UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Vania Quibao Pretti

Diversidade Genética em “Caxetais” da Mata Atlântica Brasileira:
uma abordagem filogeográfica para *Tabebuia cassinoides*

São Paulo

2012

Vania Quibao Pretti

Diversidade Genética em “Caxetais” da Mata Atlântica Brasileira:
uma abordagem filogeográfica para *Tabebuia cassinoides*

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências, Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Garcez
Lohmann

Co-Orientador: Prof. Dr. Diogo Meyer

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

Pretti, Vania Quibao

Diversidade Genética em “Caxetais” da Mata Atlântica Brasileira:
uma abordagem filogeográfica para *Tabebuia cassinoides*

2012

84 páginas

Tese de Doutorado – Instituto de Biociências

Universidade de São Paulo – Departamento de Botânica

1.Mata Atlântica 2.Filogeografia 3.*Tabebuia cassinoides*
4.Microsatélites 5.DNA plastidial 6.Modelagem Climática

Comissão Julgadora

Prof.(a) Dr.(a)

Prof.(a) Dr.(a)

Prof.(a) Dr.(a)

Prof.(a) Dr.(a)

Profa. Dra. Lúcia Garcez Lohmann

Orientadora

“Pouco importa o julgamento dos outros.

Os seres são tão contraditórios que é impossível

atender as suas demandas, satisfazê-los.

Tenha em mente simplesmente

ser autêntico e verdadeiro...”

(Dalai Lama)

Dedico essa tese ao meu querido Bê !!!

“É com enorme alegria e sentimento de dever cumprido por ter realizado o melhor possível (e algumas vezes o impossível) diante das condições que se apresentaram durante realização desse doutorado, que escrevo esse trecho tão importante da minha tese.”

Agradecimentos

“Durante esses quatro anos de doutorado foram muitas andanças, muitos quilômetros rodados...seja dirigindo, ou de ônibus, de metrô, de táxi, de barco, de bicicleta, de voadeira, de rabeta, de avião, ou mesmo a pé....fui a tantos lugares, conheci tantas casas, matas, vilas, universidades, hotéis, estradas, cidades, comidas e principalmente pessoas... pessoas especiais que deixaram muito ou pelo menos um pouquinho delas comigo... foram tantas histórias, risadas, infinitas lembranças...Porém isso não entra em nenhum capítulo da Tese, isso eu levo pra vida!!!”

Gostaria de agradecer ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida para realização desse trabalho, e pelo financiamento das viagens de coleta através do apoio concedido ao Laboratório de Sistemática Molecular do IB-USP.

À Fapesp pelo financiamento concedido ao Laboratório de Sistemática Molecular do IB-USP, o qual proporcionou a compra de todos os materiais para a realização da parte experimental desse doutorado.

À CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche para realização de parte desse doutorado na NYU

Ao COSEAS pela vaga na moradia estudantil (CRUSP) durante a maior parte da Pós-Graduação.

Ao Instituto de Biociências da USP e ao Departamento de Botânica pelo apoio logístico.

À Profa. Dra. Lúcia Garcez Lohmann, por aceitar o desenvolvimento desse trabalho em seu laboratório, por sempre trabalhar em busca de financiamentos diversos para o Labinho, sem os quais a realização desse projeto não seria possível, e pela revisão final dessa tese.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Diogo Meyer, por sempre me atender de maneira muito atenciosa ao longo de todos esses anos, me ajudando e discutindo as teorias de genética de populações e evolução de forma simples e esclarecedora.

Ao Dr. Alberto Vicentini do INPA (Prof. Beto) por sua paciência e orientação no início desse doutorado em discutir comigo todos meus projetos absurdos e inviáveis. Embora tenhamos trabalhado somente no início, quando o projeto seria com uma espécie amazônica, seu entusiasmo com a ciência e sua personalidade tão querida estiveram sempre comigo.

À Profa. Dra. Ana Carolina Carnaval, pela forma tão aberta e amável que me recebeu em seu laboratório em Nova Iorque durante a realização do meu estágio sanduíche. A forma como conduz os alunos num ambiente de harmonia e auxílio mútuo é simplesmente fantástica.

Seu entusiasmo e atenção ao discutir os meus dados me forneceram animo novo na reta final desse trabalho.

À Profa. Dra. Maria Magdalena Rossi, sem a qual meu estágio de doutorado sanduíche não teria acontecido. Agradeço a importância e empenho em resolver pessoalmente os problemas burocráticos junto a USP e a CAPES os quais me fariam perder a bolsa.

Ao amigo e orientador PAE, Prof. Dr. Carlos Ribeiro Vilela, por seu exemplo de docência, e seu interesse real com a minha formação durante a realização das monitorias na disciplina de Genética. Nossas divertidas conversas sempre me ensinaram coisas novas e alegraram meus dias na USP. Assim como no mestrado, ao longo de todos esses anos sua presença constante contribuiu de maneira muito significativa e especial na minha formação!!!

Aos queridos professores da disciplina de Genética, Lyria Mori, Denise Selivon, Luis Eduardo Soares Netto e Tatiana Teixeira Torres, por todos os ensinamentos, consideração e amizade durante o desenvolvimento das monitorias PAE.

Aos Prof. Dr. José Rubens Pirani, pela agradável convivência e pela orientação na monitoria PAE.

Ao Prof. Dr. Renato de Mello-Silva por todas as vezes que foi abruptamente interrompido, pela orientação durante a monitoria PAE e principalmente por tornar o prédio da sistemática mais divertido com suas engraçadas regras e peculiaridades, dentre elas a sua inigualável assinatura.

Aos funcionários do depto de Botânica do IB, em especial ao nosso prestativo técnico Abel Ribeiro por me manter sempre cafeínada para trabalhar, as técnicas Viviane Yuri Jono e Roberta Rocha de Figueiredo e à nossa secretária Cristina França pelo empenho com as papeladas da bolsa sanduíche.

Agradeço também aos funcionários da pós – graduação em especial a querida Erika Harumi Takamoto pela forma gentil e personalizada com que me atendeu sempre!!!

