

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO

Advaldo Carlos de Souza Neto

FILOGEOGRAFIA E FLUXO GÊNICO EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Caryocar*

Orientadora: Dr^a Rosane Garcia Collevatti

GOIÂNIA – GO
MARÇO - 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO

Advaldo Carlos de Souza Neto

FILOGEOGRAFIA E FLUXO GÊNICO EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Caryocar*

Orientadora: Dr^a Rosane Garcia Collevatti

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução para obtenção do título de Mestre.

GOIÂNIA – GO
MARÇO - 2012

ADVALDO CARLOS DE SOUZA NETO

FILOGEOGRAFIA E FLUXO GÊNICO EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Caryocar*

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Goiás, como
parte das exigências do Programa de
Pós-graduação em Ecologia e
Evolução para obtenção do título de
Mestre.

APROVADA: 12 de março de 2012

Alexandre Siqueira Guedes Coelho

José Alexandre Felizola Diniz Filho

Rosane Garcia Collevatti
(Orientadora)

*“E ainda que tivesse o dom da profecia,
e conhecesse todos os mistérios e toda
a ciência, e ainda que tivesse toda a fé,
de maneira tal que transportasse os
montes, e não tivesse Amor, nada
seria”.*

Paulo - I Epístola aos Coríntios

Dedico aos meus pais, Paulo César Vieira de Alencar e Edna de Souza Vieira de Alencar, pelo apoio constante.

Agradecimentos

Agradeço:

A Deus pela saúde e força que me ajudaram na superação de todas as dificuldades que cruzaram em meu caminho.

A meus amigos e familiares pela compreensão, carinho, apoio e companheirismo constantes.

A todos os professores que propiciaram meu desenvolvimento profissional e pessoal.

A minha orientadora, Professora Doutora Rosane Garcia Collevatti, pela confiança e atenção a mim depositados. Também a professora Doutora Mariana Pires Campos Telles, pela orientação inicial, bem como todos os professores que integram e integraram a equipe do Laboratório de Genética & Biodiversidade por ajudarem quando solicitados.

Ao Laboratório de Melhoramento de Plantas da Escola de Agronomia – UFG pela utilização do Sequenciador de DNA.

Ao Laboratório de Genética & Biodiversidade por fornecer o espaço de trabalho e os equipamentos necessários ao desenvolvimento do projeto.

Aos companheiros do Laboratório de Genética & Biodiversidade, em especial a minha grande amiga e companheira, a bióloga Natácia Evangelista de Lima, por fazer do ambiente de trabalho tão agradável, além das constantes ajudas e troca de experiências.

Aos amigos Rodrigo de Mello, Ludymila Barbosa Silva Guedes, Arthur Tavares de Oliveira Melo, Thais Guimarães de Castro e tantos outros pela presteza em auxiliar sempre que necessário nos traslados entre o ICB-UFG e a EA-UFG.

A equipe de técnicos do Laboratório de Genética & Biodiversidade por tornar o trabalho no laboratório mais simples.

A todos os meus companheiros da turma, em especial aos biólogos Bruno Bastos Gonçalves, Alessandro Ribeiro de Moraes, Rafael Félix de Magalhães e Amanda Vaz Rocha por tornarem a caminhada mais agradável.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

De todo meu coração, muito obrigado!

Resumo

O gênero *Caryocar* é composto por espécies arbóreas, distribuído na região neotropical. A maioria das espécies do gênero ocupa biomas florestais, porém três espécies se distribuem na diagonal seca que corta os dois biomas de floresta tropical brasileira sendo elas *C. brasiliense*, *C. coriaceum* e *C. cuneatum*. Entender o padrão filogeográfico dessas espécies pode ajudar na compreensão de eventos históricos responsáveis pelos padrões biogeográficos atuais da região. Nesse contexto, o objetivo de nosso estudo foi avaliar a variabilidade genética existente nas espécies que ocupam a diagonal seca brasileira, observar como ela se encontra distribuída nas populações amostradas e a partir dos dados tentar construir uma hipótese filogeográfica para a origem dessas espécies. Foram sequenciadas duas regiões do genoma cloroplastidial, trnH-psbA e trnC-ycf6, de nove espécies do gênero *Caryocar*, para a melhor compreensão da origem do grupo da diagonal seca em relação às espécies que ocupam biomas de florestas tropicais. Foram inferidos os índices de diversidade genética; a relação de parentesco entre as espécies por meio de uma rede de haplótipos e de uma árvore filogenética Bayesiana; a estrutura genética das populações; mudanças demográficas históricas; e por fim, o cálculo dos tempos de divergência do grupo em interesse foi realizado por meio da metodologia baseada na teoria de coalescência. Foram analisados 785 pares de base e foram encontrados 23 haplótipos, alguns deles compartilhados entre espécies, demonstrando a possibilidade de retenção de polimorfismo ancestral ou hibridização entre as espécies do gênero. As espécies apresentaram baixos índices de diversidade genética, e foi encontrada estruturação dessa variabilidade na espécie *C. brasiliense* ($\Phi_{ST} = 0,363$). No geral, não houve evidências de grandes mudanças demográficas históricas nas espécies em estudo. As populações do limite norte e oeste da distribuição de *C. brasiliense* apresentaram evidências de que podem ter funcionado como fonte de migrantes para as demais populações. A datação dos períodos de divergência revelou que o grupo da diagonal seca se originou por volta de 2,48 milhões de anos (Ma) atrás, e o ancestral das espécies *C. cuneatum* e *C. coriaceum* surgiu por volta de 1,21 Ma, sugerindo um possível efeito das glaciações pleistocênicas na distribuição atual das espécies.

Abstract

The genus *Caryocar* is formed by tree species and is distributed in the neotropical region. Many species of the genus are found in forested biomes, but three species are found in the dry diagonal that cuts the two Brazilian biomes of tropical forests: *C. brasiliense*, *C. coriaceum* and *C. cuneatum*. Understand the phylogeographic pattern of these species may help to comprehend the historic events responsible for the actual biogeographic patterns of the region. In this context, the aim of our study was evaluate the genetic variability of the species that are found in the Brazilian dry diagonal, observe how it's distributed in the sampled populations and, from the data, try to construct a phylogeographic hypothesis for the origin of these species. We sequenced two chloroplastic regions, trnH-psbA and trnC-ycf6, from nine species of the genus *Caryocar*, for a better understanding of the dry diagonal group origin relative to the species that are found in the tropical forests biomes. We inferred the genetic diversity indices; the relationship between the species, using a network and a Bayesian phylogenetic tree; and we inferred the Time to the Most Recent Common Ancestor of the groups of interest using coalescence based methods. We analyzed 785 base pairs and found 23 haplotypes, some of them are shared between species, demonstrating the possibility of incomplete lineage sorting or hybridization between species of the genus. The species presented low genetic diversity indices, and we found genetic structure in the *Caryocar brasiliense* populations. The populations from the northern and western threshold of the *C. brasiliense* distribution presented evidences that they may have functioned as a source of migrants to the other populations. The date of the divergence time reveals that the dry diagonal group has originated around 2,48 millions years before present, and the ancestor of the *C. coriaceum* e *C. cuneatum* appeared around 1,21 million years before present, at the beginning of the glacial periods, at Pleistocene. It suggests that these glacial periods had influenced the actual distribution of the species.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Filogeografia.....	01
1.2. Biogeografia dos biomas florestais brasileiros e da diagonal seca que os corta.....	06
1.3 Espécies de estudo.....	14
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivos geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. HIPÓTESES.....	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1. Coleta de material biológico.....	24
4.2. Obtenção de dados moleculares.....	24
4.3. Análise de dados.....	27
5. RESULTADOS.....	31
5.1. Variações nas sequências e diversidade genética.....	31
5.2. Reconstruções filogenéticas.....	33
5.3. Estrutura genética, demografia e coalescência.....	38
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÃO.....	51
8. PERSPECTIVAS.....	52
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
10. ANEXOS.....	65

Lista de figuras

Figura 1. Mapa de ocorrência de quatro espécies do gênero <i>Caryocar</i> (modificado de Prance & Silva, 1973).....	17
Figura 2. Mapa de ocorrência de seis espécies do gênero <i>Caryocar</i> (modificado de Prance & Silva, 1973).....	18
Figura 3. Mapa de ocorrência de três subespécies de <i>Caryocar glabrum</i> (modificado de Prance & Silva, 1973).....	19
Figura 4. Mapa de ocorrência de <i>Caryocar microcarpum</i> (modificado de Prance & Silva, 1973).....	20
Figura 5. Mapa de ocorrência de <i>Caryocar costaricense</i> (modificado de Prance & Silva, 1973).....	20
Figura 6. Pontos de coleta das populações utilizadas no trabalho e sua localização referente aos biomas brasileiros. * Populações coletadas, mas não utilizadas no trabalho.....	25
Figura 7. Árvore filogenética bayesiana (consenso da maioria) representando a relação filogenética dicotômica entre os indivíduos utilizados no trabalho. Probabilidade posterior representada.....	35
Figura 8. Rede de haplótipos das espécies do gênero <i>Caryocar</i> . Círculos em vermelho correspondem aos haplótipos não amostrados ou extintos. Números em vermelho representam a quantidade de passos mutacionais que separam os dois haplótipos.....	36
Figura 9. Árvore de coalescência e tempos de divergência das espécies estudadas. Bolas em azul e amarelo indicam indivíduos de <i>C. coriaceum</i> e <i>C. villosum</i> respectivamente.	45

Lista de tabelas

Tabela 1. Indivíduos e populações coletadas. * - Populações sem sequências.....	26
Tabela 2. Reagentes e concentrações utilizados nas reações de PCR.....	27
Tabela 3. Índices de diversidade na espécie <i>C. brasiliense</i> DP – desvio padrão.....	32
Tabela 4. Índices de diversidade na espécie <i>C. cuneatum</i> . DP – desvio padrão.....	33
Tabela 5. Lista de haplótipos e frequência nas populações.....	37
Tabela 6. Valores de Φ_{ST} par a par entre as espécies do gênero <i>Caryocar</i> Diagonal superior: índices Φ_{ST} ; Diagonal inferior: significância (* - significativo; ns – não significativo).....	38
Tabela 7. Valores de Φ_{ST} par a par entre as populações de <i>Caryocar</i> da diagonal seca. Diagonal superior: índices Φ_{ST} ; Diagonal inferior: significância (* - significativo; ns – não significativo).....	41
Tabela 8. Índices demográficos das populações da diagonal seca brasileira. ICi – intervalo de credibilidade inferior; ICs – intervalo de credibilidade superior.....	42
Tabela 9. Índices demográficos das populações de <i>C. brasiliense</i> baseados na abordagem de coalescência por metodologia Bayesiana. ICi – intervalo de credibilidade inferior; ICs – intervalo de credibilidade superior.....	42
Tabela 10. Índices demográficos das populações de <i>C. cuneatum</i> baseados na abordagem de coalescência por metodologia Bayesiana. ICi – intervalo de credibilidade inferior; ICs – intervalo de credibilidade superior.....	42
Tabela 11. Número de migrantes por geração entre as populações de <i>C. brasiliense</i> baseados na abordagem de coalescência por metodologia Bayesiana. As populações fontes estão nas colunas e as receptoras nas linhas.....	43
Tabela 12. Número de migrantes por geração entre as populações de <i>C. cuneatum</i> baseados na abordagem de coalescência por metodologia Bayesiana. As populações fontes estão nas colunas e as receptoras nas linhas.....	43

1. Introdução

1.1 Filogeografia

A filogeografia, como termo consolidado, é um campo de estudo relativamente novo na ciência, tendo como base para a sua consolidação os artigos de Avise e colaboradores (1987) e Avise (1989), embora esteja fundamentada em ideias de biogeografia histórica entre outras linhas pré-existentes. Nesses artigos os autores definiram a Filogeografia como: “o campo de estudo preocupado com os princípios e os processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas, especialmente aquelas a nível intraespecífico”. Ao estudar esse padrão de distribuição da variabilidade genética podemos associá-los a eventos biogeográficos que podem ser responsáveis em causar nas populações eventos de vicariância que impediram o fluxo gênico no passado. Essa quebra pode ser causada por, por exemplo, mudanças climáticas em grandes escalas (tais como as glaciações), surgimentos de barreiras físicas como rios, cordilheiras, etc. (e. g. Ramos *et al.*, 2007; Antonelli *et al.*, 2009; veja também Avise, 2009). Além disso, a extinção desse tipo de barreiras climáticas ou físicas podem causar o contato secundário de diferentes linhagens evolutivas, e o efeito desses eventos podem influenciar a demografia de determinadas populações (Emerson *et al.*, 2001; e. g. Beheregaray *et al.*, 2003). Para atingir tais objetivos, a filogeografia necessita de conhecimentos advindos da genética molecular, genética de populações, filogenética, geografia histórica, etologia e demografia das populações, sendo, portanto, um campo multidisciplinar (Avise, 1998).

Nesses quase 25 anos de consolidação do tema, o número de pessoas interessadas aumentou grandemente, com reflexo direto no número de trabalhos publicados (Avise, 1998; Beheregaray, 2008). Em sua revisão sobre o tema, Beheregaray (2008) constatou algumas tendências no estudo de filogeografia, tais como grande parte dos estudos serem classificados primariamente a categorias de ecologia e evolução (embora com diversas ramificações em diversas áreas); o auxílio da filogeografia no incremento de áreas como paleoclimatologia, paleontologia e geomorfologia (com muitos

estudos relacionados aos cenários de diversificação relacionados temporalmente com períodos do Quaternário); a concentração de estudos com taxa de vertebrados, especialmente mamíferos, e a lacuna de estudos com invertebrados e uma pequena representatividade de estudos com plantas.

Devido a essa característica, a grande maioria dos estudos em filogeografia foi realizada com DNA mitocondrial (revisado em Beheregaray, 2008), que possui uma taxa de evolução mais rápida que o DNA nuclear em animais. A revisão de Beheregaray (2008) mostra que em plantas a maioria dos estudos são desenvolvidos utilizando-se de marcadores advindos do DNA cloroplastidial, sendo 88% dos estudos feitos com espécies com distribuição no hemisfério norte do globo. Alguns estudos também são realizados com outros tipos de marcadores tais como AFLP (e. g. Kauserud *et al.*, 2006), SSR (e. g. Walser *et al.*, 2005), ou aloenzimas (e. g. Burton & Lee, 1994).

Com o crescimento do interesse no campo da Filogeografia, novas abordagens metodológicas e, portanto, novas filosofias de trabalho foram desenvolvidas ao longo do tempo. Diversos fatores influenciaram o desenvolvimento dessas abordagens. Um deles foi o incremento da capacidade computacional nos últimos anos, que proporcionou a utilização de novas metodologias de análise que tornaram possível a utilização de metodologias de análise anteriormente incapazes de serem realizadas, tais como aquelas baseadas em máxima verossimilhança e estatística Bayesiana (e. g. Knowles, 2004). Além disso, o incremento no conhecimento de biologia molecular, tais como o surgimento de novos marcadores, o desenvolvimento das técnicas de sequenciamento de DNA e o melhor conhecimento do genoma de inúmeros organismos modelo, propiciaram o aumento da quantidade e da qualidade de informação genética utilizadas para a análise filogeográfica (e. g. Hare, 2001; Allendorf *et al.*, 2010).

A teoria da coalescência (Kingman, 1982; Watterson, 1984; Donnelly & Tavaré, 1986; Hudson, 1990) foi uma das metodologias de análise que influenciou o desenvolvimento da filogeografia (Avice, 1996). A utilização de genealogias coalescentes torna-se útil devido à limitação de alguns parâmetros descritivos em elucidar a história evolutiva de uma população, oferecendo uma estimativa mais realista do tamanho efetivo, taxa de expansão entre outros parâmetros (Kuhner, 2008) isso porque, por exemplo, o tempo de coalescência

nas genealogias tende a ser maior em populações com maiores tamanhos efetivos (Avice, 2009).

Nesse contexto uma nova abordagem de análise filogeográfica foi se consolidando: a filogeografia estatística (Knowles & Maddison, 2002; Knowles, 2004, Knowles 2009). Essa abordagem reforça a dualidade existente: entre a ‘filogeografia clássica’ (revisado em Avice, 1998) onde predominava a descrição de resultados baseados quase que diretamente em árvores gênicas de um único loco, de maneira qualitativa, combinadas com análises espacialmente explícitas e a análise filogeográfica de clados aninhados – NCPA (revisado em Hickerson *et al.*, 2010); com a metodologia de testes de hipóteses, nas quais as genealogias se tornam ferramentas para a inferência de parâmetros utilizando-se de abordagens estatísticas (e. g. Rosenberg & Nordborg, 2002; Kuhner, 2008). Nesse contexto, algumas metodologias consideradas descritivas são duramente rebatidas pelos adeptos da filogeografia estatística (e. g. Knowles & Maddison, 2002; Knowles, 2008) onde a estocasticidade presente em cada árvore gênica, não considerada adequadamente em métodos que se utilizam de genealogias de loco único, é uma das principais fontes de erro desse tipo de abordagem (Knowles, 2004) embora seja possível a utilização de mais de um loco na análise de clados aninhados (Templeton, 2009b). O debate ainda existe na literatura (Beaumont & Panchal, 2008; Garrick *et al.*, 2008; Knowles, 2008; Templeton, 2004, 2008, 2009a,b, 2010), mas sem dúvida o uso de testes de hipótese tem sido reconhecido e o campo de estudo tem se tornado mais rigoroso estatisticamente.

O uso de marcadores moleculares tem ajudado a observar padrões de estruturação geográfica da variabilidade genética. A interação dessas informações com o arcabouço teórico e metodológico de áreas afins, tais como a biogeografia e a ecologia, torna mais fácil a compreensão dos fatores históricos e / ou ecológicos responsáveis pela estruturação observada atualmente (Diniz-Filho *et al.*, 2008). Alguns autores buscam desenvolver metodologias para que o componente geográfico seja mais explorado nas análises filogeográficas (Knowles & Carstens, 2007; Chan *et al.*, 2011). Além disso, a utilização de modelos de distribuição potencial de espécies utilizando dados climáticos do passado tem sido uma abordagem que tem se

desenvolvido nos últimos anos (e. g. *Martínez-Meyer et al.*, 2004; *Peterson et al.*, 2004) e diversas metodologias vêm sendo descritas para integrar as duas abordagens (e. g. *Richards et al.*, 2007; *Knowles et al.*, 2007).

Segundo *Waltari e colaboradores* (2007) a utilização da abordagem de inferência da distribuição potencial no passado pelos modelos baseados em conservação de nicho ecológico, juntamente com dados filogeográficos, é uma abordagem bastante interessante para inferir a localização de refúgios nos períodos de glaciação, de modo que em muitos casos existe congruência entre ambos os métodos. Embora a utilização da modelagem de nicho tenha como pressuposto a conservação de nicho e que pode ter a presença de várias fontes de erro (*Araújo & Guisan*, 2006), a abordagem tem se mostrado promissora e hoje podemos encontrar vários trabalhos utilizando-a (e. g. *Hugall et al.*, 2002; *Carstens & Richards*, 2007) demonstrando o potencial dessa metodologia. Alguns autores têm ido além, propondo metodologias para a utilização da abordagem de distribuição potencial em tempos específicos no passado juntamente com a filogeografia comparativa (*Carstens & Richards*, 2007), e trabalhos já podem ser encontrados com esse tipo de abordagem, onde o mesmo padrão biogeográfico é encontrado em várias espécies, tornando-o mais robusto (e. g. *Carnaval et al.*, 2009).

