica* 37: 477-485.

Silva, J.M.C. 1996. Distribution of Amazonian and Atlantic birds in gallery forests of the Cerrado region, South America. *Ornitologia Neotropical* 7: 1-18.

Silva, J. M. C.; Bates, J. M. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. *BioScience*. 52: 225–34.

Tamashiro, J.Y. 1989. Estudos taxonômicos e morfológicos do gênero *Piptadenia sensu* Bentham no sudoeste do Brasil: avaliação das modificações taxonômicas recentemente propostas**.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 100p.

Veloso, H.P. 1992. *Manual técnico da vegetação brasileira*. Rio de Janeiro: IBGE. 92 p. (Série Manuais Técnicos de Geociências, 1).

Veloso, H.P.; Rangel Filho, A.L.R.; Lima, J.C.A. 1991. *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal.* Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro.

White, T.J.; Bruns, T.D.; Lee, S.; Taylor, J.; 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.) *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, California, pp. 315-322.

Yuan, Y.W.; Olmstead, R.G. 2008. A species-level phylogenetic study of the Verbena complex (Verbenaceae) indicates two independent intergeneric chloroplast transfers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 23–33