Aos nossos porteiros Sr. Luis, Modesto e Washington, pelas divertidas conversas no fim do dia enquanto eu esperava o Helbert na portaria.

Aos amigos da Sistemática Vegetal: Cínthia Luiza da Silva Luz, Juliana El Ottra (Juzinha), Juliana Rando, Juliana Lovo, Suzana Alcantara, Jenifer Lopes, Marcelo Trovó, Leonardo Borges (Caqui), Maurício Watanabe (Bahia), Livia Echternacht Andrade, Mariana Wagner, Leandro Assis, Matheus Santos (Bozo), Pedro Fiaschi, Maria Fernanda Calió, Gustavo Heiden, Marcelo Devecchi, Paulo Baleeiro e Paulo Gonella, pela divertida convivência. Agradeço especialmente ao Benoît Francis Patrice Loeuille por sua ajuda nas primeiras extrações de DNA de plantas.

Aos “alunos da Lúcia”: Luiz Henrique Foncesca, pela ajuda, amizade e divertida companhia nas viagens de coleta, e no Labinho (obrigada por me ajudar a encher as infundáveis caixinhas de ponteiros!!!). À Mariane Sousa-Baena, por me ajudar durante os trâmites da bolsa sanduíche, por nossas conversas e risadas sobre o IB, o doutorado, o CRUSP... À querida Fabiana Firetti, por sua amizade e generosidade, por todos os cafés depois do almoço...e por dividir comigo as angústias do doutorado. À Maria Cláudia Medeiros

pela amizade por nossos almoços conversas e lanchinhos à tarde. À Dayane Tarabay pela amizade e ajuda com o banco de dados para modelagem. Aos queridos Mario Henrique Terra Araújo do Inpa e Daniela Sampaio do Mackenzie, pela amizade que fizemos em tão pouco tempo quando estiveram no Labinho.

Aos amigos do grupo de discussão e socorro mutuo da disciplina de microssatélites 2010, especialmente ao monitor Danilo Augusto Sforça, e as professoras. Maria Imaculada Zucchi e Anete Pereira de Souza.

Aos amigos da Universidade de Nova Iorque (NYU), Eric Waltari, Zoe Spanos, Hina Chaudry, Barbara Rizzo, Maria Amin, Maria Strangas, Danielle Rivera, Millicent Cheu e em especial aos brasileiros Ivan Prates e Ivandy Castor-Astor, obrigada por me receberem de forma tão aberta e amiga.

A todos que gentilmente me hospedaram: Akama e Bia, Prof. Beto e Cinthia, Mike e Marijane, Helena, Suzana, He-man e Elaine. Obrigada a todos pela acolhida quando estava a muitos quilômetros de casa. Especialmente agradeço a duas pessoas iluminadas por me acolherem em NY quando inesperadamente virei “homeless”, Bareena Silverman da NYU, pela divertidíssima hospedagem de duas semanas em seu apartamento e Diana Murray, por abrir sua linda casa em NY para mim e para o Helbert sem nunca ter nos visto antes e nos receber como velhos amigos.

Aos mateiros profissionais, Kleuto (Rapidóla), Sr. Manoel, Sr. Edson, e aos amadores Alexandre Zuntini (He-man), Antonio Vicente (meu pai) e Valmir Augusto (motorista do IB), por todo cuidado que tiveram comigo durante a realização das minhas coletas nos mais diferentes locais desse Brasil.

Aos dirigentes da Reserva da Vale em Linhares-ES, pela permissão de coleta, e em especial ao Geovane de Souza Siqueira pela forma atenciosa e dedicada que nos acompanhou durante todo o trabalho em Linhares.

Aos diretores da ReBio Poço das Antas, pela permissão de coleta antecipada.

“A realização desse doutorado foi algo realmente desafiador diante dos inúmeros problemas inesperados que ocorreram no projeto inicial os quais me fizeram trocar de projeto após um ano e meio de ingresso. Além disso, após a mudança de projeto ocorreram mais problemas de laboratório que me fizeram trabalhar por 5 meses sem absolutamente nenhum resultado...Diante disso gostaria de agradecer então aos meus leais amigos (alguns até se tornaram co-autores), que acompanharam tudo isso de perto... e me ajudaram da melhor forma, para tornar esse trabalho possível!!!”

Como não poderia deixar de ser agradeço a inestimável ajuda do amigo Alexandre Rizzo Zuntini (He-man), que atuou inúmeras vezes como meu mateiro, motorista, fotógrafo, técnico de computador, *design* gráfico, corretor de textos e nos últimos dias da tese, virou plantonista para minhas emergências em tempo integral!!! Co-autor e parceiro fiel de 80% das enrascadas desse doutorado, ele se atolou na lama, dirigiu quase 3.000km, sofreu com

insolação e doenças tropicais, até mesmo “bullying” em postos de gasolina e ainda assim inexplicavelmente continuou meu amigo... Valeu Rima!!!

À amiga Ana Cristina Bondioli, por sempre estar presente quando mais precisei, por toda sua ajuda com as análises por “Skype” quando estive em NY, pela segurança que me passou em todos os momentos de angústia do doutorado quando tudo decidia não funcionar... Amiga você foi fundamental!!!

Ao amigo e co-autor Dr. Fábio Pinheiro, que participou desde a minha insegurança inicial em fazer um doutorado na Botânica, até as discussões finais dessa tese, sempre me socorrendo e orientando em todas as etapas do trabalho! Agradeço os inúmeros artigos que me enviou nas diferentes fases da tese, todos os “primers” que me passou para testar, todas as vezes que atenciosamente me recebeu no Jardim Botânico, que me acalmou quando a biblioteca de microssatélites não funcionava, e que tirou minhas dúvidas por telefone, Skype ou e-mail.