A abordagem da filogeografia comparativa tem sido bastante importante para a compreensão de padrões biogeográficos, pelo meio da comparação dos padrões filogeográficos de espécies que possuem distribuição comum. Congruências em padrões filogeográficos foram encontradas em alguns estudos (e. g. *Carnaval et al.*, 2009; *Burney & Brunfield*, 2009) e fortalecem a compreensão da evolução das comunidades em determinadas regiões, podendo ser útil também na predição de como mudanças climáticas futuras podem influenciar geneticamente, demograficamente e espacialmente a biodiversidade e auxiliar na escolha de áreas com maior história evolutiva única como prioridades para conservação (revisado em *Bermingham & Moritz*, 1998; *Hickerson et al.*, 2010). Seus métodos de análise ainda estão em desenvolvimento, porém novas metodologias estão se mostrando eficientes na análise desse tipo de conjunto de dados (*Hickerson et al.*, 2006; *Hickerson & Meyer*, 2008) tornando o campo um dos mais promissores em um futuro próximo (*Hickerson et al.*, 2010).

Logo, com o desenvolvimento das análises, da coleta de dados e o aumento no interesse no tema, a Filogeografia trouxe algumas contribuições diretas ou indiretas para o conhecimento científico. Avise (2009) listou algumas dessas contribuições, tais como a inferência da origem geográfica das espécies, bem como dos possíveis refúgios em períodos chave do passado (máximos glaciais, por exemplo) e outros padrões biogeográficos de determinadas regiões, principalmente através da abordagem de estudos comparativos; o incentivo ao desenvolvimento de outros campos de estudo associados, tais como o estudo da evolução molecular, o incentivo ao desenvolvimento de técnicas estatísticas de análise. Podemos citar também aplicações em estudos importantes para a biologia evolutiva, tais como o estudo da especiação (e. g. Moritz *et al.*, 2000; Hewitt, 2001).

Avise (2009) também comenta sobre a possibilidade se serem encontradas partições na variabilidade genética, ou seja, linhagens que possuem evolução independente por um determinado período, tendo aplicações diretas na sistemática e na conservação da biodiversidade (e. g. Fraser & Bernatchez, 2001; Frankham *et al.*, 2002). Nesse contexto, uma aplicação bastante importante é a elucidação das unidades evolutivamente significativas – ESUs, (do inglês Evolutionary Significant Units) – e a determinação de espécies crípticas. Em um cenário atual de fragmentação de habitats, a determinação de ESUs e espécies crípticas podem fornecer informações importantes para a determinação de locais interessantes para se criar unidades de conservação, se existir o objetivo de se conservar toda a variabilidade genética de uma determinada espécie (ou unidade evolutiva), apesar de existirem métodos auxiliares ou alternativos a ESUs, como, por exemplo, a autocorrelação espacial da similaridade genética em populações com distribuição contínua (Diniz-Filho & Telles, 2002).

Portanto, a filogeografia evoluiu bastante desde a sua consolidação e traz perspectivas de crescimento. Com seu potencial de síntese multidisciplinar, a filogeografia comparativa pode ajudar a solucionar o complicado quebra-cabeça de como a combinação do clima, geografia e as interações ecológicas podem ajudar a construir ou interagir com a composição e evolução das comunidades biológicas (Hickerson *et al.*, 2010). Segundo Beheregaray (2008) existem regiões que ainda necessitam de mais estudos

para compreender e identificar padrões, tais como o hemisfério sul do globo. Nessas regiões ainda é preciso maior investimento para descrever a evolução do isolamento reprodutivo de unidades populacionais e inferir processos relacionados à origem, distribuição e manutenção da biodiversidade de suas espécies. Logo, a filogeografia pode no futuro ter grande desenvolvimento a partir da interação com outros campos de estudo, tais como a modelagem de nicho ecológico; ajudar na melhor compreensão da seleção natural a partir da utilização de marcadores moleculares com pressão de seleção; e também continuar elucidando novos padrões biogeográficos em regiões ainda pouco estudadas.

1.2 Biogeografia dos biomas florestais brasileiros e da diagonal seca que os corta

A biogeografia é a área da ciência preocupada com as causas da distribuição atual das espécies, baseadas na história evolutiva das espécies e as mudanças geológicas e / ou climáticas nas áreas de distribuição das mesmas. As florestas tropicais do Neotrópico se originaram no fim do Mesozoico. Segundo Burnham & Johnson (2004), na América do Sul, existem indícios das primeiras formações semelhantes às florestas tropicais desde o Cretáceo tardio, de modo que essas evidências se tornaram maiores no Pleistoceno, porém com a diversidade de espécies bem menor que a atual. Já no Eoceno essa formação florestal já estava estabelecida. Existem também evidências de certa proximidade entre alguns taxa das duas formações de florestas tropicais brasileiras, Amazônia e Mata Atlântica, que hoje são separadas geograficamente por uma diagonal de biomas secos, Cerrado e Caatinga (Costa, 2003). Segundo a autora essa proximidade advém de contatos estabelecidos entre as florestas tropicais no passado.

O bioma Amazônico atual apresenta uma biodiversidade gigantesca. Estima-se que a região abrigue cerca de quarenta mil espécies vasculares de plantas, das quais trinta mil são endêmicas à região e grande parte da biodiversidade da região ainda é desconhecida (Mittermeier *et al.*, 2003). Na região está a maioria das unidades de conservação brasileiras (Jenkins &

Joppa, 2009), muitas delas sendo criadas após a década de noventa a partir de mobilizações sociais (Rylands & Brandon, 2005). Devido à pressão popular a área possui forte apelo para ser conservada, embora ainda existam problemas de perda de habitat na região através do desmatamento (Vieira *et al.*, 2005), mas com efeito de fragmentação bem menos evidente como vemos na Mata Atlântica ou no Cerrado, por exemplo.

Outro bioma florestal brasileiro, a Mata Atlântica apresenta o maior efeito das atividades antrópicas do território nacional, e talvez o bioma de floresta tropical mais ameaçado do mundo, de modo que mesmo sendo um biomas com alta biodiversidade e endemismo, sua área atual drasticamente reduzida e altamente fragmentada contando com somente cerca de 12% da área original que cobria a costa Atlântica brasileira (Ribeiro *et al.*, 2009). Para piorar a situação, muitos desses fragmentos ainda são afetados através da extração de madeira, da caça e da invasão de espécies exóticas (Tabarelli *et al.*, 2005).

O Cerrado, o bioma savânico nacional, é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando 21% do território nacional. O bioma apresenta alta biodiversidade vegetal, apresentando 44% de flora endêmica, mas mesmo com tamanha biodiversidade o Cerrado tem recebido menor atenção do que a Amazônia e a Mata Atlântica em relação a medidas de conservação. Por isso foi considerado um dos 'hotspots' mundiais de conservação (Klink & Machado, 2005). Mais da metade do Cerrado foi transformado em pastagens, áreas agriculturáveis ou de outros usos humanos (Klink & Machado, 2005) e atualmente a região nordeste do estado de Goiás é a que apresenta o maior nível de vegetação nativa (Carvalho *et al.*, 2009).

Devido à grande extensão do bioma Cerrado, a fragmentação do mesmo ocorre de maneiras diferentes nos vários pontos de sua distribuição, apresentando, por exemplo, diferentes tipos de matrizes entre os fragmentos remanescentes (Brannstrom *et al.*, 2008). Além disso, a agricultura pode causar um maior nível de fragmentação do que pastagens (Carvalho *et al.*, 2009), de modo que a topografia do local pode influenciar no tipo de uso do mesmo, em ambientes mais inclinados há predominância de pastos (Brannstrom *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009). Por esses e outros fatores, após uma revisão bibliográfica do estado de conservação do Cerrado, Silva e

Bates (2002) concluem que a conservação do bioma é um grande desafio devido ao interesse econômico associado à degradação do bioma.

A Caatinga, o segundo bioma que compõe a diagonal seca que separa os biomas florestais brasileiros, é semi-árida e dominada por vegetação seca arbustiva (Sampaio, 1995) e ocupa 736.000 km² da região nordeste do Brasil (IBGE, 1985). Possui grande biodiversidade, porém também sofre com uso inadequado da paisagem e, por consequência, sofre sérios danos ambientais, tais como a aceleração da desertificação que atualmente ameaça por volta de 15% da região, e mesmo assim menos de 1% desse bioma diverso está sendo protegido integralmente em áreas de conservação (Leal *et al.*, 2005).

A localização geográfica atual desses biomas é resultante de diversos fatores biogeográficos que acompanharam a história climática, geológica e, consequentemente, a história evolutiva das espécies que os compõem. Eventos geológicos causados pela tectônica de placas tiveram influência na biogeografia da região Amazônica. O soerguimento das cadeias montanhosas dos Andes desempenhou um papel importante para a diversificação de espécies de plantas da região amazônica, causando eventos vicariantes devido a mudanças nas bacias hidrográficas e nas incursões marinhas no continente. Essa influência pode ser notada no estudo de Antonelli e colaboradores (2009) com membros da família Rubiaceae, onde os eventos vicariantes causados pelo soerguimento dos Andes são congruentes com os eventos de diversificação dos membros da família. Além disso, a formação da bacia amazônica também influenciou a história evolutiva de alguns grupos, de modo que os rios agiram como barreiras vicariantes (*e.g.* Hayes & Sewlal, 2004), porém outros grupos conseguem suplantam essa barreira (*e.g.* Fairley *et al.*, 2002).

Durante os ciclos glaciais, onde as mudanças climáticas podiam tornar alguns ambientes secos e frios nos períodos glaciais e úmidos e quentes nos períodos interglaciais, as espécies normalmente respondiam individualmente, mudando suas distribuições, e quebrando a estrutura das comunidades (Haffer & Prance, 2002). Nessa dinâmica espacial, a teoria dos refúgios diz que as espécies adaptadas a climas quentes e úmidos tenderiam a ficar restritas a regiões específicas onde as características climáticas interglaciais eram mantidas, os refúgios. A formação dos refúgios seria importante para a

diversificação biológica. Durante esse período de isolamento geográfico poderia ocorrer diferenciação entre as linhagens em diferentes refúgios. Ao findar os períodos glaciais essas mesmas populações sofreriam expansão populacional à medida que novas áreas adquirissem as condições climáticas para seu estabelecimento. Essa expansão deixaria alguns sinais genéticos tais como menor diversidade genética nas regiões recém colonizadas e maior diversidade nas regiões de refúgio (revisado em Hewitt, 2000). Outra hipótese alternativa para a diversificação da biodiversidade é a seleção local em gradientes ecológicos, que algumas vezes podem gerar diferenças fenotípicas maiores que aquelas causadas pelo isolamento causado pelos refúgios no passado (e. g. Schneider *et al.*, 1999).

Muitos estudos dão especial importância ao período do Quaternário para o processo de diversificação da biodiversidade. Willis & Niklas (2004) revisaram estudos palinológicos para compreender a importância desse período para a diversificação de plantas e concluíram que: as respostas diferenciais do período são relacionadas a um efeito de migração e isolamento (formação de refúgios), contrastando com efeitos de mudança de dominância na estrutura de comunidades que era mais comum em períodos glaciais precedentes; existe um efeito bastante diverso para diferentes grupos de plantas, principalmente entre angiospermas e gimnospermas, evidenciando a resposta específica às mudanças globais; o efeito de extinção de populações foi mais comum do que a diferenciação entre elas, porém as taxas evolutivas são condizentes com um possível processo de diversificação no período. Para a região Neotropical, Rull (2008) encontrou que o período de diversificação foi variável, ora ocorrendo no Quaternário e ora no Terciário, sofrendo influência do grupo avaliado, corroborando a ideia de que não existe um padrão geral de diversificação, de modo que, para plantas, por volta de 56% das diversificações ocorreram no Terciário e 44% se deram durante o período Quaternário.

Assim, as mudanças climáticas também tiveram grande influência na evolução da biodiversidade amazônica. No período Quaternário foi comum o avanço de formações abertas em áreas onde existiam formações florestais (revisado em Willis & Niklas, 2004). Na revisão de Hafter & Prance (2002) é salientada a evidência de formações florestais abertas ou mesmo presença de savanas onde hoje é a Amazônia meridional. Nos períodos secos, as

formações florestais ficaram restritas as proximidades dos leitos dos grandes rios, enquanto formações abertas foram se formando nas demais regiões. Como exemplo dessas mudanças, existem evidências geológicas de que a região dos Llanos, do leste da Colômbia-Venezuela ao noroeste da Amazônia tenha se tornado semelhante a um deserto durante certos períodos do Quaternário. Com base nisso, os autores salientam a plausibilidade da hipótese dos refúgios para explicar a biodiversidade amazônica. Evidências palinológicas de retrações e expansões das florestas associadas a regiões savânicas foram encontradas, por exemplo, no trabalho de Mayle e colaboradores (2007).

Porém, existem autores que defendem a ideia da estabilidade da região durante os períodos glaciais, indo contra a ideia da expansão das áreas de floresta seca e savana e, portanto, não acreditando na ideia dos refúgios na Amazônia (e. g. Colinvaux *et al.*, 2000, 2001; Bush & Silman, 2004). Hewitt (2000) diz que evidências da existência de refúgios são bem estabelecidas na Europa e na América do Norte, porém há menos evidências de restrição na distribuição em refúgios seguida de expansões populacionais nas regiões tropicais. Lessa e colaboradores (2003) encontraram padrão de formação de refúgios em espécies da América do Norte, onde foram observados indícios de expansão populacional após os períodos de glaciação para diversas espécies de mamíferos, porém esse padrão não foi observado na região Amazônica para espécies do mesmo grupo, lançando a hipótese de que a região possa ter tido mudanças de composição de espécies, porém a paisagem permaneceu mais estável nos períodos de glaciação. Resultado semelhante foi encontrado por Mayle e colaboradores (2004), onde foram encontradas evidências de que boa parte da bacia Amazônica sofreu mudança de composição de espécies, mas permaneceu com formações florestais no último máximo glacial, embora os limites norte e sul da bacia possam ter sido substituídos por savanas, tendo o mesmo se mantido durante o Holoceno inicial e médio, de modo que a paisagem atual passou a ser estabelecida no Holoceno tardio.

Mais ao sul do Brasil alguns estudos palinológicos realizados encontraram evidências de que o ambiente na região sudeste do Brasil durante o último máximo glacial apresentou climas seco e frio. Nesse período, o Cerrado ficou restrito ao norte da região, devido à presença de geadas mais ao

sul (Behling & Licthe, 1997; Behling, 1998; Behling, 2002). Durante o Holoceno inicial o Cerrado apresentou uma expansão para o leste, nas planícies em direção a Oceano Atlântico, porém, a partir do Holoceno tardio essas regiões foram substituídas por florestas semidecíduais com a diminuição da estação seca (Behling, 1998; Behling, 2002). Registros de queimadas frequentes também foram observados na região Sudeste, enquanto a região Sul não apresentou essa tendência (Behling, 2002). Durante os máximos glaciais, existem três refúgios preditos para a Mata Atlântica, sendo eles: o refúgio de Pernambuco, no Norte acima do Rio São Francisco; o refúgio da Bahia, no centro entre o Rio Doce e o São Francisco; e um terceiro mais controverso Refúgio de São Paulo, no sul e abaixo do Rio Doce (Carnaval & Moritz, 2008; Martins, 2011). Na região do Brasil Central o resfriamento e as condições secas causaram mudanças na composição florestal (17000 anos antes do presente). No fim do Pleistoceno (13000 anos antes do presente) as condições voltaram a ser favoráveis às formações florestais, mas outros resfriamentos causaram novas mudanças não tão drásticas (11000 anos antes do presente), até que por fim o aumento da umidade e da temperatura (8500 anos antes do presente) fez com que a região se organizasse da mesma maneira que observamos hoje (Ledru, 1993).

Existe também a evidência de que no passado existia uma continuidade entre as Florestas Estacionais da América do Sul, essa continuidade se estendia de forma existia uma conexão entre essa formação florestal que se distribuíam entre a Caatinga e o Chaco. Essa continuidade é denominada Arco Pleistocênico (Prado & Gibbs, 1993). Porém, com o aumento da temperatura e da umidade essa continuidade foi quebrada e reduzida às manchas de Florestas Estacionais atuais, resquícios da formação contínua passada. A hipótese inicial do Arco pleistocênico se deu através da observação da distribuição da espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Leguminosae) que seguia a mesmo padrão esperado para o Arco de ligação das regiões do Neotrópico (Prado, 2000). Oliveira-Filho & Ratter (2000) também dão ênfase à importância das matas de galeria nesse processo, de modo que, juntamente com as Florestas Estacionais, serviam de ligação da Caatinga para o Chaco e entre as formações de florestas tropicais brasileiras.

Outra possibilidade é a ideia da conexão entre as florestas tropicais brasileiras, sejam elas através das matas de galeria ou das florestas secas, propiciando a troca e o compartilhamento de espécies entre as regiões (Costa, 2003). Alguns estudos corroboram esta hipótese. Por exemplo, temos: a composição de espécies de pequenos mamíferos semelhantes entre as florestas tropicais e as matas de galeria do Cerrado (Cáceres *et al.*, 2008); a proximidade filogenética entre espécies amazônicas e do Cerrado no gênero de roedores *Oligoryzomys* (Miranda *et al.*, 2009). Além disso, o Cerrado pode funcionar como uma possível fonte de comunicação entre a Mata Atlântica e as Florestas Secas do Chiquitano (Bolívia) na espécie de arbórea *Cedrela fissilis* (Garcia *et al.*, 2011), que evidencia a possibilidade de uma conexão entre a Amazônia e a Mata Atlântica, via Cerrado, devido a existência de ligação entre regiões mais distantes. Porém, também existem alguns estudos que vão contra essa ideia e algumas espécies não mostram essa continuidade, como: o morcego *Desmodus rotundus*, que apresenta forte quebra causada pela diagonal seca que separa a Mata Atlântica e a Amazônia, quebra essa causada pelas mudanças climáticas do Pleistoceno (Martins *et al.*, 2009); a divergência entre duas espécies de primatas, *Alouatta belzebul* e *Alouatta guariba*, Amazônica e de Mata Atlântica respectivamente, também causada por mudanças climáticas no Pleistoceno (Martins *et al.*, 2011); e o arbusto *Psychotria ipecacuanha* que apresenta grande divergência genética entre as populações da Mata Atlântica e da Amazônia, sendo essa espécie uma representante do possível “Arco Pleistocênico” com sua distribuição atual representando refúgios para a espécie, e não é encontrada nas matas de galeria do Cerrado (Rossi *et al.*, 2009).

Nesse contexto, autores como Costa (2003) e Tuomisto (2007) acreditam que para a compreensão da biogeografia da região Neotropical é necessária uma integração de teorias. Em um ambiente tão complexo como esse a influência climática, juntamente com a influência das bacias hidrográficas e incursões marinhas no passado, aliadas também a adequabilidade ambiental presente, juntas, poderiam dar luz à biogeografia da região. Uma possível abordagem para essa compreensão é tentar elucidar a história evolutiva das espécies que ocorrem na região, sendo um grupo com ocorrência ampla e com distribuição nos principais biomas um bom modelo.

Um dos campos de estudo que vem se desenvolvendo para tentar compreender a história evolutiva das espécies é a Filogeografia e diversos estudos foram realizados para melhor compreensão desses padrões. Alguns deles estão relacionados abaixo.

Existem evidências de padrões de refúgio no Pleistoceno inicial em regiões Neotropicais na América do Norte (Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 2011). Porém existe o debate da importância desse período para a diversificação e evolução de espécies no hemisfério Sul. Diversos estudos demonstraram que o Pleistoceno foi um período importante para a diversificação das populações presentes na diagonal seca brasileira. Alguns lugares foram apontados como possíveis regiões de refúgio para as populações presentes na área. Áreas próximas a bacia do Rio São Francisco possuem estudos palinológicos demonstrando uma estabilidade nos períodos glaciais (de Oliveira *et al.*, 1999) e pode ter servido de refúgio para populações de *Hymenaea stigonocarpa* (Ramos *et al.*, 2007).