À querida Profa. Dra. Maria Cristina Arias, por gentilmente me permitir usar a infraestrutura do seu laboratório sempre que precisei, e aos amigos das Abelhas (LGEA-USP). Agradeço especialmente a querida amiga e co-autora Elaine Françoso, por sua grandíssima ajuda com a biblioteca de microssatélites, trabalhando comigo vários finais de semana no laboratório até tudo funcionar, e ao Flávio Oliveira Francisco (Sem Vida), por compartilhar seus protocolos de bancada, me ajudar com o uso dos programas de análises mesmo por “Skype” quando estávamos no sanduíche com 14 fusos horários de diferença!!!

À querida Profa. Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo, e aos meus queridos amigos dos Peixes- LIUSP, Carlos Eduardo Lopes, Felipe Claro Lourenço e Marilena Peixoto, que durante esse doutorado foram meus primos ricos. Por sempre deixarem as portas abertas, por me emprestarem bancadas, pipetas, UV, centrifuga refrigerada, raques, scanner etc.... agradeço por nossa grande amizade e todo carinho com que me recebiam sempre!!! À querida Dra. Daniela Calcagnotto por sempre me orientar com os problemas de bancada e muitos outros, mesmo não sendo mais minha “Chefe” sempre pude contar com sua ajuda. À amiga Riviane Garcez, por compartilhar comigo as incertezas do doutorado, pela ajuda com as análises e por passarmos juntas e com muito bom humor pela saga da construção da biblioteca de microssatélites...vai pra Unicamp...volta...vai...volta...clona...genotipa... nada funciona... começa outra vez....mais outra...enfim...Vencemos!!! Aos amigos da velha guarda do LIUSP Soraia, Sabrina, Cinthia, Ricardo, nossa agregada Martinha e aos novos integrantes Rodrigo, Juliana e Carol por sempre me proporcionarem bons momentos entre amigos!!!

Aqui agradeço também à Dra. Kelly Nunes por sua atenciosa ajuda com as análises de Bottleneck.

“Porém todos os desafios e obstáculos que precisei superar para realização desse trabalho se torvam pequenos ao pensar o quanto preciso agradecer a vida por fazer parte de uma família tão especial!!!”

Agradeço à minha avó Maria Margarida, professora de grupo escolar, que soube mostrar a todos os seus filhos e netos o valor da educação. Lembro-me com hoje, da sua preocupação em conseguir uma vaga para mim na 1ª série com a melhor professora de alfabetização da cidade. Sua lembrança sempre fez estudar com dedicação ao longo de toda a minha vida!!!

À minha irmã Vivian, pelo carinho ao preparar quase todo meu casamento enquanto eu fazia disciplinas e coletas em ritmo acelerado que não me permitiam voltar para casa. Aos meus irmãos Vinicius e Vitor, aos meus cunhados Aline e Habib, e a minha querida sobrinha Maria Luiza (Ximbica) por sempre lembrar a tia Vaninha que existiam outras coisas para fazer além do doutorado.

À minha mãe Maria Ermínia por me ensinar que devemos sempre ver a vida e principalmente as pessoas com o coração aberto, pois todo mundo pode errar, e ao meu pai Antonio Vicente por me ensinar a ser perseverante sempre!!!! Agradeço por me ensinarem juntos a importância de ser verdadeira com as pessoas, e com aquilo que acredito. Nunca usei tanto esses ensinamentos como nessa fase da minha vida. Obrigada pelo apoio principalmente na reta final, e por compreenderem minha ausência durante esses quase cinco anos. Espero corresponder à altura tudo o que fazem por mim!!!

Agradeço ao meu querido Bê (Helbert Medeiros Prado), pelo amor, paciência e todo cuidado que sempre teve comigo ao passarmos juntos e ao mesmo tempo pela experiência de dois doutorados!!!! Provas de ingresso, o CRUSP, minhas coletas, saudades, a construção da casa, nossas coletas, disciplinas em outras cidades, saudades, o casamento, mais coletas suas, a mudança, os dois em sanduíche, saudades, e a reta final de escrever as teses!!!! Sua grandeza de espírito e serenidade foram o meu porto seguro nesse turbilhão.

Sumário

Apresentação.....	01
Resumo.....	02
Abstract.....	04
Introdução.....	06
Mata Atlântica.....	06
Florestas Paludosas Litoraneas: “caxetais”.....	07
A espécie <i>Tabebuia cassinoides</i>.....	08
Estrutura Genética de Populações.....	10
Filogeografia.....	13
Marcadores Moleculares.....	15
<i>Microsatélites.....</i>	<i>15</i>
<i>Marcadores de Cloroplasto.....</i>	<i>17</i>
Modelagem de Nicho Ecológico (MNE).....	17
Objetivo Central da Tese.....	18
Bibliografia.....	19
Capítulo 1: Microsatellite Loci For <i>Tabebuia cassinoides</i> (Bignoniaceae).....	28
Abstract.....	28
Introduction.....	29
Material and Methods.....	30
Results.....	31
Conclusions.....	32
Tables.....	33
References.....	35
Capítulo 2: Genetic diversity in natural populations of <i>Tabebuia cassinoides</i> (Bignoniaceae): case study on genetic differentiation between “caxetais” in municipalities of Iguape (SP) and Ilha Comprida (SP).....	37
Abstract.....	37

Introduction.....	38
Material and Methods.....	39
Results.....	41
Discussion.....	42
Conclusions.....	43
Tables.....	44
Figures.....	45
References.....	46
Capítulo 3: Genetic structure and diversity of the “caxetais” from the Brazilian Atlantic Forest in the light of past environmental changes.....	49
Abstract.....	49
Introduction.....	50
Material and Methods.....	53
Results.....	56
Discussion.....	58
Tables.....	62
Figures.....	65
References.....	68
Conclusões e Considerações Finais.....	75
References.....	80
Suplementos.....	82
Bibliografia.....	84

APRESENTAÇÃO

A presente tese tem como objetivo conhecer as características genéticas populacionais e os padrões filogeográficos da espécie *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC. ao longo de toda sua área de distribuição na Mata Atlântica. Esse trabalho está dividido em cinco partes, três das quais são capítulos escritos em formato de artigos para publicação, enquanto as duas outras partes representam uma introdução e uma conclusão geral, respectivamente. Os três capítulos da tese são os seguintes:

- (1)**Microsatellite loci for *Tabebuia cassinoides* (Bignoniaceae)**, o qual descreve a construção de uma biblioteca específica de microssatélites para a espécie estudada;
- (2)**Genetic diversity in natural populations of *Tabebuia cassinoides* (Bignoniaceae): case study on genetic differentiation between “caxetais” in the municipalities of Iguape (SP) and Ilha Comprida (SP)**, o qual avalia aspectos da diferenciação populacional em uma escala local, buscando compreender os efeitos da distribuição agregada e naturalmente fragmentada para o fluxo gênico da espécie;
- (3)**Genetic structure and diversity of the “caxetais” from the Brazilian Atlantic Forest in the light of past environmental changes**, o qual busca compreender a história filogeográfica da espécie *Tabebuia cassinoides* frente as oscilações climáticas ocorridas na Floresta Atlântica durante o período Quaternário, utilizando simulações de modelagem climática pretérita, associada aos resultados de estruturação genética populacional e alterações demográficas.

Diversidade Genética em “Caxetais” da Mata Atlântica Brasileira: uma abordagem filogeográfica para *Tabebuia cassinoides*

Resumo

A Mata Atlântica representa um dos Biomas mais diversos do Planeta. No entanto, ainda pouco se sabe sobre os processos que levaram à alta diversidade de plantas nesta região. A maior parte dos estudos na Mata Atlântica trata este Bioma de forma ampla, sem considerar os diversos tipos vegetacionais encontrados na região. Apesar de ser dominado pela Floresta Pluvial Montana, este Bioma ainda inclui outros tipos vegetacionais periféricos, tais como: as Florestas Pluviais Baixo Montanas, Florestas Pluviais de Altitude, Florestas Pluviais Ripária, Florestas Pluviais em Manchas e as Florestas Paludosas Litorâneas, popularmente conhecidas como “caxetais”. O nome “caxetal” foi dado devido à predominância da espécie *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC., a qual é popularmente conhecida como “caxeta”. Esta formação vegetal tem distribuição restrita a áreas com solos permanentemente encharcados do norte de Santa Catarina até o norte do Espírito Santo, onde ocorre de forma naturalmente fragmentada, formando ilhas ao longo de sua extensão de ocorrência. Populações com distribuição fragmentada são modelos em potencial para estudos de genética de populações, visto que a delimitação geográfica de populações naturais é um dos maiores problemas para estudos dessa natureza. Diante desse cenário, a presente tese teve como objetivo: (1) verificar como a distribuição geográfica da espécie arbórea *T. cassinoides*, agregada, bem delimitada e fragmentada na paisagem, pode influenciar na estruturação da diversidade genética em nível local; (2) caracterizar o grau de variabilidade genética inter e intra-populacional em populações naturais de *T. cassinoides* ao longo da Mata Atlântica; e, (3) determinar a estrutura filogeográfica de *T. cassinoides*.

Para tanto foram analisados dados de oito marcadores de microssatélites nucleares, além do sequenciamento da região trnC-ycf6 do DNA plastidial (cpDNA). Os dados genéticos obtidos foram primeiramente utilizados para o conhecimento da diversidade genética e estruturação da população em nível local, na região de Iguape (SP). Nossos resultados sugerem que a fragmentação dessas populações é somente geográfica, devido a suas necessidades edáficas, bem como que o modo de distribuição agregada e naturalmente fragmentada não indica a subdivisão genética das mesmas.

A caracterização da variabilidade genética inter e intra-populacional em populações naturais de *T. cassinoides* ao longo de toda sua área de distribuição, com base nos marcadores de microssatélites nucleares indicou que a espécie possui

baixos níveis de diversidade genética, e que 61% dessa diversidade é encontrada dentro das populações e 39% entre elas. Além disso, estes resultados evidenciaram significativos níveis de correlação entre distância genética e distância geográfica, sugerindo assim a presença de isolamento por distância. Nossos resultados indicam ainda a região geográfica do Rio de Janeiro como centro de diversidade para *T. cassinoides*. Uma forte estruturação genética foi encontrada para os dados de DNA nuclear e plastidial. Os resultados da análise de cpDNA, sugerem que a espécie *T. cassinoides* está dividida em três grupos filogeográficos: Norte, Central e Sul. Já os resultados de DNA nuclear apenas se diferenciam dos anteriores por considerar os grupos filogeográficos Norte e Central como um único grupo. Dados de modelagem de nicho ecológico foram gerados e associados com análises demográficas e de estruturação populacional visando um melhor entendimento dos padrões filogeográficos da espécie e inferências sobre a ocorrência de possíveis alterações populacionais ocorridas nos últimos 21 mil anos (Last Glacial Maximum – LGM) e 6 mil anos (Holocene Optimum – HO).

Os resultados destas análises sugerem a estabilidade do tamanho populacional e das possíveis áreas de ocorrência de *T. cassinoides* no LGM e no HO. Assim, aventamos a hipótese de que a quebra de fluxo gênico entre as regiões filogeográficas propostas no presente estudo sejam anteriores ao LGM. Esse padrão converge com resultados encontrados para outras espécies de comunidades vegetais periféricas e diverge daqueles encontrados para espécies do núcleo principal da Floresta Ombrófila Densa, evidenciando a importância de estudos com espécies de diferentes comunidades vegetais da Floresta Atlântica para um melhor entendimento dos processos que moldaram a evolução das espécies nesse complexo bioma.