O fim dos períodos glaciais também pode servir para estruturar populações. Isso ocorreu para a espécie *Cedrela fissilis* que possuía um contínuo populacional nos períodos glaciais, compondo o provável “Arco Pleistocênico” e hoje ocorre em alguns fragmentos florestais no Cerrado e em outros biomas com formação de florestas (Garcia *et al.*, 2011). Para a espécie *Lychnophora ericoides*, que é restrita a cerrados rupestres, existe uma grande diferenciação entre as populações da espécie do estado de Goiás em relação às populações do estado de Minas Gerais, de modo que esse isolamento pode ser resultado do aumento da temperatura e umidade com o fim dos períodos glaciais que causou a retração das populações para sua distribuição atual (Collevatti *et al.*, 2009a). Padrão semelhante ao encontrado em *Lychnophora ericoides* é observado para a espécie *Tibouchina papyrus*, restrita a ambientes de Cerrado rupestres em três Serras no estado de Goiás e Tocantins (Collevatti *et al.*, in press). O norte do Cerrado pode também ter sido importante para a colonização das regiões mais ao sul em *C. brasiliense*, uma espécie de ampla distribuição no bioma, e que pode ter sofrido efeitos dos períodos glaciais do quaternário (Collevatti *et al.*, 2003).

Quanto à relação entre os biomas da diagonal seca brasileira, alguns estudos encontraram forte divergência genética em uma espécie de marsupial

da família Didelphidea, *Monodelphis domestica*, entre as populações de Cerrado e Caatinga (Caramaschi *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2011), sugerindo a existência de uma possível barreira separando os biomas no passado, causada por eventos de glaciação no Plioceno (Caramaschi *et al.*, 2011). Além disso, a altitude e grandes rios podem servir como barreiras ao fluxo gênico de espécies que ocorrem na “Diagonal Seca” brasileira. Nascimento e colaboradores (2011) encontraram esse padrão para uma espécie de pequeno roedor, *Calomys expulsus*, onde a elevação do planalto central e o Rio São Francisco serviram como barreiras e causaram divergência entre as populações.

Por fim, Cabanne e colaboradores (2011) encontraram divergência genética evidente entre subespécies de uma ave que habita a Mata Atlântica e a diagonal seca. Essa divergência foi causada por seleção diferencial associada a baixos níveis de fluxo gênico e não por somente por efeito de isolamento. Os resultados indicam que não há continuidade atual entre populações dos dois biomas, e que as populações da Mata Atlântica Central são as mais antigas.

Portanto, conforme vimos a filogeografia tem se desenvolvido ao longo dos anos, porém ainda existem poucos estudos na região neotropical, tão complexa e ainda carente de explicações acerca de padrões biogeográficos. Assim mais contribuições são bem vindas para aumentar o conhecimento relacionado ao padrão de distribuição da diversidade biológica na região.

1.3 Espécies de estudo

A família Caryocaraceae é representada por dois gêneros, *Caryocar* e *Anthodiscus*. A família tem origem datada do Eoceno Médio, devido à presença de registro fóssil deste período encontrado na Venezuela (Muller, 1981). O gênero *Caryocar* possui ampla distribuição no Neotrópico, sendo representado em diversos biomas brasileiros, tais como o Cerrado, a Caatinga, a Mata Atlântica e a Amazônia. O gênero é composto por espécies arbóreas, distribuídas na região neotropical. Dentre as doze espécies do gênero que

ocorrem no Brasil, somente quatro espécies ocorrem fora da Amazônia, sendo encontradas no Cerrado, na Caatinga e na Mata Atlântica (Prance & Silva, 1973). A morfologia floral apresenta algumas adaptações para evitar a auto-fecundação, com os estames tornando eretos antes que o estilete (Prance & Silva, 1973). As características das flores das espécies do gênero sugerem a polinização por morcegos, de modo que estes se alimentam do néctar e não consomem nenhuma parte da flor (Prance & Silva, 1973). As espécies de área aberta possuem grandes semelhanças morfológicas, apresentando evidência de divergência recente. No presente trabalho foi avaliada a história evolutiva das três espécies que atualmente se distribuem na diagonal seca brasileira sendo elas *C. brasiliense*, *C. cuneatum* e *C. coriaceum*.

Na revisão da família Caryocaraceae, Prance & Silva (1973) caracteriza as espécies em estudo da seguinte maneira:

Caryocar brasiliense Cambess: distribui-se no Cerrado do Planalto Central do Brasil até o Paraná (Figura 1). São árvores que atingem até 10 metros de altura, mas usualmente menores com o tronco retorcido.

C. coriaceum Wittmack: distribui-se em matas secas na parte norte e leste do Planalto Central brasileiro (Figura 1). São árvores que podem atingir até 15 metros de altura.

C. cuneatum Wittmack: distribui-se em matas na parte norte do Planalto Central brasileiro (Figura 1). São árvores que podem atingir até 15 metros de altura.

Para complementar a avaliação da origem das espécies acima foram utilizadas outras seis espécies do gênero, descritas segundo Prance & Silva (1973) da seguinte maneira:

C. edule Casarreto: são árvores que se distribuem na costa leste do Brasil, sendo encontrada da Bahia ao Rio de Janeiro em ambientes pedregosos próximos a cursos d'água (Figura 2).

C. glabrum (Aublet) Persoon: são árvores que podem atingir 50 metros de altura e distribui-se em florestas não alagadas desde as Guianas ao norte da Amazônia da Colômbia, Peru, Venezuela até a região leste do Pará (Figura 3).

C. pallidum A. C. Smith: são árvores que podem atingir 40 metros de altura e distribui-se em florestas não alagadas da Amazônia na Venezuela, Brasil e Bolívia (Figura 2).

C. microcarpum Ducke: são árvores que podem atingir 25 metros de altura, frequentemente menores com troncos não reforçados. Distribui-se em florestas periodicamente alagadas desde as Guianas e o norte da Amazônia desde o Peru até o Brasil (Figura 4).

C. villosum (Aublet) Persoon: são árvores que podem atingir 40 metros de altura e até 2,5 metros de diâmetro. Distribui-se desde a Guiana Francesa até a Amazônia brasileira, sendo mais abundante no leste da Amazônia (Figura 1).

C. costaricense Donnell Smith: são árvores que podem atingir 50 metros de altura com tronco reforçado chegando a 1,5 metros de diâmetro. Só é conhecido nas florestas de altitude de Punteras, província da Costa Rica (Figura 5).

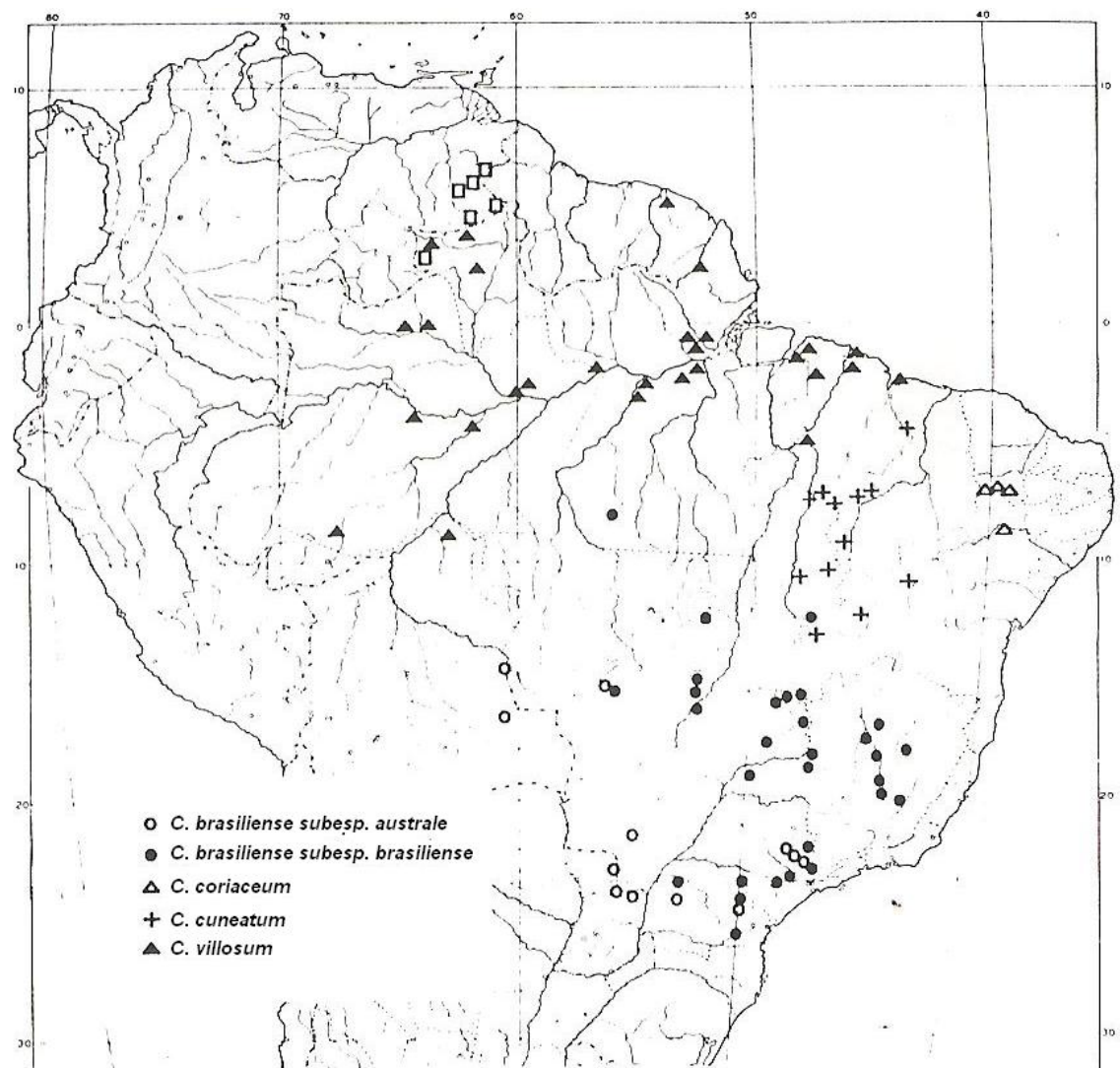


Figura 1. Mapa de ocorrência de quatro espécies do gênero *Caryocar* (modificado de Prance & Silva, 1973).

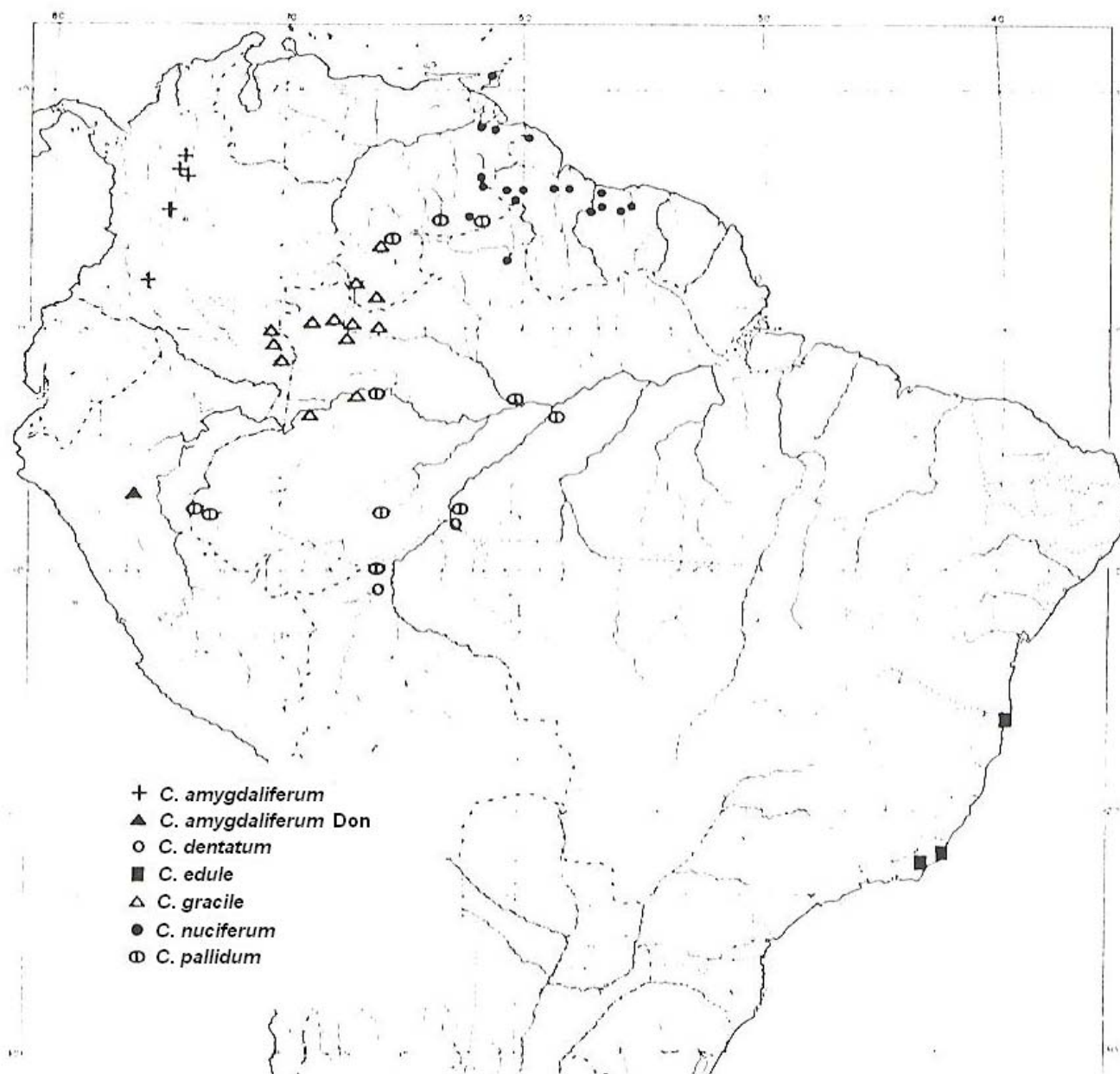


Figura 2. Mapa de ocorrência de seis espécies do gênero *Caryocar* (modificado de Prance & Silva, 1973).

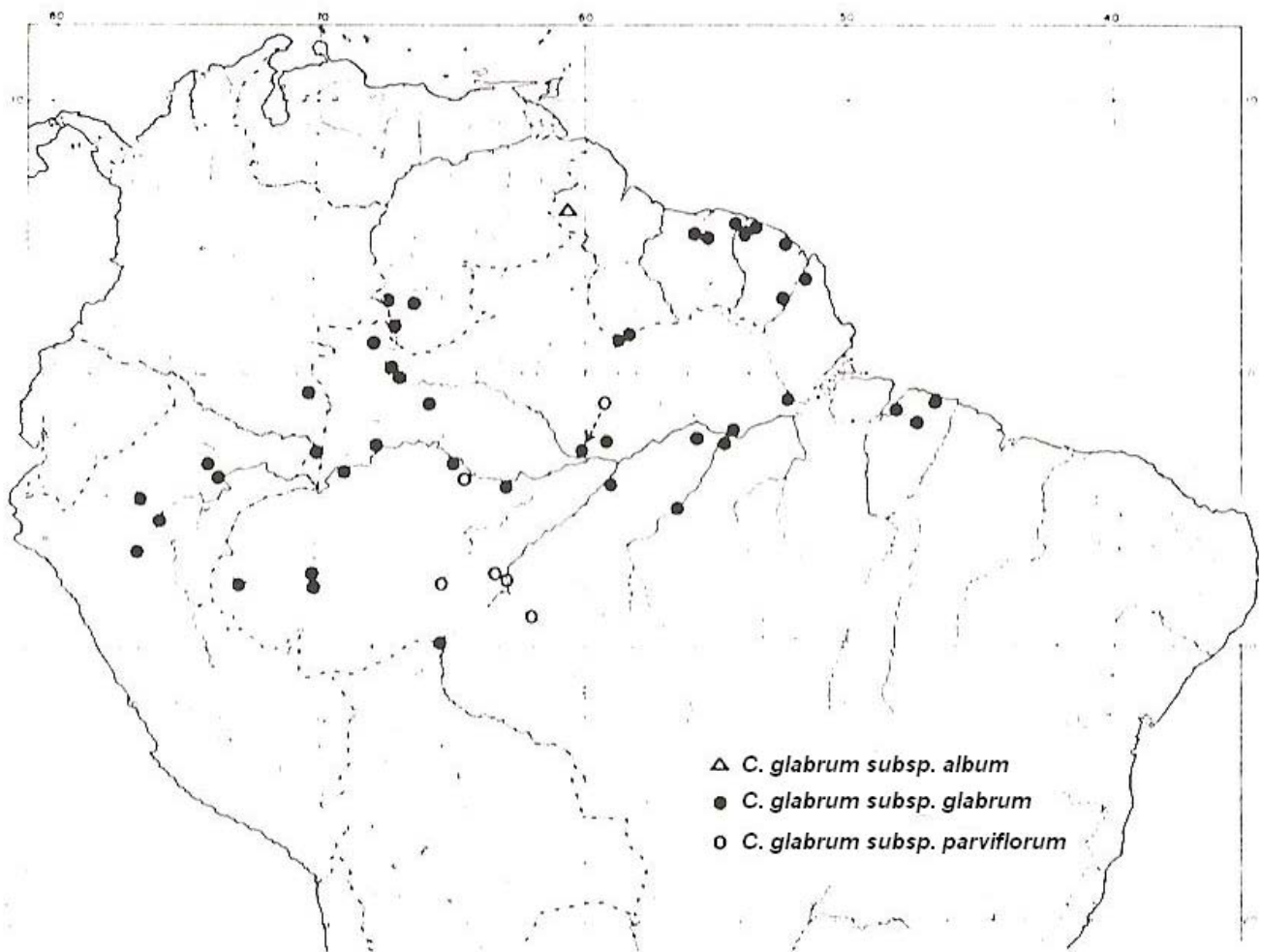


Figura 3. Mapa de ocorrência de três subespécies de *Caryocar glabrum* (modificado de Prance & Silva, 1973).

Além disso, foi utilizada uma espécie do gênero *Anthodiscus*, também pertencente à família Caryocaraceae, como grupo externo as espécies do gênero *Caryocar*, auxiliando na elucidação da história evolutiva das espécies em estudo.