Genetic Diversity in “Caxetais” in Brazilian Atlantic Forest: a phylogeographical approach to *Tabebuia cassinoides*

Abstract

The Atlantic Forest is one of the most biodiverse biomes on the planet. Nevertheless, little is known about the processes that have engendered such highly diverse plantlife in this region. Most studies on the Atlantic Forest approach the biome from an ample scope, without considering the various vegetational types that are found therein. Though broadly termed Montane Rain Forest, this biome also contains other peripheral forms of vegetation, such as Submontane Rain Forest, Cloud Forest, Riparian Rainforest, Rainforest Patches and Coastal Swamp Forest, commonly known as “caxetais” (*plur*). The term “caxetal” (*sing*) derives from the overwhelming predominance of *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC., the “caxeta”. This naturally fragmented vegetational formation is found in patches on permanently waterlogged soils all the way from the north of Santa Catarina state up to northern most Espírito Santo. Populations with fragmented distribution are potential models for populational genetics studies, seen as the geographical delimitation of natural populations is one of the biggest problems facing research of this kind. In the light of this, the present thesis aims to: (1) verify how the aggregated, well-delimited and fragmented geographical distribution of the tree species *T. cassinoides* might influence the structuring of genetic diversity on a local level; (2) ascertain the degree of inter and intra-populational genetic variability in natural *T. cassinoides* populations throughout the Atlantic Forest, and (3) determine the phylogeographical structure of *T. cassinoides*.

In order to achieve this we analyzed data for eight nuclear microsatellite markers and sequencing for the trnC-ycf6 region of plastidial DNA (cpDNA). The genetic data obtained was first used to generate knowledge concerning genetic diversity and populational structuring on a local level, in the Iguape (São Paulo state) region. Our results suggest that the fragmentation of these populations is geographical only, due to their edaphic needs, and that this locally aggregated and naturally fragmented mode of distribution does not indicate genetic subdivision.

The characterization of inter and intra-populational genetic variability for *T. cassinoides* throughout its range of distribution, based on nuclear microsatellite markers, showed that the species has low levels of genetic diversity and that 61% of this diversity is encountered within, and 39% among, the populations. Furthermore, the results evince high and significant levels of correlation between genetic and geographic distance, thus suggesting that this isolation is distance-related. Our findings also indicate that the geographical region of Rio de Janeiro is the center of *T. cassinoides*

diversity. Considerable genetic structuring was identified from the nuclear and plastidial DNA, though with partial distinctions. Results for cpDNA analysis suggest that *T. cassinoides* is divided into three phylogeographical groups: North, Central and South. Nuclear DNA analysis, however, took the Central and North phylogeographical groups to be one and the same. Ecological niche modeling data were generated and associated with demographic analyses and findings on populational structuring so that we could determine the species' phylogeographical patterns and infer the occurrence of possible populational alterations during two distinct periods: 21 thousand years ago (the Last Glacial Minimum) and over the last 6 thousand years (Holocene Optimum – HO).

The results of these analyses suggest that population sizes remained stable in possible areas of occurrence during the LGM and HO. Based on these findings we suggest the hypotheses that the stemming of gene flow among the phylogeographical regions proposed by this study predates the LGM. This pattern converges with results found for other species of peripheral vegetal communities but diverges from those for species from the Dense Coastal Hydrophilic Forest nucleus. As such, our research underscores the importance of further studies with different vegetal communities that comprise the Atlantic Forest in order to foster a better understanding of the processes that shaped the evolution of species in this complex biome.

INTRODUÇÃO

Mata Atlântica

A Floresta Atlântica Brasileira ocorre em uma ampla extensão geográfica, abrange diferentes condições climáticas e topográficas que se apresentam ao longo de sua extensão, e é caracterizada por níveis elevados de diversidade e endemismo (Rizzini 1979; Metzger 2009). A sua composição vegetal é dominada pela Floresta Pluvial Montana, porém o Bioma Mata Atlântica ainda inclui outros tipos vegetacionais, tais como Florestas Pluviais Baixo Montanas, Florestas Pluviais de Altitude, Florestas Pluviais Ripária, Florestas Pluviais em Manchas e Florestas Paludosas Litorâneas (Rizzini 1979). Este Bioma pode também ser considerado como um mosaico de vegetação composto pelo núcleo principal da Floresta Atlântica, e por comunidades vegetais periféricas como as restingas, as florestas de altitude e as florestas alagadas (Scarano 2002). Porém, ainda não existe um conhecimento detalhado sobre a complexa heterogeneidade ambiental encontrada na Floresta Atlântica (Stehamann et al. 2009).

Originalmente, a Mata Atlântica ocupava uma área correspondente a cerca de 150 milhões de hectares (ha), porém hoje encontra-se representada por uma pequena fração de sua cobertura original (Ribeiro et al. 2009). Os altos índices de biodiversidade encontrados na Mata Atlântica e a sua situação atual de perda e fragmentação do habitat, tornam seus remanescentes áreas críticas para a preservação da biodiversidade global (Myers et al. 2000; Aidar et al. 2001; Ribeiro et al. 2009).

Os remanescentes florestais de Mata Atlântica podem ser estimados em 7-8% (SOS Mata Atlântica/INPE 1993, 2000), 10,6% (SOS Mata Atlântica/INPE 2008), 11.4-16% (Ribeiro et al. 2009), e 27% (IESB et al. 2007) variando com os critérios de inclusão adotados na classificação da vegetação. Atualmente, a Mata Atlântica se distribui por 245.173 fragmentos, dos quais 97% correspondem a fragmentos menores

que 250ha e 83% dos quais (240.469 fragmentos) são menores que 50ha (Ribeiro et al. 2009). O sul e sudeste do Brasil abrigam as maiores áreas contínuas dessa vegetação, sendo que o maior fragmento existente corresponde a 7% da área atual de Mata Atlântica, e ocorre principalmente ao longo da Serra do Mar paulista, abrangendo uma área de 1.109.546ha (Ribeiro et al. 2009).