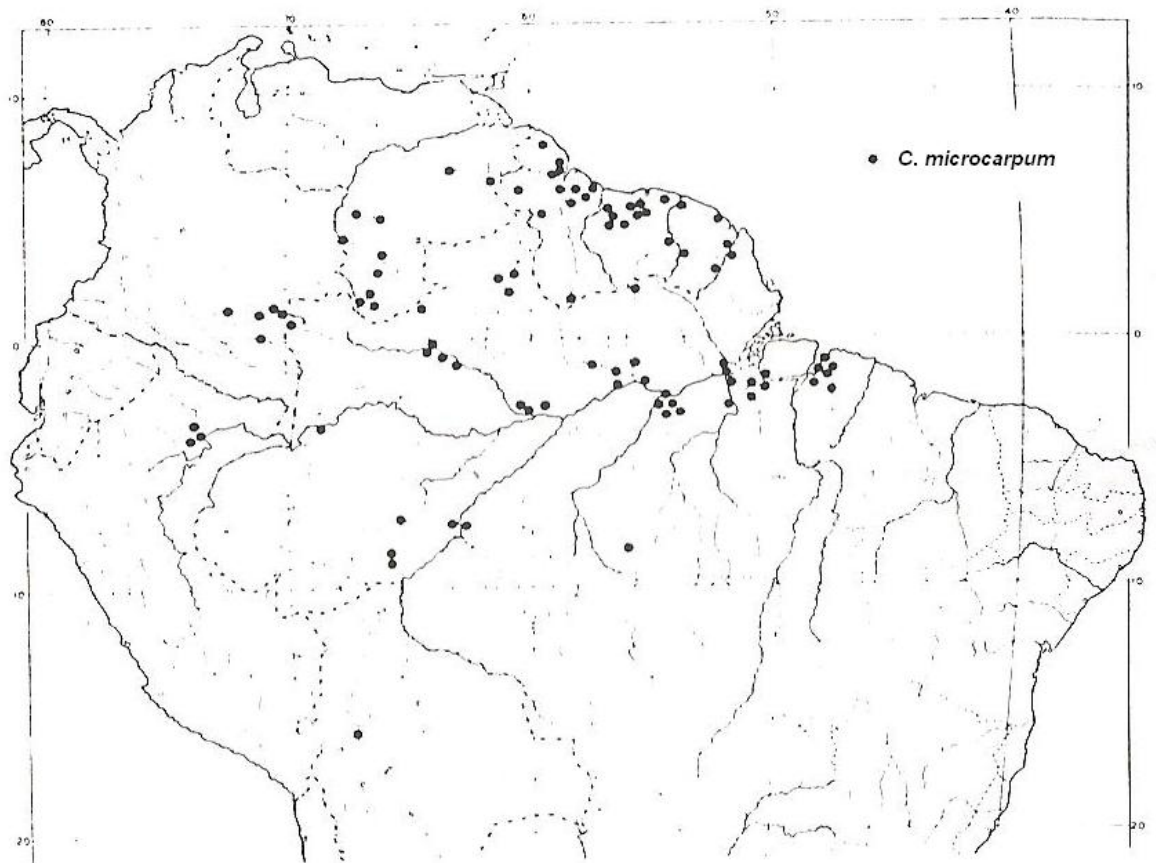


Figura 4. Mapa de ocorrência de *Caryocar microcarpum* (modificado de Prance & Silva, 1973).

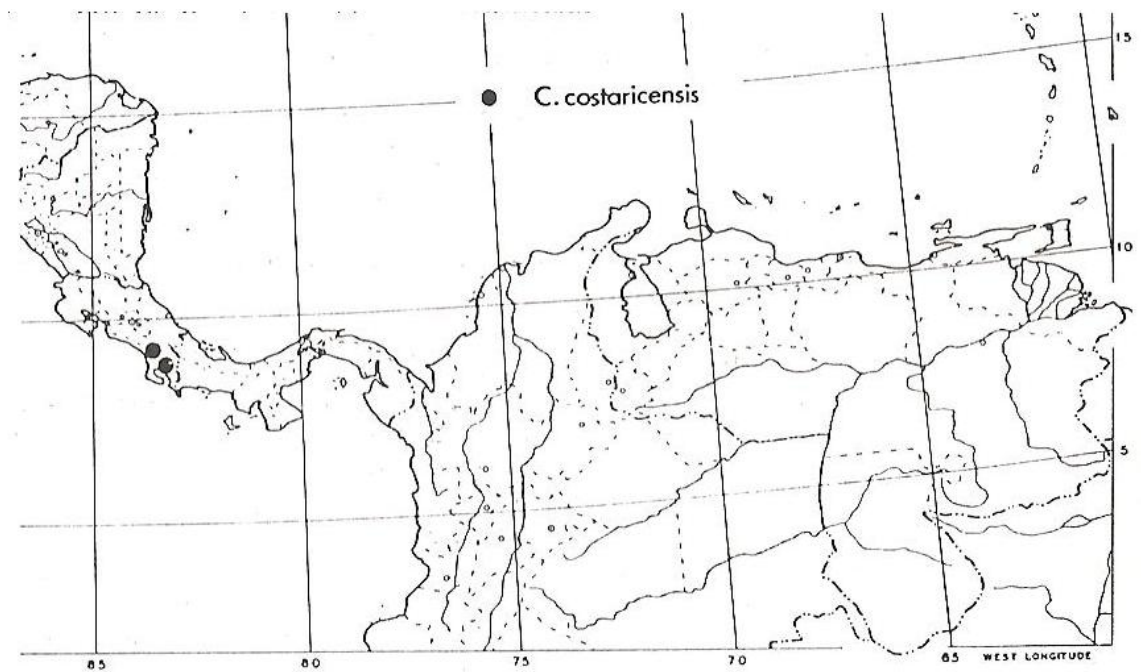


Figura 5. Mapa de ocorrência de *Caryocar costaricense* (modificado de Prance & Silva, 1973).

Davis e colaboradores (2005) relacionam a origem das florestas tropicais modernas com uma diversificação explosiva das espécies da ordem Malpighiales, datada do Cretáceo Médio. Segundo o autor, o surgimento da nova formação facilitou a expansão e diversificação dos taxa da ordem, e indica uma origem bastante antiga para a família Caryocaraceae, datando entre 100 e 112 milhões de anos atrás. Existem também alguns estudos anteriores que elucidaram alguns padrões da distribuição da variabilidade genética de indivíduos das espécies do gênero *Caryocar*. Collevatti e colaboradores (2001a) encontraram forte estruturação genética entre populações de *C. brasiliense* através da análise de locos microssatélites nucleares. O mesmo padrão de estruturação genética foi encontrado analisando locos microssatélites e sequências cloroplastidiais para a espécie, elucidando possíveis efeitos de retrações da distribuição geográfica da espécie causada por eventos de glaciação no passado (Collevatti *et al.*, 2003). Outro estudo genético para a espécie evidenciou que é possível que o fluxo de pólen seja maior que a capacidade de dispersão das sementes em *C. brasiliense* (Collevatti *et al.*, 2001b). Collevatti e colaboradores (2009) também procuraram entender o papel do rio Negro, no Amazonas, como barreira ao fluxo gênico em duas espécies do gênero, *C. microcarpum* e *C. villosum*, através de locos microssatélites nucleares e sequências do genoma cloroplastidial, evidenciando que o rio não funciona como barreira efetiva para ambas as espécies.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Entender os padrões filogeográficos das espécies do gênero *Caryocar* que se encontram na diagonal seca Brasileira (*C. brasiliense*, *C. coriaceum* e *C. cuneatum*) de modo a entender as relações de proximidade filogenética entre as mesmas e ajudar a elucidar os padrões biogeográficos responsáveis pelas divergências entre os taxa e a origem das espécies presentes no Cerrado e Caatinga.

2.2 Objetivos específicos

1. Inferir a variabilidade genética das espécies estudadas, bem como a estruturação da mesma, elucidando o grau de divergência existente entre cada uma delas;
2. Reconstruir as relações filogenéticas existentes entre as espécies em estudo;
3. Entender como se encontra distribuída a variabilidade genética dentro e entre as populações das espécies *C. brasiliense* e *C. cuneatum*;
4. Compreender a história demográfica das espécies da diagonal seca brasileira evidenciando ou não a presença de retração ou expansão populacional.
5. Determinar os tempos de divergência entre as espécies do gênero estudadas e compreender quais eventos poderiam ser responsáveis pelo surgimento das espécies da diagonal seca brasileira;

6. Hipóteses

1. Devido ao fato que a maioria das espécies se distribui na região Amazônica, e o registro fóssil mais antigo se encontrar na mesma região, infere-se que o gênero *Caryocar* tenha origem na região. Predição: As espécies presentes na diagonal seca são derivadas.
2. As espécies do gênero *Caryocar* são polinizadas por morcegos e dispersadas por grandes mamíferos. A partir dessas características espera-se que as populações de *C. brasiliense* e *C. cuneatum* apresentem relativamente altos níveis de fluxo gênico. Predição: As populações das espécies apresentam baixas ou nenhuma estruturação populacional.
3. A teoria dos refúgios prevê o isolamento de populações influenciado pelas mudanças climáticas nos períodos glaciais, de modo que esse isolamento pode ser responsável pela diversificação de espécies. Existem evidências de que os biomas florestais brasileiros sofreram influências dessas glaciações. Com base nisso, a origem das espécies da diagonal seca brasileira pode ter sofrido influência dos períodos glaciais. Predição: O ancestral comum mais recente das espécies ocorreu em períodos de ocorrência de glaciações.

4. Metodologia

4.1 Coleta de material biológico

Foram realizadas coletas de amostras de folhas em nove espécies do gênero *Caryocar*. Como um dos objetivos do trabalho é elucidar a evolução das espécies presentes nos biomas secos, Cerrado e Caatinga, priorizou-se a amostragem das mesmas, de modo que *C. brasiliense* foi coletado em 11 localidades, *C. cuneatum* em cinco e *C. coriaceum* em uma. As demais espécies tiveram menor representatividade, pois não seriam utilizadas para abordagens de análise de demografia e as coletas das espécies Amazônicas foram realizadas em parceria com pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas (INPA). Na reserva Ducke (Manaus-AM) foram coletadas amostras de *C. glabrum*, *C. pallidum*, *C. villosum* e da espécie utilizada como grupo externo, do gênero *Anthodiscus*, também pertencente à família Caryocaraceae. Foram realizadas também coletas às margens do Rio Negro, onde as espécies *C. microcarpum* e *C. villosum* foram encontradas. Foram coletados indivíduos de *C. edule* pertencentes a uma população. Amostras da espécie *C. costaricense* foram obtidas através de parceria com um pesquisador local, o professor Jorge A. Lobo, da Universidad Costa Rica.

Os pontos de coleta estão indicados na Figura 6. Foram utilizadas no trabalho 270 indivíduos, sendo 133 de *C. brasiliense*, 11 de *C. coriaceum*, oito de *C. costaricense*, 73 de *C. cuneatum*, quatro de *C. edule*, três de *C. glabrum*, quatro de *C. pallidum*, 10 de *C. microcarpum*, 23 de *C. villosum*, além de um indivíduo do gênero *Anthodiscus*. As populações utilizadas e a quantidade de indivíduos de cada uma delas encontram-se na Tabela 1.

4.2 Obtenção dos dados moleculares

Os resultados foram gerados através do sequenciamento de duas regiões intergênicas cloroplastidiais *trnH-psbA* (Azuma *et al.*, 2001) e *trnC-ycf6* (Dumolin *et al.*, 1995).

A extração de DNA ocorreu a partir das folhas dos indivíduos coletados, utilizando-se o protocolo de extração CTAB 2% (Doyle & Doyle, 1987),

quantificado através de eletroforese em gel de agarose 1% com o auxílio de marcador com peso molecular conhecido. Em seguida diluiu-se a solução de DNA para uma concentração de, aproximadamente, 3 ng/μL, que foi utilizada para a amplificação dos fragmentos específicos nas reações em cadeia da polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction – PCR). A reação foi feita a partir de uma solução contendo todos os reagentes com um volume final de 20μL (Tabela 2), com o programa utilizado nos termocicladores obedecendo aos seguintes passos: (1º) Desnaturação inicial do DNA a 94°C por cinco minutos; (2º) Desnaturação do DNA a 94°C por um minuto; (3º) Temperatura específica para o anelamento do iniciador por um minuto; (4º) Temperatura de extensão da molécula de DNA – 72°C – por um minuto e meio; (5º) Repetição do passo dois ao quatro por 30 vezes; (6º) Extensão final das moléculas de DNA a 72°C por dez minutos.

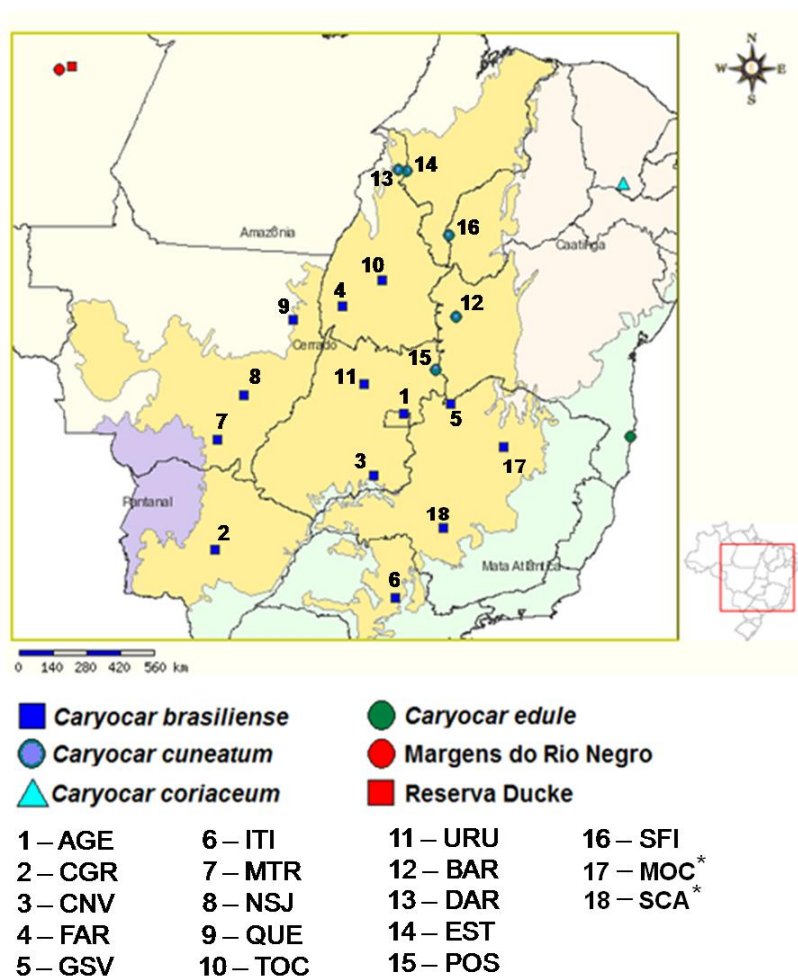


Figura 6. Pontos de coleta das populações utilizadas no trabalho e sua localização referente aos biomas brasileiros. * Populações coletadas, mas não utilizadas no trabalho.

Tabela 1 – Indivíduos e populações coletadas. * - Populações sem sequências.

Espécie	População	Coordenadas geográficas	Nº de indivíduos
<i>Caryocar brasiliense</i>	Estação Ecológica de Águas Emendadas – DF (AGE)	15° 32' 43.6" S; 47° 34' 06.9" O	16
	Campus da UFMS Campo Grande – MS (CGR)	20° 30' 23.3" S; 54° 36' 01.9" O	14
	Parque Estadual de Caldas Novas – GO (CNV)	17° 47' 26.3" S; 48° 41' 37.6" O	15
	Formoso do Araguaia – TO (Dentro e Fora) (FARd; FARf)	11° 28' 26.3" S; 49° 45' 38.5" O	9
	Parque Nacional de Grade Sertão Veredas – MG (GSV)	15° 13' 25.6" S; 45° 49' 12.0" O	16
	Estação Ecológica de Itirapina – SP (ITI)	22° 16' 37.3" S; 47° 52' 50.8" O	16
	Rondonópolis - MT (MTR)	16° 31' 46.1" S; 54° 31' 50.8" O	16
	Novo São Joaquim – MT (NSJ)	14° 53' 48.8" S; 53° 33' 01.8" O	5
	Querência – MT (QUE)	12° 10' 14.1" S; 51° 41' 27.7" O	10
	Porto Nacional – TO (TOC)	10° 43' 49.1" S; 48° 21' 50.7" O	13
	Uruaçu – GO (URU)	14° 28' 59.8" S; 49° 02' 40.4" O	3
<i>Caryocar cuneatum</i>	Montes Claros (MOC)*	16° 47' 21.7" S; 43° 51' 10.6" O	-
	Serra da Canastra (SCA)*	19° 59' 12.8" S; 46° 16' 02.4" O	-
	Barreiras – BA (BAR)	12° 03' 59.7" S; 45° 36' 42.5" O	16
	Darcinópolis – TO (DAR)	06° 42' 01.4" S; 47° 44' 59.4" O	14
	Estreito – MA (EST)	06° 46' 25,7" S; 47° 26' 34,6" O	15
	Posse – GO (POS)	14° 00' 32,2" S; 46° 21' 35,5" O	15
	Santa Filomena – PI (SFI)	09° 07' 02,9" S; 45° 51' 49,1" O	13
<i>Caryocar coriaceum</i>	Crato – CE (CRA)	07° 13' 50.9" S; 39° 21' 52.9" O	11
<i>Caryocar edule</i>	Porto Seguro – BA	16° 25' 24.9" S; 39° 05' 07.3" O	4
<i>Caryocar villosum</i>	Margens do Rio Negro – AM	03° 05' 42.2" S; 60° 24' 47.9" O	11
	Reserva Ducke – AM	02° 55' 43.2" S; 59° 58' 35.3" O	12
<i>Caryocar microcarpum</i>	Margens do Rio Negro – AM	03° 05' 42.2" S; 60° 24' 47.9" O	10
<i>Caryocar glabrum</i>	Reserva Ducke – AM	02° 55' 43.2" S; 59° 58' 35.3" O	3
<i>Caryocar pallidum</i>	Reserva Ducke – AM	02° 55' 43.2" S; 59° 58' 35.3" O	4
<i>Caryocar costaricense</i>	Costa Rica		8

Após as reações de PCR os fragmentos amplificados foram quantificados a partir de eletroforese em gel de agarose 2%. Posteriormente as reações de PCR foram purificadas utilizando as enzimas Exonuclease I (10u/μL) e a Fosfatase Alcalina (1u/μL) (do inglês Shrimp Alkaline Phosphatase) – método EXO-SAP com a proporção de 1 de Exonuclease I para 9 de Fosfatase Alcalina. As reações de sequenciamento ocorreram em ambas as direções, “*forward*” e “*reverse*” para montagem da fita consenso. Após a precipitação, o sequenciamento dos fragmentos ocorreu em um sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, CA) utilizando o kit de sequenciamento DYEnamic™ ET Terminator (GE HealthCare, Sweden), de acordo com as instruções do fabricante. As sequências foram analisadas, editadas e alinhadas utilizando o a rotina do programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1997) e editadas manualmente para correção de possíveis erros utilizando o programa Bioedit 7.0.9 (Hall, 1999).

Tabela 2 – Reagentes e concentrações utilizados nas reações de PCR.

Reagentes	Concentração	Volume (μL)	Quantidade final
Água	-	5,7	-
DNA	~3ng/μL	5,0	15ng
Iniciador sensu	0,9μM	1,5	1,35pMol
Iniciador anti-sensu	0,9μM	1,5	1,35pMol
Albumina bovina	2,5mg/μL	2,0	5mg
Tampão para enzima <i>Taq</i> polimerase	10x	2,0	-
dNTPs	2,5 μM	2,0	5pMol
<i>Taq</i> Polimerase	5 unidades/μL	0,3	1,5 unidades
Total		20	

4.3 Análise de dados

Depois de alinhadas e editadas, foram feitas análises da diversidade genética das populações das espécies do gênero, através da inferência dos índices de diversidade gênica (nucleotídica) π e haplotípica (h) (Nei, 1987) para a caracterização das sequências. Para as análises de relação filogenética entre

as espécies, bem como as análises baseadas em coalescência, foram retirados os sítios com mutação relacionados à microssatélites, devido a maior taxa mutacional nessas regiões em relação aos demais sítios amostrados.

Para entender as relações filogenéticas e as relações de proximidade entre as espécies e entre cada haplótipo amostrado foi utilizada a metodologia de “*median-joining network*”, onde é utilizado o método de máxima parcimônia e são inseridos alguns vetores médios, interpretados biologicamente como haplótipos não amostrados ou presentes em ancestrais já extintos (Bandelt *et al.*, 1999) realizada utilizando o programa Network 4.6 (Forster *et al.*, 2000), de maneira que cada sítio teve peso igual para a construção da rede.