Florestas Paludosas Litorâneas: “caxetais”

Conforme já mencionado, as Florestas Paludosas Litorâneas são parte do Bioma Mata Atlântica. Essas florestas possuem baixa diversidade biológica e são também chamadas de “caxetais”, devido à predominância da espécie *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC., popularmente conhecida como “caxeta”. Os “caxetais” se distribuem do Paraná até o norte do Espírito Santo, apresentando distribuição restrita a áreas com solos encharcados (Figura 1 A e B). Por essa razão, sua distribuição torna-se naturalmente fragmentada, formando ilhas ao longo da extensão de sua ocorrência (Gentry 1992)

Os “caxetais” são considerados um dos sistemas florestais menos estudados dentre as vegetações de ocorrência na planície costeira (Rizzini 1979). Até o momento, estudos sobre os “caxetais” focaram em aspectos florísticos, estruturais e fitossociológicos (Ziller 1992; Silva et al. 1994; Assis 1999), sucessionais (Ziller 1992), no potencial germinativo (Kolb 1998), e de exploração e comercialização de sua madeira (Diegues 1991). Além disso, medidas de diversidade genética, utilizando isoenzimas, foram realizadas na região de Iguape com o intuito de averiguar os efeitos da exploração comercial sobre a diversidade genética de suas populações (Cavallari-Neto 2004). Este mesmo estudo indicou que os “caxetais” explorados comercialmente tiveram perda significativa de sua variabilidade genética quando comparados com “caxetais” não explorados. No entanto, nenhum estudo focou no conhecimento da estrutura populacional e fluxo gênico de *T. cassinoides* ao longo de toda sua

distribuição na da Mata Atlântica. Dados de variabilidade genética e estruturação populacional são de grande importância para o conhecimento filogeográfico da espécie e também para uma possível implementação de planos de manejo adequados para as populações naturais remanescentes de *T. cassinoides* (Cavallari-Neto 2004).

Figura 1- A e B: Tipo de solo onde ocorre a formação dos “caxetais”.

A espécie *Tabebuia cassinoides*

Tabebuia cassinoides (Bignoniaceae), popularmente conhecida como “caxeta”, é uma planta endêmica da Mata Atlântica brasileira (Gentry 1992; Lorenzi, 1998). A espécie possui hábito arbóreo, com altura entre 3-20m e DAP variando de 10 a 30cm, podendo chegar a até 100cm. O tronco é irregular, com ramificação simpodial, e pequeno fuste variando de 5-7m de comprimento, apresentando uma madeira clara e leve (Figuras 2A e B). Possui folhas simples, lanceoladas, coriáceas, glabras, com largura variando entre 4-8cm e comprimento entre 10-20cm. A filotaxia é oposta, compondo uma copa pouco volumosa. Suas flores hermafroditas possuem coloração

Figura 2. A-D: Coloração da madeira de *Tabebuia cassinoides*, B: Flores de *Tabebuia cassinoides*, C: Tronco de *Tabebuia cassinoides* com rebrotas, E: Fruto maduro de *Tabebuia cassinoides*, F: Detalhe da semente alada, G-H: Brotamentos de rizoma em *Tabebuia cassinoides*. Fotos A, B, C, E, F e G por V. Pretti. Fotos D e H por A. Zuntini.

que varia de brancas a amareladas, com presença de estrias roxas (Figura 2B). Seus frutos são do tipo siliqua, estriados, variando de 13-20cm de comprimento, com numerosas sementes aladas (Figuras 2E e F). Sua dispersão se dá por anemocoria e hidrocoria (Gentry 1992; Carvalho 1994; Lorenzi 1998; Sampaio et al. 2010; Pretti, obs. pessoal). A espécie possui características reprodutivas interessantes, como a grande produção de rebrotas em seu caule após o corte do mesmo (Figura 2C), e também a presença de reprodução assexuada através de rizomas, que produzem novos brotos (Figura 2G-H) (Carvalho 1994; Pretti, obs. pessoal).

Estrutura Genética de Populações

Conhecer e caracterizar a estrutura genética de populações naturais de diferentes espécies é fundamental para entendermos como a diversidade genética se distribui geograficamente, e como as alterações ambientais naturais ou antrópicas podem influenciar a evolução das linhagens (Collevatti 2000; Palma-Silva 2009; Pinheiro 2011; Collevatti et al. 2012). Além disso, um melhor entendimento de como indivíduos de espécies tropicais se perpetuam espacial e temporalmente em populações naturais é essencial para a conservação genética das espécies (Kageyama e Gandara 1994).

Estudos de genética de populações focam na variação de alelos dentro e entre populações e nas forças evolutivas responsáveis por moldar os padrões de variação genética encontrados na natureza (Pierce 2004). A variação genética dentro e entre populações representa a base de todo o processo evolutivo, com a amplitude de variação genética intrapopulacional afetando o potencial adaptativo das populações às mudanças ambientais (Pierce 2004). Para que possamos determinar os processos evolutivos que moldaram os padrões atuais de variação genética, é preciso quantificar os tipos e frequências de genótipos e alelos das populações pertencentes a uma mesma espécie (Pierce 2004). Infelizmente, no entanto, a maior parte das espécies

apresenta populações naturais agrupadas em subpopulações menores, que nem sempre estão claramente delimitadas (Diniz-Filho et al. 2008; Hartl e Clark 2010).

Além disso, estas populações são dinâmicas no tempo e no espaço, sofrendo alterações de tamanho, densidade, e localização, podendo passar por processos de fusão e fragmentação (Hey e Machado 2003).

Diversos modelos foram propostos para verificar o grau de estruturação existente em populações subdivididas, por exemplo: (1) o modelo de “estruturação em ilhas”, onde todas as subpopulações apresentam tamanho igual, e podem trocar migrantes em todas as direções com igual probabilidade e frequência (Wright 1943); (2) o modelo “stepping-stone” onde ocorre a migração entre as subpopulações imediatamente mais próximas (Kimura e Weiss 1964); e, (3) o modelo de “metapopulações”, que inclui eventos de surgimento e extinção de subpopulações (Slatkin 1977).

A forma como as populações naturais encontram-se distribuídas influencia diretamente o fluxo gênico entre elas, o qual exerce importante influência na caracterização da estrutura populacional das espécies, pois determina até onde cada população local pode ser considerada como uma unidade evolutiva independente (Slatkin 1993). Em particular, a direção e grau do fluxo gênico entre populações representam forças importantes para a manutenção e/ou homogeneização de diferenças genéticas (Slatkin 1987). Quando o fluxo gênico é intenso, populações tendem a evoluir de maneira conjunta, uma vez que fatores como migração e polinização cruzada atuam na homogeneização das frequências alélicas. Por outro lado, quando o fluxo gênico é restrito ou ausente, as populações tendem a evoluir de modo independente e a acumular diferenças devido ao surgimento de mutações e da ação da deriva genética. Cinco fatores principais influenciam o grau de fluxo gênico: (1) barreiras físicas ou ecológicas; (2) a história de vida do organismo; (3) padrões de

dispersão; (4) eventos demográficos (rompendo o equilíbrio entre fluxo gênico e deriva genética); e, (5) distância geográfica entre subpopulações (Avise 1994).