Para a complementação da análise filogenética foi construída uma árvore filogenética pela metodologia Bayesiana. A construção da árvore se deu através do programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), que utiliza a metodologia de Cadeias de Markov pelo método de Monte Carlo (MCMC) para a procura das topologias. Para compor o grupo externo foi utilizada uma espécie do gênero *Anthodiscus*, pertencente também à família Caryocaraceae. A escolha do modelo evolutivo das sequências dos indivíduos de todas as espécies, que foi utilizado como informação *a priori* para a construção da árvore, foi feita no programa jModelTest (Posada, 2008), através da metodologia de máxima verossimilhança seguida pelo critério de informação de Akaike. O modelo escolhido foi o TPM1uf+ Γ . Foram utilizados sete milhões de passos em quatro cadeias diferentes, sendo três quentes e uma fria, com uma topologia inicial aleatória, de modo que as topologias seriam amostradas a cada mil passos da cadeia de Markov. Foram descartados os 1,25 milhões de passos iniciais como *burnin* e as demais topologias foram utilizadas para obter a árvore consenso com as topologias de maior probabilidade posterior, segundo a metodologia Bayesiana.

Para medir o nível de estruturação genética e a presença de populações ou grupos distintos geneticamente foram realizadas análises de variância molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) com as espécies, e com as populações das espécies *C. brasiliense*, *C. cuneatum* e *C. coriaceum*. Para elucidar se a estruturação genética presente nas populações de *C. brasiliense* e *C. cuneatum* são causadas por efeito da distância geográfica entre as mesmas ou por eventos vicariantes foi realizado um teste de Mantel. As

populações foram georreferenciadas e matrizes geográficas foram obtidas através da distância em linha reta entre cada uma delas. Todas as análises acima foram realizadas utilizando o programa Arlequin ver 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

Para testar possíveis variações demográficas no passado foram realizados testes de neutralidade utilizando os parâmetros D de Tajima (Tajima, 1989), F_s de Fu (Fu, 1997) e o cálculo da distribuição Mismatch (Slatkin & Hudson 1991; Rogers & Harpending, 1992) com a estimativa dos parâmetros de expansão demográfica (τ , θ_0 e θ_1) medidos através da metodologia dos quadrados mínimos generalizados (Schneider & Excoffier, 1999). Todas as análises acima foram realizadas utilizando o programa Arlequin ver 3.5.

Além disso, os parâmetros demográficos, e de migração utilizando as genealogias de coalescência foram inferidos pela abordagem Bayesiana utilizando o programa Lamarc 2.1.6 (Kuhner, 2006). O programa utiliza-se do método MCMC para o cálculo dos parâmetros de *coalescence force* (θ), *growth force* (g) e *migration force* (m) (Kuhner, 2006). As análises foram feitas para as três espécies encontradas na diagonal seca brasileira, *C. brasiliense*, *C. coriaceum* e *C. cuneatum*. Para tal foram utilizadas 20 cadeias iniciais com 4000 passos e três cadeias finais de 50000 passos com um *burnin* de 2000 para cadeias iniciais e 3000 para cadeias finais. Foi utilizado o programa jModelTest para a escolha do melhor modelo evolutivo para as sequências de cada espécie e para as três foi escolhido o modelo F81, e as informações foram inseridas como informação *a priori* para os cálculos dos parâmetros citados acima.

Por fim, foi utilizada a teoria de coalescência para inferir os tempos de divergência entre as espécies analisadas, utilizando-se de metodologia Bayesiana realizada no pacote BEAST (Drummond & Rambaut, 2007). Para tal utilizou-se duas taxas de mutação descrita para regiões intergênicas cloroplastidiais, sendo uma para inserções e deleções de $0,8 \pm 0,04 \times 10^{-9}$ mutações por sítio por ano e outra de substituições de $1,52 \pm 0,06 \times 10^{-9}$ (Yamane *et al.*, 2006) e a informação *a priori* sobre a idade do gênero *Caryocar* - 55 milhões de anos (Davis *et al.*, 2005). Foram utilizados 30000000 de passos da cadeia de Markov, com amostragem de topologia a cada 1000 passos, com o modelo de relógio molecular relaxado, e assumindo que as espécies do

gênero *Caryocar* formam um grupo monofilético. Após isso foram combinados os resultados gerados com as duas taxas mutacionais para a obtenção das datas do ancestral comum mais recente dos grupos. Escolhemos utilizar a taxa descrita por Yamane e colaboradores (2006) mesmo existindo outras taxas até mais rápidas descritas (e.g. Wolfe et al. 1987) devido ao baixo valor dos índices θ , inferido baseado em coalescência em análise realizada no programa Lamarc, indicando que a evolução nas espécies ocorreu de forma mais lenta.

As análises bayesianas foram analisadas com o programa Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond, 2009) para a análise do número efetivo de amostras, e evitar possíveis resultados baseados em dados autocorrelacionados, resultantes de topologias restritas a pequeno espaço amostral. Foram aceitas análises com o número efetivo de amostras, no mínimo, superior a 150. A visualização e edição das topologias foram realizadas no programa FigTree 1.3 (Rambaut, 2009).

5. Resultados

5.1 Variações nas sequências e diversidade genética

Foram sequenciadas duas regiões intergênicas do DNA cloroplastidial. A região trnH-psbA contou com 381 pares de base e a região trnC-ycf6 com 404, totalizando 785 pares de base sequenciados de 269 indivíduos do gênero *Caryocar* e um indivíduo do gênero *Anthodiscus*. Ao analisar as sequências concatenadas de todos os 270 indivíduos foram encontrados 722 sítios conservados, 57 substituições – 28 delas informativas para parcimônia e 29 *singletons* – e 17 eventos de inserção/deleção (*indels*). Observando somente os indivíduos do gênero *Caryocar* foram encontrados 751 sítios conservados, 28 substituições – todos eles informativos para parcimônia – e 17 *indels*. A região trnH-psbA foi responsável pelo grande número de *indels*, com deleções de grande porte de até 150 pares de base em indivíduos da população de Querência - MT de *C. brasiliense* e outros com 98 pares de base em *C. microcarpum*. Ao todo foram encontrados 23 haplótipos, sendo um deles pertencente ao grupo externo, *Anthodiscus* sp. Ao analisar todos os indivíduos de todas as espécies de *Caryocar* observamos uma diversidade haplotípica total (h) de 0,743 e uma diversidade nucleotídica (π) de $0,00375 \pm 0,00217$.

Caryocar brasiliense

Os 785 pares de base analisados nos 133 indivíduos de *C. brasiliense* sequenciados apresentaram 781 sítios conservados, duas substituições (ambas informativas para parcimônia) e dois *indels*, reunindo no total cinco haplótipos. A espécie apresentou índices de diversidades baixos em relação a trabalhos anteriores sendo $\pi = 0,000419 \pm 0,000472$ e $h = 0,283$, variando de 0,711 para a população de Querência - MT, a zero em diversas populações (os índices de diversidade estão resumidos na Tabela 3).

Tabela 3 – Índices de diversidade na espécie *C. brasiliense* DP – desvio padrão.

População	h	$\pi (\pm DP)$
AGE	0,000	0,00000 $\pm$ 0,00000
CGR	0,000	0,00000 $\pm$ 0,00000
CNV	0,248	0,00032 $\pm$ 0,00043
FAR	0,500	0,00065 $\pm$ 0,00068
GSV	0,000	0,00000 $\pm$ 0,00000
ITI	0,000	0,00000 $\pm$ 0,00000
MTR	0,000	0,00000 $\pm$ 0,00000
NSJ	0,600	0,00078 $\pm$ 0,00085
QUE	0,711	0,00141 $\pm$ 0,00114
TOC	0,538	0,00069 $\pm$ 0,00069
URU	0,000	0,00000 $\pm$ 0,00000
Total	0,283	-
Média	0,236	0,000419
DP	0,292	0,000472

Caryocar cuneatum

Os 785 pares de base analisados nos 73 indivíduos de *C. cuneatum* sequenciados apresentaram 781 sítios conservados, e quatro *indels*, reunindo no total cinco haplótipos. A espécie apresentou os seguintes valores de diversidade: $\pi = 0,00052 \pm 0,00054$ e $h = 0,350$, variando de 0,543 para a população de Posse - GO, a 0,125 na população de Barreiras - BA (os índices de diversidade estão resumidos na Tabela 4).

Caryocar coriaceum

Os 785 pares de base analisados nos 11 indivíduos de *C. coriaceum* sequenciados apresentaram 784 sítios conservados, e um *indel*, reunindo no total dois haplótipos. A espécie apresentou os seguintes valores de diversidade: $\pi = 0,00056 \pm 0,00061$ e $h = 0,436$.

Tabela 4 – Índices de diversidade na espécie *C. cuneatum*. DP – desvio padrão.

População	<i>h</i>	π (+DP)
BAR	0,125	0,00016 $\pm$ 0,00029
DAR	0,440	0,00057 $\pm$ 0,00060
EST	0,257	0,00049 $\pm$ 0,00055
POS	0,543	0,00088 $\pm$ 0,00080
SFI	0,410	0,00056 $\pm$ 0,00060
Total	0,350	-
Média	0,355	0,00052
Desvio padrão	0,164	0,00054

5.2 Reconstruções filogenéticas

A Figura 7 mostra a reconstituição da relação filogenética, pela metodologia Bayesiana, dos indivíduos. Essa metodologia não foi muito eficaz na separação dos indivíduos. Isso fica evidente pela falta de resolução das relações filogenéticas entre as espécies *C. brasiliense*, *C. glabrum*, *C. pallidum* e *C. villosum*. Porém esse resultado não é incomum para relação filogenética entre indivíduos de uma mesma espécie. Por meio da árvore observamos que a espécie *C. microcarpum* não se apresenta monofilética sendo representada por dois clados bastantes distintos, sendo um deles próximo à espécie *C. costaricense*. A espécie *C. edule* apresenta proximidade ao clado de *C. microcarpum* e *C. costaricense*. Observa-se que existem dois clados diferenciados dentre os indivíduos de *C. brasiliense*, o primeiro formado por dois indivíduos da população de Caldas Novas – Goiás e o segundo formado por indivíduos da população de Querência – Mato Grosso. Esses clados não possuem grande probabilidade posterior, porém indicam que nessas localidades existe maior diversidade, com indivíduos diferenciados dos demais componentes da população e da espécie. Observa-se também, apesar do clado apresentar probabilidade posterior relativamente baixa, a separação entre as espécies com distribuição mais ao norte da diagonal seca brasileira, *C. cuneatum* e *C. coriaceum*, com a espécie *C. brasiliense*, que se distribui mais ao sul.

Ao observarmos a figura da rede de haplótipos (Figura 8), podemos ter uma idéia melhor da relação entre o grupo não resolvido pela árvore filogenética. Foram amostrados 23 haplótipos no gênero *Caryocar*. O grupo externo se encontra numa posição intermediária entre as espécies, indicando que todas as espécies atuais são derivadas. O grupo da diagonal seca brasileira, juntamente com mais três espécies da região Amazônica encontram-se próximos entre si, separados por poucos passos mutacionais e com a presença de compartilhamento de haplótipos entre as espécies *C. brasiliense* e *C. villosum*, entre *C. cuneatum* e *C. coriaceum* e entre *C. glabrum* e *C. pallidum*. Os indivíduos de *C. villosum* que não tiveram haplótipos compartilhados com *C. brasiliense* foram somente os indivíduos da população coletada as margens do rio Negro. Foram observadas também várias relações ambíguas. A proximidade entre as espécies e a falta de polimorfismo na região analisada pode ter dificultado a separação das mesmas. Na rede de haplótipos observamos novamente a separação de *C. microcarpum* em dois grupos distintos e a proximidade de *C. edule* à *C. costaricense*. A distribuição dos haplótipos em cada população encontra-se na Tabela 5.

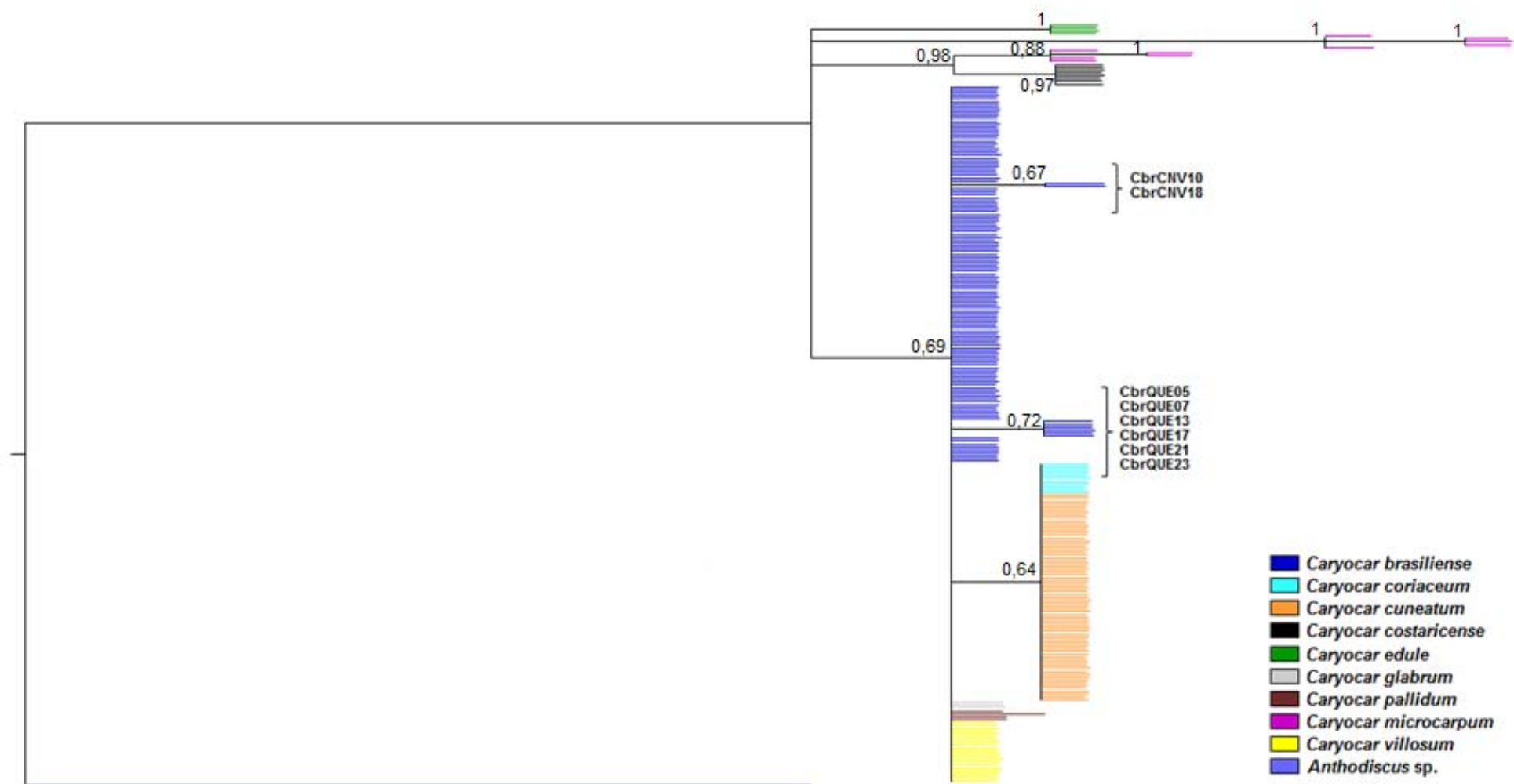


Figura 7. Árvore filogenética bayesiana (consenso da maioria) representando a relação filogenética dicotômica entre os indivíduos utilizados no trabalho. Probabilidade posterior representada.

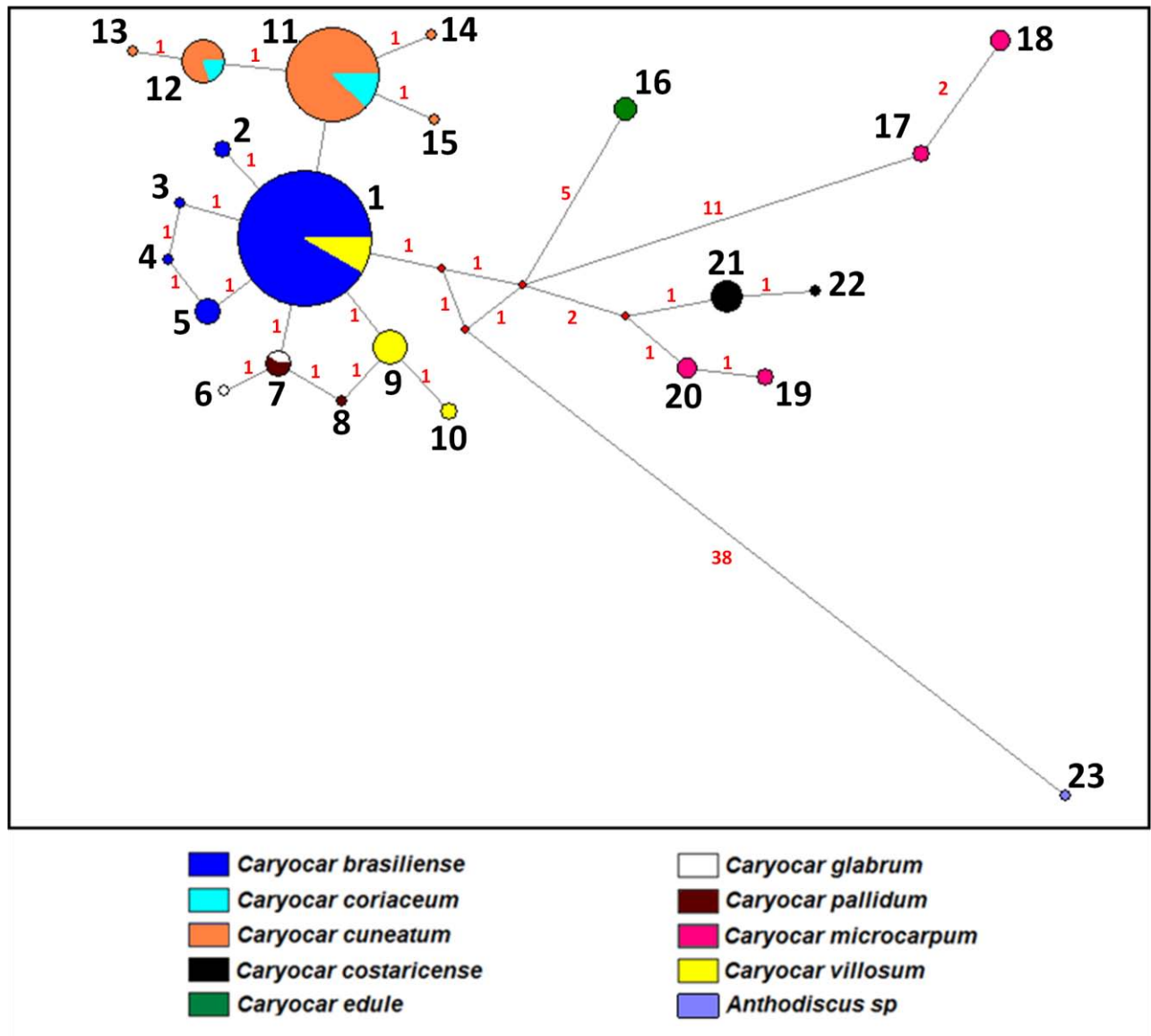


Figura 8. Rede de haplótipos das espécies do gênero *Caryocar*. Círculos em vermelho correspondem aos haplótipos não amostrados ou extintos. Números em vermelho representam a quantidade de passos mutacionais que separam os dois haplótipos.

Tabela 5 – Lista de haplótipos e frequência nas populações.

Haplótipo	Espécie	Populações (Número de indivíduos)	Número total de Indivíduos
1	<i>Caryocar brasiliense</i>	AGE (16), CGR (14), CNV (13), FARd (6) FARf (3), GSV (16), ITI (16), MTR (16), NSJ (5), QUE (3), TOC (13), URU (3)	135
	<i>Caryocar villosum</i>	Reserva Ducke (11)	
2	<i>Caryocar brasiliense</i>	CNV (2)	2
3	<i>Caryocar brasiliense</i>	QUE (1)	1
4	<i>Caryocar brasiliense</i>	QUE (1)	1
5	<i>Caryocar brasiliense</i>	QUE (5)	5
6	<i>Caryocar glabrum</i>	Reserva Ducke (1)	1
	<i>Caryocar glabrum</i>	Reserva Ducke (2)	
7	<i>Caryocar pallidum</i>	Reserva Ducke (3)	5
8	<i>Caryocar pallidum</i>	Reserva Ducke (1)	1
9	<i>Caryocar villosum</i>	Margens do Rio Negro (9)	9
10	<i>Caryocar villosum</i>	Margens do Rio Negro (2)	2
11	<i>Caryocar cuneatum</i>	BAR (15), DAR (10), EST (13), POS (10), SFI (10)	66
	<i>Caryocar coriaceum</i>	CRA (8)	
12	<i>Caryocar cuneatum</i>	BAR (1), DAR (4), EST (1), POS (4), SFI (2)	15
	<i>Caryocar coriaceum</i>	CRA (3)	
13	<i>Caryocar cuneatum</i>	EST (1)	1
14	<i>Caryocar cuneatum</i>	POS (1)	1
15	<i>Caryocar cuneatum</i>	SFI (1)	1
16	<i>Caryocar edule</i>	Porto Seguro - BA (4)	4
17	<i>Caryocar microcarpum</i>	Margens do Rio Negro (2)	2
18	<i>Caryocar microcarpum</i>	Margens do Rio Negro (3)	3
19	<i>Caryocar microcarpum</i>	Margens do Rio Negro (2)	2
20	<i>Caryocar microcarpum</i>	Margens do Rio Negro (3)	3
21	<i>Caryocar costaricense</i>	Costa Rica (7)	7
22	<i>Caryocar costaricense</i>	Costa Rica (1)	1
23	<i>Anthodiscus</i> sp	Reserva Ducke (1)	1

5.3 Estrutura genética, demografia e coalescência

A variabilidade genética do gênero *Caryocar* ficou fortemente estruturada entre as espécies estudadas. A análise de variância molecular (AMOVA) apresentou o índice $\Phi_{ST} = 0,805$ ($p < 0,0001$) indicando que 80,5% da variabilidade existente se encontra estruturada entre espécies e 19,5% dentro das espécies. A Tabela 6 mostra os valores de Φ_{ST} entre os pares de espécies. Uma particularidade foi a ausência de significância do valor de Φ_{ST} entre as espécies *C. glabrum* e *C. pallidum*, além do baixo valor de Φ_{ST} , embora significativo, entre as espécies *C. brasiliense* e *C. villosum*.

Tabela 6 – Valores de Φ_{ST} par a par entre as espécies do gênero *Caryocar*. Diagonal superior: índices Φ_{ST} ; Diagonal inferior: significância (* - significativo; ns – não significativo).

Espécie	C. brasiliense	C. cuneatum	C. coriaceum	C. edule	C. glabrum	C. pallidum	C. villosum	C. microcarpum	C. costaricense
C. brasiliense	0,000	0,747	0,862	0,972	0,764	0,759	0,381	0,893	0,972
C. cuneatum	*	0,000	0,701	0,968	0,825	0,833	0,710	0,855	0,968
C. coriaceum	*	*	0,000	0,975	0,859	0,872	0,747	0,606	0,973
C. edule	*	*	*	0,000	0,976	0,978	0,931	0,596	0,983
C. glabrum	*	*	*	*	0,000	0,014	0,569	0,443	0,972
C. pallidum	*	*	*	*	ns	0,000	0,519	0,480	0,974
C. villosum	*	*	*	*	*	*	0,000	0,680	0,936
C. microcarpum	*	*	*	*	*	*	*	0,000	0,614
C. costaricense	*	*	*	*	*	*	*	*	0,000

Dentre as espécies da diagonal seca brasileira, *C. brasiliense* e *C. cuneatum* possuem mais de uma população e foi possível realizar os testes de estruturação populacional. Para *C. cuneatum* a AMOVA não foi significativa e os índices Φ_{ST} par a par também não apresentaram nenhum valor significativo (Tabela 7). Porém, para *C. brasiliense*, a AMOVA foi significativa $\Phi_{ST} = 0,363$. Os índices Φ_{ST} entre os pares de populações são apresentados na Tabela 7. As populações de Formoso do Araguaia - TO, Porto Nacional - TO (populações

próximas ao limite norte da distribuição) e Querência – MT (população próxima ao limite oeste da distribuição) apresentaram valores significativos em relação a quase todas as demais populações. Outra população do estado do Mato Grosso, de Novo São Joaquim, também apresentou valores elevados de Φ_{ST} , porém não significativos. Ao se retirar as populações do norte da distribuição (Porto Nacional e Fazenda Araguaia no Tocantins) e do oeste (Querência e Novo São Joaquim no Mato Grosso) a estruturação deixou de ser significativa ($\Phi_{ST} = 0,064$; $p = 0,096$).

Para testar a hipótese de que a distância entre as populações seja a responsável pelo padrão de isolamento das mesmas foi realizado um Teste de Mantel com as populações de *C. brasiliense* e *C. cuneatum*. Para *C. cuneatum* não houve valor significativo. Para *C. brasiliense* a significância da relação é questionável ($r = 0,248$; $p = 0,068$), porém esse padrão pode ter sido influenciado pelo fato de que as populações com maiores valores de Φ_{ST} sejam justamente aquelas que estão nos extremos da distribuição. Ao serem retiradas essas populações o valor deixou de ser significativo. As comparações entre as populações da diagonal seca demonstraram alta estruturação entre as populações de diferentes espécies, com menor grau entre *C. cuneatum* e *C. coriaceum* e valores menores para a população de Posse - GO em relação às demais populações, nas comparações de divergência com as populações das espécies de *C. brasiliense* e *C. cuneatum*.

As distribuições *mismatch* de Roger-Harpending em todas as espécies e em praticamente todas as populações analisadas, bem como os testes de neutralidade de Tajima e de Fu não foram significativas. As únicas exceções foram as populações de *C. brasiliense* de Formoso do Araguaia - TO e de Querência - MT apresentaram valores de F_s negativos e significativos (-17,355 e -14,507 respectivamente - $p < 0,001$) e a população de *C. coriaceum* de Crato - CE que também apresentou valor de F_s negativo (-24,57 - $p < 0,001$) indicando uma possível retração populacional no passado.

As análises demográficas baseadas em coalescência obtidas pela metodologia Bayesiana também deram suporte para a hipótese de que as populações e espécies da diagonal seca brasileira se mantiveram em tamanho constante ao longo do tempo evolutivo, evidenciado pelos índices g (*growth force*) não significativos. As populações da diagonal seca brasileira também

apresentaram pequeno tamanho efetivo ao longo da história evolutiva, em vista do pequeno valor do índice θ (*coalescence force* - Tabelas 8, 9 e 10). As populações da espécie *C. brasiliense* de Novo São Joaquim - MT e Uruaçu - GO foram retiradas das análises demográficas por apresentarem pequeno tamanho populacional.

Tabela 7 - Valores de Φ_{ST} par a par entre as populações de *Caryocar* da diagonal seca. Diagonal superior: índices Φ_{ST} ; Diagonal inferior: significância (* - significativo; ns – não significativo).

Populações	AGE	CGR	CNV	GSV	FAR	ITI	MTR	TOC	URU	QUE	NSJ	BAR	DAR	EST	POS	SFI	CRA
AGE	0,000	0,000	0,078	0,000	0,356	0,000	0,000	0,533	0,000	0,480	0,532	0,941	0,840	0,846	0,762	0,840	0,922
CGR	ns	0,000	0,065	0,000	0,330	0,000	0,000	0,512	0,000	0,455	0,499	0,937	0,829	0,836	0,748	0,829	0,916
CNV	ns	ns	0,000	0,078	0,225	0,078	0,078	0,423	-0,134	0,397	0,292	0,846	0,760	0,764	0,696	0,754	0,864
GSV	ns	ns	ns	0,000	0,356	0,000	0,000	0,533	0,000	0,480	0,532	0,941	0,840	0,846	0,762	0,840	0,922
FAR	*	ns	*	*	0,000	0,356	0,356	-0,014	0,053	0,312	-0,173	0,811	0,713	0,721	0,648	0,704	0,822
ITI	ns	ns	ns	ns	*	0,000	0,000	0,533	0,000	0,480	0,532	0,941	0,840	0,846	0,762	0,840	0,922
MTR	ns	ns	ns	ns	*	ns	0,000	0,533	0,000	0,480	0,532	0,941	0,840	0,846	0,762	0,840	0,922
TOC	*	*	*	*	ns	*	*	0,000	0,297	0,403	-0,116	0,805	0,733	0,738	0,682	0,725	0,825
URU	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,000	0,196	0,118	0,899	0,725	0,741	0,615	0,718	0,846
QUE	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	0,000	0,271	0,739	0,670	0,677	0,627	0,658	0,764
NSJ	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	0,000	0,834	0,711	0,724	0,633	0,702	0,818
BAR	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,000	0,105	-0,027	0,059	-0,016	0,804
DAR	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	0,000	-0,001	-0,056	-0,021	0,688
EST	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	ns	0,000	-0,008	-0,047	0,711
POS	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	ns	ns	0,000	-0,024	0,588
SFI	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	ns	ns	ns	0,000	0,693
CRA	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,000

Tabela 8 – Índices demográficos das populações da diagonal seca brasileira. ICi – intervalo de credibilidade inferior; ICs – intervalo de credibilidade superior.

Espécie	θ	ICi 95% θ	ICs 95% θ	g	ICi 95% g	ICs 95% g
<i>C. brasiliense</i>	5,82E-4	7,23E-5	2,08E-3	880,627 ^{ns}	-456,947	980,358
<i>C. cuneatum</i>	3,47E-5	1,04E-5	2,52E-4	512,650 ^{ns}	-471,535	971,950
<i>C. coriaceum</i>	1,46E-5	1,04E-5	1,02E-3	787,049 ^{ns}	-470,618	973,349

Tabela 9 – Índices demográficos das populações de *C. brasiliense* baseados na abordagem de coalescência por metodologia Bayesiana. ICi – intervalo de credibilidade inferior; ICs – intervalo de credibilidade superior.

População	θ	ICi 95% θ	ICs 95% θ	g	ICi 95% g	ICs 95% g
AGE	6,32E-5	1,11E-5	2,59E-4	850,614 ^{ns}	-478,470	979,270
CGR	1,90E-5	9,96E-6	3,71E-4	-316,139 ^{ns}	-479,484	977,840
CNV	3,36E-4	5,52E-5	2,14E-3	864,897 ^{ns}	-458,006	989,728
FAR	1,79E-5	1,05E-5	4,92E-4	860,316 ^{ns}	-477,002	985,821
GSV	1,68E-4	1,45E-5	6,20E-4	676,101 ^{ns}	-465,472	979,440
ITI	2,99E-4	9,74E-6	9,87E-4	852,854 ^{ns}	-473,417	984,797
MTR	9,87E-5	1,04E-5	4,44E-4	289,191 ^{ns}	-478,561	982,996
QUE	3,18E-4	3,96E-5	2,02E-3	866,529 ^{ns}	-471,170	990,797
TOC	2,75E-5	1,06E-5	1,19E-3	816,873 ^{ns}	-469,515	975,741

Tabela 10 – Índices demográficos das populações de *C. cuneatum* baseados na abordagem de coalescência por metodologia Bayesiana. ICi – intervalo de credibilidade inferior; ICs – intervalo de credibilidade superior.

População	θ	ICi 95% θ	ICs 95% θ	g	ICi 95% g	ICs 95% g
BAR	1,59E-5	1,03E-5	5,52E-4	757,649 ^{ns}	-471,720	985,715
DAR	2,35E-5	1,03E-5	1,38E-3	854,257 ^{ns}	-476,437	986,104
EST	7,30E-5	1,10E-5	9,98E-4	824,737 ^{ns}	-477,020	981,772
POS	1,60E-5	1,07E-5	7,39E-4	794,471 ^{ns}	-478,525	985,230
SFI	2,64E-5	1,06E-5	7,94E-4	848,958 ^{ns}	-468,967	983,220

Quanto ao número de migrantes por geração bidirecional ($m \times \theta$); inferido através da abordagem coalescente pela metodologia Bayesiana, para

C. brasiliense, os valores foram muito semelhantes, demonstrando que o nível de fluxo gênico histórico foi relativamente baixo entre as populações (Tabela 11).

Tabela 11 – Número de migrantes por geração entre as populações de *C. brasiliense* baseados na abordagem de coalescência por metodologia Bayesiana. As populações fontes estão nas colunas e as receptoras nas linhas.

População	AGE	CGR	CNV	FAR	GSV	ITI	MTR	QUE	TOC
AGE	-	1.79E-2	6.94E-3	1.96E-2	6.64E-4	8.54E-3	3.31E-3	2.09E-2	2.17E-2
CGR	2.55E-3	-	5.80E-3	7.28E-4	6.93E-3	3.14E-3	2.67E-3	6.03E-3	2.33E-3
CNV	2.62E-2	1.57E-2	-	1.35E-2	5.55E-2	1.46E-3	1.84E-3	7.68E-2	4.54E-4
FAR	4.89E-3	1.39E-3	3.40E-3	-	5.41E-3	4.59E-3	5.98E-3	6.31E-3	1.29E-3
GSV	2.99E-2	1.51E-2	5.67E-2	2.28E-2	-	7.72E-3	5.10E-2	3.93E-2	5.30E-2
ITI	1.22E-2	3.20E-3	3.46E-2	2.20E-2	1.15E-2	-	1.72E-2	1.00E-1	6.52E-2
MTR	1.52E-2	1.54E-2	2.03E-2	4.15E-3	2.39E-2	3.07E-2	-	3.09E-2	5.57E-3
QUE	1.15E-2	3.61E-2	8.01E-2	2.85E-2	1.54E-2	4.00E-3	3.78E-3	-	2.56E-2
TOC	8.92E-3	2.33E-3	7.35E-3	4.18E-3	8.64E-3	8.55E-3	4.52E-3	8.72E-3	-

Analisando o número de migrantes por geração bidirecional para *C. cuneatum*, observamos também ausência de padrões e um baixo nível de troca genética entre todas as populações, mesmo com a ausência de estruturação genética na espécie (Tabela 12).

Tabela 12 – Número de migrantes por geração entre as populações de *C. cuneatum* baseados na abordagem de coalescência por metodologia Bayesiana. As populações fontes estão nas colunas e as receptoras nas linhas.

População	BAR	DAR	EST	POS	SFI
BAR	-	5,79E-3	5,44E-3	5,85E-3	6,06E-3
DAR	9,15E-3	-	8,65E-3	6,92E-3	8,91E-3
EST	2,52E-2	2,37E-2	-	2,70E-2	2,16E-2
POS	5,69E-3	5,55E-3	5,19E-3	-	5,22E-3
SFI	1,01E-2	1,07E-2	9,67E-3	9,50E-3	-

Por fim, a análise coalescente para descobrir os tempos onde as espécies e populações possuíam um ancestral comum (TMRCA – do inglês Time to the Most Recent Common Ancestor) indicou que o ancestral mais recente para as espécies do gênero *Caryocar* ocorreu por volta de 10,387 milhões de anos atrás (Intervalo de credibilidade de 95%: de 6.100.000 a 13.703.000 anos) o que é bem anterior aos períodos glaciais do Quaternário, se localizando no Mioceno médio. Porém o surgimento do grupo de espécies de áreas abertas ocorreu por volta de 2,480 milhões de anos atrás (Intervalo de credibilidade de 95%: de 560.000 a 2.693.000 anos), e o surgimento das espécies com distribuição mais ao norte da diagonal ocorreu por volta de 1,216 milhões de anos atrás (Intervalo de credibilidade de 95%: de 370.000 a 1.300.000 anos) período que coincide com as glaciações do Pré-Ilinóico.

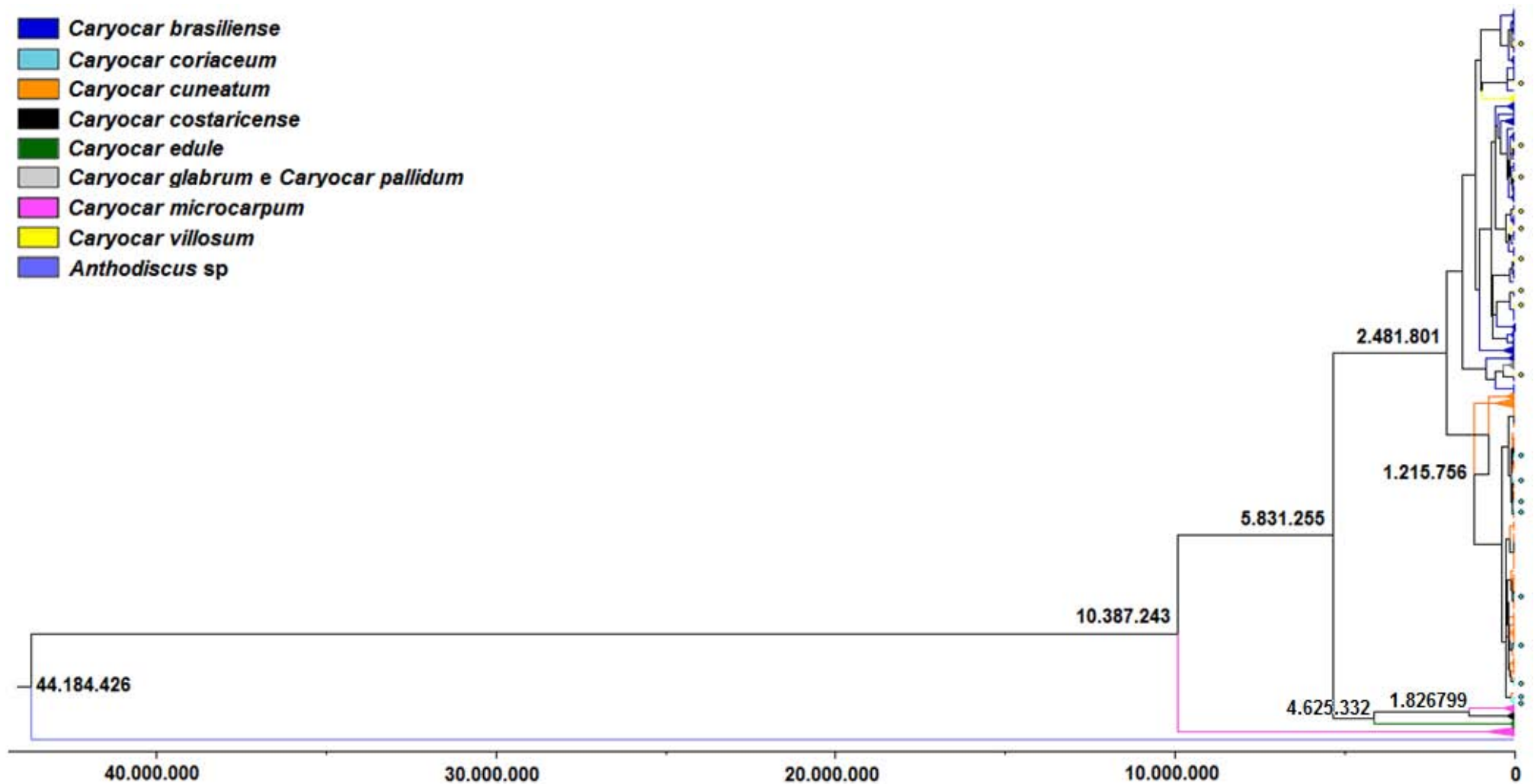


Figura 9. Árvore de coalescência e tempos de divergência das espécies estudadas. Bolas em azul e amarelo indicam indivíduos de *C. coriaceum* e *C. villosum* respectivamente. Chave em cinza indicando indivíduos de *C. glabrum* e *C. pallidum*.