Os padrões de estruturação genética de uma espécie podem ser diferentes para diferentes genomas comparados (genoma nuclear ou de organelas como mitocôndrias e em plantas também o cloroplasto), devido ao tipo de herança apresentada por cada um deles. Em geral o genoma nuclear possui herança biparental e o genoma de organelas na maioria das espécies possui herança materna. Embora na maioria das Angiospermas o genoma de cloroplasto tenha herança materna, muitas exceções são documentadas com espécies possuindo herança paternal e mista (Schaal et al. 1998; Lorenz-Lemke et al. 2005).

A estrutura genética do genoma nuclear pode ser causada por padrões do fluxo gênico atual, seleção diferencial entre partes, deriva genética e sistema de cruzamento que determina a endogamia (Wright 1931, 1943). Entretanto, a estrutura genética do genoma de organelas herdadas maternalmente é mais influenciada por relações históricas e fluxo gênico antigo entre populações (Avise et al. 1987; Avise 1994; Schaal et al. 1998). Devido a sua natureza haplotípica e seu modo de herança uniparental, o tamanho efetivo populacional pode ser reduzido à metade com a utilização do genoma de organelas em comparação com o tamanho efetivo populacional do genoma nuclear, aumentando assim os efeitos da deriva genética sob os genomas de organelas (Birky et al. 1983). Para estudos de genética populacional em plantas, análises mistas do genoma nuclear e do genoma de cloroplasto com seus diferentes modelos de herança, são muito importantes para um melhor entendimento de suas histórias evolutivas, provendo informações sobre a relativa importância do fluxo gênico ocorrido via dispersão de pólen ou sementes (McCauley 1995; Schall et al. 1998; Collevatti 2000; Collevatti et al. 2012; Tuchetto-Zolet et al. 2012). Esses padrões de dispersão são influenciados por variações espaciais e temporais nos sistemas de cruzamento de forma que o reconhecimento do fluxo gênico em plantas é

um processo de dois passos muito importante para o entendimento da estruturação genética em populações vegetais (Hamrick 1987; Hamrick e Godt 1990 apud Schaal et al. 1998; Levin 1981). Por exemplo, variações em autopolinização e polinização cruzada podem depender de variações geográficas ou sazonais na distribuição dos polinizadores, levando a diferentes padrões de trocas genéticas entre populações dentro de espécies sobre o tempo. Sendo assim, os padrões de trocas genéticas em algumas plantas são influenciados por uma complexa interação do sistema de cruzamento e padrões de dispersão (Schaal et al. 1998).

Filogeografia

A filogeografia busca o conhecimento das relações entre as populações de uma espécie através de dados históricos que possibilitam um melhor entendimento dos padrões de fluxo gênico, colonização, expansão e distribuição da variação genética atual associados a um contexto geográfico (Avice 2000). A filogeografia teve início em trabalhos com animais devido a ausência de marcadores moleculares com variação genética adequada para suas análises em plantas, uma vez que as inferências filogeográficas são feitas a partir da distribuição da variação genética entre populações (Schall et al. 1998).

Estudos filogeográficos ainda são escassos para a Mata Atlântica (Grazziotin et al. 2006; Tchaicka et al. 2007; Cabanne et al. 2007, 2008, Carnaval e Moritz 2008; Carnaval et al. 2009, Thomé et al. 2010, Amaro et al. 2012), e particularmente escassos para plantas, considerando o alto número de espécies botânicas estimadas para esse bioma (Lira et al. 2003; Lorenz-Lemke et al. 2005; Andrade et al. 2007; Palma-Silva et al. 2009, Pinheiro et al. 2011). Apesar dessa limitação na literatura científica sobre o tema, a complexidade da história evolutiva das espécies da Mata Atlântica vem sendo evidenciada por estudos filogeográficos recentes, os quais também têm identificado movimentos de retração e expansão da Floresta Atlântica

desde o Último Máximo Glacial (Cabanne et al. 2007, 2008; Carnaval e Moritz 2008; Carnaval et al. 2009; Palma-Silva et al. 2009; Thomé et al. 2010; Pinheiro et al. 2011; Amaro et al. 2012)

A maioria dos estudos sobre filogeografia de espécies da Mata Atlântica sugere que as mudanças climáticas ocorridas durante o período Quaternário teriam afetado diretamente a estruturação populacional das espécies dessa região, em especial devido à formação de refúgios durante os períodos glaciais. A teoria dos refúgios sustenta que linhagens biológicas teriam se diversificado por alopatria em regiões florestais isoladas, devido à retração das florestas durante os períodos glaciais. Nesse sentido, as forças evolutivas que atuariam na diversificação entre os refúgios seriam a deriva genética e a seleção disruptiva (Haffer 1969; Vanzolini e Williams 1970; Brown e Ab'Saber 1979; Moritz et al. 2000).

Dez diferentes modelos principais de refúgios glaciais-interglaciais são discutidos na literatura (Figura 3), evidenciando o comportamento particular de cada táxon frente as oscilações climáticas ocorridas no passado (Bennett e Provan 2008). Além disso, até mesmo diferentes populações de uma mesma espécie podem se comportar de maneira distinta em face às mudanças históricas no ambiente (Bennett e Provan 2008). Em síntese, as diferentes formações vegetais que compõem o Bioma Mata Atlântica, a riqueza de espécies nele presente, e as diferentes variações propostas para modelos de refúgios glaciais-interglaciais, sugerem o grau de complexidade da história filogeográfica dessa região.