6. Discussão

A variabilidade genética das espécies do gênero nos locos analisados foi baixa. Ao analisar os dados para as espécies da diagonal seca brasileira, *C. brasiliense*, *C. cuneatum* e *C. coriaceum*, o padrão de baixa diversidade se mantém. Ao se comparar a diversidade observada em nosso estudo com estudos realizados com outras espécies de árvores do Cerrado brasileiro que apresentaram regiões analisadas em comum (Collevatti *et al.*, 2003, *in press.*; Ramos *et al.*, 2007, 2009) confirma-se que a diversidade genética nas espécies do gênero *Caryocar* é mais baixa que a encontrada nas demais espécies, embora os resultados encontrados para a espécie *Lychnophora ericoides* (Collevatti *et al.*, 2009a) sejam semelhantes aos observados para as espécies da diagonal seca. Essa baixa diversidade pode ser devido a pequenos tamanhos efetivos ao longo do tempo evolutivo, evidenciado pelos baixos valores do índice θ observado para todas as espécies e populações analisadas.

A árvore filogenética Bayesiana evidenciou a possibilidade de uma possível espécie críptica presente em *Caryocar microcarpum*, que foi representada em dois clados distintos com altos valores de probabilidade posterior suportando-os. Esse resultado indica que dentro da mesma população possam existir dois grupos distintos geneticamente. Collevatti e colaboradores (2009b) também utilizaram os indivíduos do presente trabalho para observar o papel do Rio Negro como barreira para a dispersão da espécie, e concluiu que existe fluxo gênico entre as populações das duas margens. Em ambas as margens foram encontrados indivíduos dos dois grupos genéticos, evidenciando que o rio não foi responsável pela diferenciação genética. Nesse estudo foram utilizados somente três espécies do gênero e ainda assim foi notada essa grande diferença, principalmente em relação à região trnH-psbA, que também foi utilizada em nosso trabalho. Porém agora notamos uma proximidade maior entre alguns indivíduos de *C. microcarpum* e indivíduos de *C. costaricense* do que entre todos os indivíduos de *C. microcarpum*.

Observa-se também que a árvore Bayesiana separou um clado derivado onde estão presentes as espécies da diagonal seca, *C. brasiliense*, *C.*

cuneatum e *C. coriaceum*, juntamente com três espécies amazônicas *C. glabrum*, *C. pallidum* e *C. villosum*. As informações obtidas do registro fóssil são congruentes com nosso resultado, onde observamos que o registro mais antigo da família Caryocaraceae foi encontrado em bioma florestal, na Venezuela, datado do Eoceno Médio (Muller, 1981). Além disso, a maioria das espécies do gênero são encontradas em regiões florestais (Prance & Silva, 1973). Simon e colaboradores (2009) apontaram evidências de que as espécies que ocupam o Cerrado são derivadas de diversos grupos ancestrais que ocupavam outros biomas ancestrais, tais como a Mata Atlântica, Amazônia e Caatinga. Diversos clados ocuparam o Cerrado em diferentes períodos ao longo da história e as adaptações para o novo bioma evoluíram independentemente nesses diferentes clados. Em nossos resultados encontramos a relação próxima de espécies de áreas florestais e aberta em um mesmo clado juntamente com um clado irmão formado por espécies de ambientes florestais. Além disso, a espécie de Caatinga, *C. coriaceum*, foi a mais derivada, formando um clado junto com *C. cuneatum*. Portanto, é provável que as espécies do gênero *Caryocar* presentes na diagonal seca brasileira sejam derivadas de ancestrais presentes em biomas florestais, porém a colonização ocorreu em um mesmo evento evolutivo, com a colonização do Cerrado sendo anterior à ocupação da Caatinga.

Entretanto, ao observar a árvore filogenética Bayesiana encontramos algumas relações não resolvidas. Posada & Crandall (2001) sugerem que é provável que as árvores filogenéticas não sejam ideais para a identificação de grupos intraespecíficos e podem causar baixa resolução filogenética, sendo as redes de haplótipos mais aplicáveis a esse problema. Devido ao possível problema de co-existência de haplótipos ancestrais e derivados que pode existir em análises intraespecíficas ou entre espécies muito próximas a rede de haplótipos pode ter maior sucesso em resolver as relações filogenéticas. Entretanto, para a relação entre as espécies da diagonal seca, ao analisar a rede de haplótipos observamos um padrão semelhante, com compartilhamento de haplótipos entre *C. cuneatum* e *C. coriaceum*. As espécies hoje são não possuem sobreposição de distribuição geográfica, fazendo possível acreditar na existência de compartilhamento de polimorfismo ancestral entre as linhagens.

Foram observados também outros dois casos de compartilhamento de haplótipos entre espécies. Um deles foi entre *C. glabrum* e *C. pallidum*. Existem evidências, devido à morfologia floral, de que as espécies do gênero *Caryocar* sejam polinizadas por morcegos (Prance & Silva, 1973). As duas espécies foram coletadas na Reserva Ducke. A partir da análise dessas características, não pode ser descartada a possibilidade de que possa ocorrer hibridização entre os indivíduos das duas espécies, porém não podemos descartar a possibilidade de retenção de polimorfismo ancestral, devido ao baixo número de indivíduos analisados.

O terceiro caso é entre as espécies *C. brasiliense* e *C. villosum*. Já foram encontradas outras evidências de compartilhamento de haplótipos entre as duas espécies. Collevatti e colaboradores (2003) encontraram uma menor diferenciação genética entre *C. brasiliense* e *C. villosum* do que a diferenciação entre algumas populações de *C. brasiliense* e o compartilhamento de haplótipos voltou a ser observado em outro estudo envolvendo as duas espécies (Collevatti *et al.*, 2009b). Da mesma maneira como ocorreu entre *C. coriaceum* e *C. cuneatum*, *C. brasiliense* e *C. villosum* atualmente possuem distribuição alopátrica e a hipótese de hibridização atual torna-se bastante improvável, tornando plausível somente a possibilidade de hibridização antiga. Porém, a hipótese mais plausível é a de compartilhamento de polimorfismo ancestral. Essa característica pode ter sido causada por uma diversificação rápida das espécies do gênero. Resultados semelhantes foram encontrados para as espécies do gênero *Begonia* (Goodall-Copestake *et al.*, 2010) que apresentou tempo para ancestral comum semelhante às espécies de *Caryocar*, no Oligoceno entre 24 e 45 milhões de anos atrás (Goodall-Copestake *et al.*, 2009). Existem evidências de uma diversificação explosiva da ordem Malpighiales a partir da origem das florestas tropicais no Cretáceo-Médio (Davis *et al.*, 2005). Esse tipo de diversificação pode ter prosseguido ao longo do tempo na família Caryocaraceae, formando esses padrões observados no presente trabalho.

Dentre as espécies da diagonal seca brasileira, *C. brasiliense* apresentou estruturação populacional. Outros estudos encontraram alta estruturação genética em *C. brasiliense*, tanto baseado em locos microsatélites nucleares (Collevatti *et al.*, 2001a) quanto no genoma plastidial

através de microssatélites e sequências (Collevatti et al, 2003), e essa diferenciação provavelmente é causada pelos eventos de dispersão, já que existem evidências de que o fluxo de pólen é maior que a dispersão de sementes na espécie (Collevatti et al., 2001b). Porém, a estrutura populacional não foi mais significativa quando não foram utilizadas as populações do extremo norte e oeste da distribuição na análise, demonstrando que os agentes dispersores da espécie conseguem manter um bom nível de fluxo gênico entre populações. Logo, algum outro efeito além da capacidade de dispersão da espécie pode ter sido responsável pela estrutura populacional da espécie. Essa estruturação pode ter sido causada por isolamento em refúgios nos períodos glaciais (Collevatti et al., 2003). Collevatti e colaboradores (2003) também sugerem que a população de Itirapina pode ter sido formada por migrantes das populações de Caldas Novas - GO e Campo Grande - MS.

A árvore filogenética Bayesiana demonstrou que as populações de Caldas Novas - GO e Querência - MT apresentaram grupos distintos, o que fez com que os valores de Φ_{ST} par a par envolvendo essas populações fossem altos em algumas situações, principalmente aqueles valores que envolviam a população de Querência, que apresentou um grupo diverso maior. Ao analisar os demais valores de Φ_{ST} par a par observamos que, além da população QUE, as populações de Formoso do Araguaia - TO e de Porto Nacional – TO foram aquelas que apresentaram diferenciação genética com a maioria das demais populações. Além disso, juntamente com a população de Novo São Joaquim - MT as populações de QUE, FAR e TOC foram aquelas com maior diversidade genética em *C. brasiliense*. Existem fortes evidências de que nos períodos glaciais do Pleistoceno o limite sul do Cerrado foi invadido por florestas de araucária (Behling & Liche, 1997). Existe também uma hipótese levantada por Novaes e colaboradores (2010) na qual indica que a colonização da região sul Cerrado foi feita a partir de indivíduos oriundos de regiões mais ao norte do bioma, padrão também observado por outros trabalhos (Collevatti et al., 2003, Ramos et al., 2007; Ramos et al., 2009). Nesse contexto, nossos resultados podem ser indícios de que as populações do limite norte e oeste da distribuição de *C. brasiliense* podem ter tido papel importante na colonização das demais populações se os períodos glaciais afetaram de alguma maneira a distribuição da espécie.

Nossos resultados não foram congruentes com retração populacional, exceto para o teste *F_s* em FAR e QUE, porém trabalhos prévios com outros marcadores encontraram o padrão de retração na espécie (Collevatti *et al.*, 2003). Essas duas populações são aquelas do limite norte e oeste da distribuição, indicando que mesmo que essas possam ter persistido durante possíveis refúgios nos períodos glaciais, as mesmas podem ter sofrido perdas populacionais. Porém em nenhum outro teste apresentou essa evidência, de modo que é mais provável uma manutenção de tamanho constante das populações ao longo da história evolutiva.

A datação dos eventos de coalescência indicou que a origem do grupo das espécies que hoje ocupam a área da diagonal seca brasileira ocorreu no início do período glacial Pré-Ilinóico. Os eventos de glaciação que se seguiram podem ter ocasionado retração das populações ancestrais, como prevê a teoria dos refúgios, de modo que algumas se adaptaram com maior sazonalidade e um período de seca bem definido. A partir daí outros eventos posteriores podem ter sido responsáveis para a separação entre *C. brasiliense* e *C. cuneatum*. Existem estudos que apontam quebras entre as populações do Cerrado e Caatinga (Caramaschi *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2011) apontando eventos de glaciação e barreiras com o rio São Francisco como causadores da quebra. Além disso, a pluviosidade no bioma Caatinga é menor que a existente no Cerrado. Logo, algumas dessas causas podem ser responsáveis pela separação da espécie *C. coriaceum*, que, a partir do teste de neutralidade de *F_u*, apresentou evidência de retração populacional, que pode ter ocorrido devido a restrições na distribuição da população no passado. Da mesma forma, eventos posteriores podem ter separado as duas espécies com distribuição no Cerrado. A utilização de mais marcadores, e consequentemente disponibilidade de mais polimorfismo, poderá elucidar melhor esses padrões e compreender como se deu a diferenciação dentro desse grupo.

7. Conclusão

A partir de nossos resultados podemos concluir que a variabilidade genética existente nas espécies analisadas é relativamente baixa nos locos analisados e isso pode ser decorrente de um tamanho efetivo reduzido ao longo do tempo evolutivo. As espécies se encontraram altamente estruturadas, embora não houve valor significativo de Φ_{ST} entre *C. glabrum* e *C. pallidum*. Nas espécies da diagonal seca, somente *C. brasiliense* apresentou estruturação populacional, porém a estrutura foi influenciada pela constituição genética das populações do limite norte e oeste da distribuição da espécie.

As relações filogenéticas demonstraram que as espécies que ocupam a diagonal seca são derivadas e que existe distinção entre *C. brasiliense* e as demais espécies que estão mais ao norte da região.

Os dados demográficos demonstraram que, no geral, não houve grandes variações nos tamanhos populacionais no decorrer da história evolutiva das espécies analisadas.

O grupo de espécies que hoje se distribuem na diagonal seca brasileira teve divergência datada do início do Pleistoceno, idade marcada por diversas glaciações, e talvez esses eventos possam ser responsáveis pela origem dessas espécies, através de isolamento de populações e evolução alopátrica.

8. Perspectivas

Através de nosso trabalho novas perspectivas surgiram. A primeira delas é aumentar o número de indivíduos sequenciados nas populações com baixo tamanho amostral, bem como sequenciamento das populações amostradas das quais não obtivemos dados moleculares. Além disso, pretendemos também o sequenciamento de mais uma região cloroplastidial e uma região nuclear.

Por fim, buscaremos amostras das demais espécies do gênero *Caryocar* para uma melhor compreensão da relação filogenética e história evolutiva do grupo.

9. Referências bibliográficas

- Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A.; Luikart, G. Genomics and the future of conservation genetics. **Nature Reviews Genetics**, 11: 697-709; 2010.
- Antonelli, A.; Nylander, J. A. A.; Persson, C.; Sanmartín, I. Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106: 9749-9754; 2009.
- Araújo, M. B.; Guisan, A. Five (or so) challenges for species distribution modeling. **Journal of Biogeography**, 33: 1677-1688; 2006.
- Avice, J. C.; Arnold, J.; Ball, R. M. Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J. E.; Reeb, C. A.; Saunders, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18, 489-522; 1987.
- Avice, J. C. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. **Evolution**, 43: 1192-1208; 1989.
- Avice, J. C. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. **Molecular Ecology**, 7: 371-379; 1998.
- Avice, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, 36: 3-15; 2009.
- Azuma, H.; García-Franco, J. G.; Rico-Gray, V.; Thien, L. B. Molecular phylogeny of the Magnoliaceae: the biogeography of tropical and temperate disjunctions. **American Journal of Botany**, 88: 2275-2285; 2001.
- Beaumont, M. A.; Panchal, M. On the validity of nested clade phylogeographical analysis. **Molecular Ecology**, 17: 2563-2565; 2008.
- Behling, H.; Lichte, M. Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical southeastern Brazil. **Quaternary Research**, 48: 348–358; 1997.
- Behling, H. Late Quaternary vegetational and climate changes in Brazil. **Review of Paleobotany and Palynology**, 99: 143-156; 1998.
- Behling, H. South and southeast Brazilian grasslands during the Late Quaternary times: a synthesis. **Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology**, 177: 19-27; 2002.
- Beheregaray, L. B.; Ciofi, C.; Geist, D.; Gibbs, J. P.; Caccone, A.; Rowell, J. R.; Genes record a prehistoric volcano eruption in the Galápagos. **Science**, 302: 75; 2003.

Beheregaray, L. B. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology**, 17: 3754-3774; 2008.

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

Brannstrom, C.; Jepson, W.; Filippi, A. M.; Redo, D.; Xu, Z.; Ganesh, S. Land change in the Brazilian Savanna (Cerrado), 1986-2002: Comparative analysis and implications for land-use policy. **Land Use Policy**, 25: 579-595; 2008.

Burnham R. J.; Johnson, K. R. South American palaeobotany and the origins of neotropical rainforests. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 359: 1595-1610; 2004.

Burney, C. W.; Brumfield, R. T.; Ecology predicts levels of genetic differentiation in Neotropical birds. **The American Naturalist**, 174: 358-368; 2009.

Burton, R. S.; Lee, B. N. Nuclear and mitochondrial gene genealogies and allozyme polymorphism across a major phylogeographic break in the copepod *Tigriopus californicus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 91: 5197-5201; 1994.

Bush, M. B.; Silman, M. R. Observation on Late Pleistocene cooling and precipitation in the lowland Neotropics. **Journal of Quaternary Science**, 19: 677-684; 2004.

Cabanne, G. S.; D'Horta, F. M.; Meyer, D. Silva, J. M. C.; Miyaki, C. Y. Evolution of *Dendrocolaptes platyrostris* (Aves: Furnariidae) between the South American open vegetation corridor and the Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, 103: 801-820; 2011.

Cáceres, N. C.; Casella, J.; Vargas, C. F.; Prates, L. Z.; Tombini, A. A. M.; Goulart, C. S.; Lopes, W. H. Distribuição geográfica de pequenos mamíferos não voadores nas bacias dos rios Araguaia e Paraná, região centro-sul do Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, 98: 173-180; 2008.

Caramaschi, F. P.; Nascimento, F. F.; Cerqueira, R. Bonvicino, C. R. Genetic diversity of wild populations of the grey shorted-tailed opossum, *Monodelphis domestica* (Didelphimorphia: Didelphidae), in Brazilian landscapes. **Biological Journal of the Linnean Society**, 104: 251-263; 2011.

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

Carnaval, A. C.; Hickerson, M. J.; Haddad, C. F. B.; Rodrigues, M. T.; Moritz, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science**, 323: 785-789; 2009.

Carstens, B. C.; Richards, C. L. Integrating coalescent and ecological niche modeling in comparative phylogeography. **Evolution**, 61: 1439-1454; 2007.

Carvalho, F. M. V. De-Marco, P.; Ferreira, L. G. The Cerrado into-pieces: Habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil. **Biological Conservation**, 142: 1392-1403; 2009.

Carvalho, B. A.; Oliveira, L. F. B.; Langguth, A.; Freygang, C. C.; Ferraz, R. S.; Mattevi, M. S. Phylogenetic relationships and phylogeographic patterns in *Monodelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae). **Journal of Mammology**, 92: 121-133; 2011.

Chan, L. M.; Brown, J. L.; Yoder, A. D. Integrating spatial genetic and geospatial methods brings new power to phylogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 59: 523-537; 2011.

Colinvaux, P. A.; De Oliveira, P. E.; Bush, M. B. Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scales: the failure of the aridity and refuge hypothesis. **Quaternary Science Reviews**, 19: 141-169; 2000.

Colinvaux, P. A.; Irion, G.; Räsänen, M. E.; Bush, M. B.; Nunes de Mello, J. A. S. A paradigm to be discarded: geological and paleoecological data falsify the Haffer and Prance refuge hypothesis of Amazonian speciation. **Amazoniana**, 16: 609-646; 2001.

Collevatti, R. G.; Grattapaglia, D.; Hay, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, 10: 349-356; 2001a.

Collevatti, R. G.; Grattapaglia, D.; Hay, J. D. High resolution microsatellite based analysis of mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, 86: 60-67; 2001b.

Collevatti, R. G.; Grattapaglia, D.; Hay, J. D. 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; 2003.

Collevatti, R. G.; Rabelo, S. G.; Vieira, R. F. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. **Annals of Botany**, 104: 655-664; 2009a.

Collevatti, R. G.; Leoi, L. C. T.; Leite, S. A.; Gribel, R. Contrasting patterns of genetic structure in *Caryocar* (Caryocaraceae) congeners from flooded and upland Amazonian forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, 98: 278-290; 2009b.

Colleatti, R. G.; Castro, T. G.; Lima, J. S.; Telles, M. P. C. Phylogeography of *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae), an endangered tree species from rocky savannas, suggests bidirectional expansion due to climate cooling in the Pleistocene. **In press**.

Costa, L. P. 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; 2003.

Davis, C. C.; Webb, C. O.; Wurdack, K. J.; Jaramillo, C. A.; Donoghue, M. J. Explosive radiation of Malpighiales supports a mid-Cretaceous origin of modern tropical rain forests. **The American Naturalist**, 165: e36-365; 2005.

De Oliveira, P. E.; Barreto, A. M. F.; Suguio, K. Late Pleistocene/Holocene climatic and vegetational history of the Brazilian Caatinga: the fossil dunes of the middle São Francisco River. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, 152: 319-337; 1999.

Diniz-Filho, J. A. F.; Telles, M. P. C. Spatial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations. **Conservation Biology**, 16: 924-935; 2002.

Diniz-Filho, J. A. F.; Telles, M. P. C.; Bonatto, S. L.; Eizirik, E.; Freita, T. R. O.; de Marco Jr, P.; Santos, F. R.; Sole-Cava, A.; Soares, T. N. Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. **Journal of Biogeography**, 35: 753-763; 2008.

Donnelly, P.; Tavaré, S. The ages of alleles and a coalescent. **Advances in Applied Probability**, 18: 1-19; 1986.

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15; 1987.

Drummond, A.J.; Rambaut, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, 7: 214-221; 2007.

Dumolin, S.; Demesure, B.; Petit, R. J. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. **Theoretical and Applied Genetics**, 91: 1253-1256; 1995.

Emerson, B. C.; Paradis, E.; Thébaud, C. Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. **TRENDS in Ecology & Evolution**, 16: 707-716; 2001.

Excoffier, L.; Smouse, P.; Quattro, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131: 479-491; 1992.

Excoffier, L.; Lischer, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, 10: 564-567; 2010.

Fairley, T. L.; Póvoa, M. M.; Conn, J. E. Evaluation of the Amazon River delta as a barrier to gene flow for the regional malaria vector, *Anopheles aquasolis* (Diptera: Culicidae) in the northeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 39: 861-869; 2002.

Frankham R.; Ballou, J. D.; Briscoe, D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Fraser D. J.; Bernatchez, L. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. **Molecular Ecology**, 10: 2741-2752; 2001.

Fu, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection. **Genetics**, 147: 915-925; 1997.

Garcia, M. G.; Silva, R. S.; Carniello, M. A.; Veldman, J. W.; Rossi, A. A. B.; Oliveira, L. O. Molecular evidence of cryptic speciation, historical range expansion, and recent intraspecific hybridization in the Neotropical seasonal forest tree *Cedrela fissilis* (Meliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 61: 639-649; 2011.

Garrick, R. C.; Dyer, R. J.; Beheregaray, L. B.; Sunnucks, P. Babies and bathwater: a comment on the premature obituary for nested clade phylogeographical analysis. **Molecular Ecology**, 17: 1401-1403; 2008.

Goodall-Copestake, W. P.; Harris, D. J.; Hollingsworth, P. M. The origin of a mega-diverse genus: dating *Begonia* (Begoniaceae) using alternative datasets, calibrations and relaxed clock methods. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 159: 363-380; 2009.

Goodall-Copestake, W. P.; Pérez-Espona, S.; Harris, D. J.; Hollingsworth, P. M. The early evolution of the mega-diverse genus *Begonia* (Begoniaceae) inferred from organelle DNA phylogenies. **Biological Journal of the Linnean Society**, 101: 243-250; 2010.

Gutiérrez-Rodríguez, C.; Ornelas, J. F.; Rodríguez-Gómez, F. Chloroplast DNA phylogeography of a distylous shrub (*Palicourea padifolia*, Rubiaceae) reveals past fragmentation and demographic expansion in Mexican cloud forests. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 61: 603-615; 2011.

Haffer, J.; Prance, G. T. Impulsos climáticos da evolução na Amazônia durante o Cenozóico: sobre a teoria dos refúgios da diferenciação biótica. **Estudos Avançados**, 16: 175-206; 2002.

Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41: 95-98; 1999.

Hare, M. P. Prospects for nuclear gene phylogeography. **Trends in Ecology and Evolution**, 16: 700-706; 2001.

Hayes, F. E.; Sewlal, J-A. N. The Amazon River as a dispersal barrier to passerine birds: effects of river width, habitat and taxonomy. **Journal of Biogeography**, 31: 1809-1818; 2004.

Hewitt, G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. **Nature**, 405: 907-913; 2000.

Hewitt, G. M. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. **Molecular ecology**, 10: 537-549; 2001.

Hickerson, M. J.; Stahl, E.; Lessios, H. A. Test for simultaneous divergence using approximate Bayesian computation. **Evolution**, 60: 2435-2453; 2006.

Hickerson, M. J.; Meyer, C. Testing comparative phylogeographic model of marine vicariance and dispersal using a hierarchical Bayesian approach. **BMC Evolutionary Biology**, doi: 10.1186/1471-2148-8-322; 2008.

Hickerson, M. J.; Carstens, B. C.; Cavender-Bares, J.; Crandall, K. A.; Graham, C. H.; Johnson, J. B.; Rissler, L.; Victoriano, P. F.; Yoder, A. D. Phylogeography's past, present and future: 10 years after *Avice*, 2000. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 54: 291-301; 2010.

Hugall, A.; Moritz, C.; Moussalli, A.; Stanisic, J. Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail *Gnarosophia bellendenkerensis* (Brazier 1875). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 99: 6112-6117; 2002.

Hudson, R. R. Gene genealogies and the coalescent process. **Oxford Surveys in Evolutionary Biology**, 7: 1-44; 1990.

Huelsenbeck, J. P.; Ronquist, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, 17: 754-755; 2001.

IBGE. Atlas Nacional do Brasil: região Nordeste. **Editora da Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, Rio de Janeiro; 1985.

Jenkins, C. N.; Joppa, L. Expansion of the global terrestrial protected area system. **Biological Conservation**, 142: 1-20; 2009.

Kauserud, H.; Stensrud, O.; Decock, C.; Shalchian-Tabrizi, K.; Schumacher, T. Multiple gene genealogies and AFLPs suggest cryptic speciation and longdistance dispersal in the basidiomycete *Serpula himantioides* (Boletales). **Molecular Ecology**, 15: 421-431; 2006.

Kingman, J. F. C. The coalescent. **Stochastic Process and their Applications**. 13: 235-248; 1982.

Klink, C. A.; Machado, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, 19: 707-713; 2005.

Knowles, L. L.; Maddison, W. P. Statistical phylogeography. **Molecular Ecology**, 11: 2623-2635; 2002.

Knowles, L. L. The burgeoning field of statistical phylogeography. **Journal of Evolutionary Biology**, 17: 1-10; 2004.

Knowles, L. L.; Carstens, B. C. Estimating a geographically explicit model of population divergence. **Evolution**, 61: 477-493; 2007.

Knowles, L. L.; Carstens, B. C.; Keat, M. L. Coupling genetic and ecological-niche models to examine how past population distributions contribute to divergence. **Current biology**, 17: 940-946; 2007.

Knowles, L. L. Why does a method that fails continue to be used? **Evolution**, 62: 2713-2717; 2008.

Knowles, L. L. Statistical phylogeography. **The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, 40: 593-612; 2009.

Kuhner, M. K. Lamarc 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. **Bioinformatics**, 22: 768-770; 2006.

Kuhner, M. Coalescent genealogy samplers: windows into population history. **Trends in Ecology & Evolution**, 24: 86-93; 2008.

Leal, I. R.; Tabarelli, M.; Silva, J. M. C.; Lacher, T. E. Jr. Changing the course of biodiversity conservation in the Caatinga of northeastern Brazil. **Conservation Biology**, 19: 701-706; 2005.

Ledru, M.-P. Late Quaternary environmental and climate changes in Central Brazil. **Quaternary Research**, 39: 90-98; 1993.

Lessa, E. P.; Cook, J. A.; Patton, J. L. Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the late Quaternary. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100: 10331-10334; 2003.

Martínez-Meyer, E.; Peterson, A. T.; Hargrove, W. W. Ecological niches as stable distributional constraints on mammal species, with implications for Pleistocene extinctions and climate change projections for biodiversity. **Global Ecology and Biogeography**, 13: 305-314; 2004.

Martins, F. M.; Templeton, A. M.; Pavan, A. C. O.; Kohlbach, B. C.; Morgante, J. S.; Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): Marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. **BMC Evolutionary Biology**, 9: 294-306; 2009.

Martins, F. M. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? **Biological Journal of the Linnean Society**, 104: 499-509; 2011.

Martins, F. M.; Gifalli-Iughetti, C.; Koiffman, C. P.; Harris, E. E. Coalescent analysis of mtDNA indicates Pleistocene divergence among three species of howler monkey (*Alouatta* spp.) and population subdivision within the Atlantic Coastal Forest species, *A. guariba*. **Primates**, 52: 77-87; 2011.

Mayle, F. E.; Beerling, D. J.; Gosling, W. D.; Bush, M. B. Responses of Amazonian ecosystems to climatic and atmospheric carbon dioxide changes since the last glacial maximum. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 359: 499-514; 2004.

Mayle, F. E.; Langstroth, R. P.; Fisher, R. A.; Meir, P. Long-term dynamics in the Bolivian Amazon: implications for conservation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 362: 291-307; 2007.

Miranda, G. B.; Oliveira, L. F. B.; Andrades-Miranda, J.; Langguth, A.; Callegari-Jacques, S. M.; Mattevi, M. S. Phylogenetic and phylogeographic patterns in sigmodontine rodents of the genus *Oligoryzomys*. **Journal of Heredity**, 100: 309-321; 2009.

Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Brooks, T. M.; Pilgrim, J. D.; Konstant, W. R.; Fonseca, G. A. B.; Kormos, C. Wilderness and Biodiversity Conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100: 10309-10313; 2003.

Moritz, C.; Patton, J. L.; Schneider, C. J.; Smith, T. B. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 31: 533-563; 2000.

Muller, J. Fossil pollen records of extant angiosperms. **The Botanical Review**, 47: 1-146; 1981.

Nascimento, F. F.; Pereira, L. G.; Geise, L.; Bezerra, A. M. R.; D'Andrea, P. S.; Bonvicino, C. R. Colonization process of the Brazilian common vesper mouse, *Calomys expulsus* (Cricetidae, Sigmodontinae): a biogeographic hypothesis. **Journal of Heredity**, 102: 260-268; 2011.

Nei, M. Molecular evolutionary genetics. **Columbia University Press**, New York, 1987.

Novaes, R. M. L.; Lemos-Filho, J. P.; Ribeiro, R. A.; Lovato, M. B. 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; 2010.

Oliveira-Filho, A. T.; Ratter, J. A.. Padrões florísticos das matas ciliares da região dos cerrados e a evolução das paisagens do Brasil Central durante o Quaternário tardio. In: Rodrigues, R. R.; Leitão-Filho, H. F. (eds.) **Matas Ciliares: Bases Multidisciplinares para Estudo, Conservação e Restauração**. EDUSP, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, cap. 5, pp. 73-89; 2000.

Peterson, A.; Martínez-Meyer, E.; González-Salazar, C. Reconstructing the Pleistocene geography of the *Aphelocoma jays* (Corvidae). **Diversity and Distributions**, 10:237-246; 2004.

Posada, D.; Crandall, K. A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. **Trends in Ecology & Evolution**, 16: 37-45; 2001.

Posada, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, 25: 1253-1256; 2008.

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

Prado, D. E. Seasonally dry forests of tropical South America: from forgotten ecosystems to a New phytogeographic unit. **Edinburgh Journal of Botany**, 57: 437-461; 2000.

Prance, G. T.; Silva, M. F. Flora Neotropica Monograph No. 12 Caryocaraceae. **Hafner Publishing Company**, New York; 1973.

Rambaut, A. FigTree v1.3. **disponível em:** <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>; 2009.

Rambaut, A.; Drummond, A. J. Tracer v1.5. **disponível em:** <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>; 2009.

Ramos, A. C. S.; Lemos-Filho, J. P.; Ribeiro, R. A.; Santos, F. R.; Lovato, M. B. 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; 2007.

Ramos, A. C. S.; Lemos-Filho, J. P.; Lovato, M. B. 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; 2009.

Ribeiro, M. C.; Metzger, J. P.; Martensen, A. C.; Ponzoni, F.; Hirota, M. M. Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, 142: 1141-1153; 2009.

Richards, C. L.; Carstens, B. C.; Knowles, L. L. Distribution modeling and statistical phylogeography: an integrative framework for generating and testing alternative biogeographical hypotheses. **Journal of Biogeography**, 34: 1833-1845; 2007.

Rogers, A. R.; Harpending, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, 9: 552-569; 1992.

Rosenberg, N. A.; Nordborg, M. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphism. **Nature Reviews Genetics**, 3: 380-390; 2002.

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

Rull, V. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary–Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. **Molecular Ecology**, 17: 2722-2729; 2008.

Rylands, A. B.; Brandon, K. Brazilian protected areas. **Conservation Biology**, 19: 612-618. 2005.

Sampaio, E. V. S. B. Overview of the Brazilian Caatinga. In: Bullock, S. H.; Mooney, H. A.; Medina, E. (eds) **Seasonally dry tropical forests**. Cambridge University Press, Cambridge; 1995.

Schneider, S.; Excoffier, L. Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates varies among sites. **Genetics**, 152: 1079-1089; 1999.

Schneider, C. J.; Smith, T. B.; Larrison, B.; Moritz, C. A test of alternative models of diversification in tropical rainforests: Ecological gradients vs. rainforest refugia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 96: 13869-13873; 1999.

Slatkin, M.; Hudson, R. R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponential growing populations. **Genetics**, 129: 555-562; 1991.

Silva, J. M. C.; Bates, J. M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna Hotspot. **BioScience**, 52: 225-233; 2002.

Simon, M. F.; Grether, R.; Queiroz, L. P.; Skema, C.; Pennington, R. T.; Hughes, C. E. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106: 20359-20364; 2009.

Tabarelli, M.; Pinto, L. P.; Silva, J. M. C.; Hirota, M.; Bedê, L. Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Biology**, 19: 695-700; 2005.

Tajima, F. Statistical method for testing neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, 123: 585-595; 1989.

Templeton, A. R. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. **Molecular Ecology**, 13: 789-810. 2004

Templeton, A. R. Nested clade analysis: an extensively validated method for strong phylogeographic inference. **Molecular Ecology**, 17: 1877-1880; 2008.

Templeton A. R. Statistical hypothesis testing in intraspecific phylogeography: nested clade phylogeographical analysis vs. approximate Bayesian computation. **Molecular Ecology**, 18: 319-331; 2009a.

Templeton A. R. Why does a method that fails continue to be used? The answer. **Evolution**, 63: 807-802; 2009b.

Templeton A. R. Coalescent-based, maximum likelihood inference in phylogeography. **Molecular Ecology**, 19: 431-435; 2010.

Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, 24: 4876-4882; 1997.

Tuomisto, H. Interpreting the biogeography of South America. **Journal of Biogeography**, 34: 1294-1295; 2007.

Vieira, I. C. G.; Silva, J. M. C.; Toledo, P. M. Estratégias para evitar a perda da biodiversidade na Amazônia. **Estudos Avançados**, 19: 153-164; 2005.

Walser, J. C.; Holderegger, R.; Gugerli, F. Microsatellites reveal regional population differentiation and isolation in *Lobaria pulmonaria*, an epiphytic lichen. **Molecular Ecology**, 14: 457-467; 2005.

Waltari, E.; Hijmans, R. J.; Peterson, A. T.; Nyári, A. S.; Perkins, S. L.; Guralnick, R. P. Locating Pleistocene refugia: comparing phylogeographic and ecological niche model predictions. **PLoS ONE**, 2: e563; 2007.

Watterson, G. A. Lines of descent and the coalescent. **Theoretical Population Biology**, 26: 77-92; 1984.

Willis, K. J.; Niklas, K. J. The role of Quaternary environmental change in plant macroevolution: the exception or the rule? **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 359: 159-172; 2004.

Wolfe, K. H.; Li, W. H.; Sharp, P. M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 84: 9054-9058; 1987.

Yamane, K.; Yano, K.; Kawahara, T. Pattern and rate of indel evolution inferred from whole chloroplast intergenic regions in sugarcane, maize and rice. **DNA Research**, 13: 197-204; 2006.

10. Anexos

Anexo I – Lista de mutações presentes nos haplótipos amostrados

Haplótipos	20	46	53	64	67	68	80	83	86	88	90	92	117	124	128	170	174	187	188	214	226	236	250	256	257	275	282
1	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
2	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
3	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
4	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
5	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
6	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
7	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
8	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
9	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
10	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
11	G	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
12	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
13	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
14	G	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
15	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
16	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
17	G	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	C	-	T	C	-	C
18	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
19	G	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	A	C	G	A	-	-	A	A	T	-	-	T	C	-	C
20	-	C	T	C	C	A	C	C	C	A	G	G	C	C	G	A	G	-	A	A	T	-	-	G	A	-	C
21	-	C	T	C	C	A	C	C	C	A	G	G	C	C	G	A	G	-	A	A	T	-	-	G	A	-	C
22	-	C	T	C	C	A	C	C	C	A	G	G	C	C	G	T	T	-	A	A	T	-	-	G	A	-	C
23	-	C	T	C	C	A	C	C	C	A	G	G	C	C	T	A	G	G	-	A	T	-	-	T	C	-	C
24	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	C	A	T	A	G	G	-	A	T	-	-	T	C	-	C
25	-	T	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	C	C	G	A	-	-	A	A	-	-	-	T	C	-	C
26	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	C	C	G	A	T	-	A	A	T	-	-	G	A	-	A
27	-	C	T	C	C	C	C	C	C	A	G	G	C	C	G	A	T	-	A	A	T	-	-	G	A	-	A
28	-	C	-	A	T	C	-	A	A	T	T	A	C	C	T	A	-	-	A	G	T	-	T	T	C	A	C

Continuação Anexo I

Haplótipos	296	299	301	303	307	308	329	330	332	336	337	338	343	344	349	351	363	365	370	371	372	373	374	375	376
1	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	-
2	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	-
3	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	-
4	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	-
5	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	-
6	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	-
7	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	-
8	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	-
9	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	-
10	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	C	T	T	T	T	T	T	-
11	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	C	T	T	T	T	T	T	-
12	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	C	T	T	T	T	T	T	-
13	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	-
14	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	-
15	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	-
16	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	-
17	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	-
18	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	T
19	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	A	T	A	T	T	T	T	T	T	T
20	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	T	T	A	T	T	T	T	T	T	T
21	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	T	T	A	T	T	T	T	T	T	T
22	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	T	T	A	A	T	T	T	T	T	T
23	G	C	A	C	A	A	-	T	T	G	A	T	T	A	-	T	T	A	T	T	T	-	-	-	-
24	G	C	A	C	A	A	-	T	T	G	A	T	T	A	-	T	T	T	T	A	T	T	T	T	T
25	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	T	T	T	T	T	-	-	-	-	-
26	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	T	T	A	T	-	-	-	-	-	-
27	T	T	T	A	T	G	-	A	T	G	A	T	T	A	-	T	T	A	T	-	-	-	-	-	-
28	T	T	T	A	T	G	A	A	G	A	G	C	C	C	A	G	G	A	T	T	T	T	-	-	-

Continuação Anexo I

Haplótipos	377	391	392	396	412	414	421	444	445	463	475	498	515	530	558	610	612	639	688	692	727	728	744	752	759	767
1	-	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
2	-	A	A	A	-	G	A	T	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
3	-	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
4	-	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	G	-	T	-	C	A	-
5	-	A	A	A	-	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	G	-	T	-	C	A	-
6	-	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
7	-	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	T	G	T	-	T	-	C	A	-
8	-	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	T	G	T	-	T	-	C	A	T
9	-	A	A	A	-	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	T	G	T	-	T	-	C	A	-
10	-	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
11	-	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
12	-	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	T	G	T	-	T	-	C	A	-
13	-	A	A	G	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
14	-	A	A	G	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
15	-	A	A	G	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	T	C	A	-
16	-	A	A	G	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	T
17	-	A	A	G	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
18	-	A	A	G	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
19	-	A	A	G	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
20	-	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
21	T	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
22	T	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
23	-	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
24	T	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
25	-	A	A	A	A	T	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	A	G	T	-	T	-	C	A	-
26	-	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	A	T	-	C	A	-
27	-	A	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	G	G	C	T	G	G	G	T	-	T	-	C	A	-
28	-	G	G	A	A	G	G	C	T	A	C	G	C	C	-	C	A	G	C	T	-	-	-	T	C	-