Figura 3- Digrama ilustrando a resposta das espécies para as mudanças climáticas glaciais-interglaciais, em termos de distribuição e abundância. A: Refúgio Clássico. B: Refúgio Críptico, azul claro corresponde a glacial com baixa abundância, não necessariamente contínua. C e D: Mudança Altitudinal, roxo corresponde a contínuo. E: Refúgio Tropical. F: Refúgio Interglacial. G: Expansão “stepwise” através de sucessivas oscilações glaciais-interglaciais. H: Estase com populações separadas. I: Duas populações disjuntas separadas por evento de vicariância, cada uma delas se expandindo após o último máximo glacial. J: Especiação de uma espécie após o Último Máximo Glacial (em azul), em múltiplas espécies (outras cores) (Modificado de Bennett e Provan 2008).

Marcadores Moleculares

Microsatélites

Em decorrência da ausência de marcadores moleculares específicos capazes de detectar a variação genética dos vegetais em níveis intraespecíficos, os estudos filogeográficos em plantas ocorreram mais tardiamente que aqueles voltados aos animais (Schaal et al. 1998).

Entretanto, a técnica de microsatélites têm se tornado cada mais acessível, possibilitado a verificação de variabilidade genética entre e dentro de populações, contribuindo para o avanço de estudos filogeográficos em plantas (Palma-Silva et al. 2009; Pinheiro et al. 2011, Collevatti et al. 2012). Esta técnica é atualmente a mais utilizada para estudos populacionais em plantas por ser a mais informativa dentre

aquelas que utilizam marcadores co-dominantes (Palma-Silva et al. 2009; Pinheiro et al. 2010, 2011; Collevatti 2000; Collevatti et al, 2012). Em particular, as regiões amostradas em estudos com microssatélites geralmente incluem grande quantidade de alelos, resultantes da alta taxa de mutação presente nessas regiões (Ferreira e Grattapaglia 1995). *Microssatélites ou SSRs (Simple Sequence Repeats)* consistem em seqüência curtas de DNA, de 1 a 5 pares de bases, repetidos em “tandem” [CCTCCTCCT] = (CCT)₃; GAGAGAGA = (GA)₄], como (CCT)_n ou (GA)_n e dispersas pelo genoma dos eucariotos (Ferreira e Grattapaglia 1995). Os microssatélites são marcadores moleculares co-dominantes, possibilitando a identificação de indivíduos heterozigotos e resultando em informação adequada para quantificar a variabilidade genética das populações (Ferreira e Grattapaglia 1995). Esta técnica busca encontrar variação nas regiões altamente repetitivas através de alterações no número de repetições em tandem. Diferenças no tamanho de um *locus* devidas à variação no número de unidades de repetição nele contidas são consideradas como alelos diferentes (Ferreira e Grattapaglia 1995). Essas regiões repetitivas são então amplificadas através da utilização de “primers” específicos e o seu tamanho verificado em gel com marcação radioativa, ou por genotipagem em seqüenciadores automáticos de DNA com marcação por fluorescência. Microssatélites são considerados espécie-específicos devido a alta homologia exigida pelos “primers” para amplificar as regiões de interesse (Rossetto 2001). Além disso, a necessidade de iniciadores específicos para o grupo taxonômico de interesse geralmente restringe sua utilização em populações naturais (Ferreira e Grattapaglia 1995). Entretanto, a técnica de obtenção desses iniciadores por meio da construção de uma biblioteca enriquecida de microssatélites se tornou mais acessível durante os últimos anos.

Outro fato que viabilizou o uso de microssatélites foi a publicação de um alto número de “primers”, os quais frequentemente funcionam em espécies proximalmente relacionadas (Rossetto 2001; Barbará et al. 2007; Ferres et al. 2009; Pinheiro et al.

2009). A transferabilidade positiva desses “primers” é aparentemente maior em espécies que possuem tempo de geração longo, espécies alógamas ou espécies com sistema misto de cruzamento. Além disso, a transferabilidade apresenta maior sucesso nas espécies cujo genoma é menor (Barbará et al. 2007).

Marcadores de Cloroplasto

A utilização de DNA de cloroplasto (cpDNA) ocorreu inicialmente em estudos que envolviam a construção de filogenias moleculares e entendimento de zonas híbridas (McCauley, 1995). Embora possa ser considerado como uma ferramenta universal para avaliar a variabilidade dentro e entre populações, a sua utilização em geral é pequena devido ao baixo polimorfismo intrapopulacional encontrado no cpDNA (Taberlet et al. 1991; Dumolin-Lapegue et al. 1997; McCauley 1995). Mais especificamente a existência de polimorfismo no cpDNA em quantidades que viabilizem a sua utilização em estudos populacionais pode variar muito de um táxon para outro. A utilização do cpDNA torna-se relevante em plantas pois são efetivamente haplóides e tipicamente não recombinantes. Além disso, seu modo de herança uniparental (materna em angiospermas), com variação no modo de herança mendeliana, pode ajudar a elucidar a relativa influência da dispersão de pólen e sementes no fluxo gênico em plantas, além de detectar processos demográficos históricos (Olmstead e Palmer, 1994; McCauley, 1995; Cozzolino et al. 2003, Pinheiro et al. 2011).

Modelagem de Nicho Ecológico (MNE)

A MNE tem como premissa fundamental prever possíveis áreas da ocorrência de uma determinada espécie a partir de dados de localidades georreferenciadas e conjuntos de dados ambientais e espaciais (Phillips et al. 2005). Dessa maneira a MNE e modelos de distribuição de espécies permitem uma visualização das possíveis

áreas de ocorrência de espécies, tanto no passado quanto no futuro, podendo também prever mudanças na distribuição das espécies em consequência de alterações climáticas pretéritas ou futuras (Kremen et al. 2007; Hijmans e Graham 2006). Assim, MNE representa uma ferramenta muito útil para estudos filogeográficos, oferecendo uma hipótese objetiva e espacialmente explícita dos padrões de distribuição geográfica no passado (Waltari et al. 2007). Esta ferramenta foi utilizada inicialmente por Hugall et al. (2002) e vem ganhando impulso nos trabalhos de filogeografia desde então (Diniz-Filho et al. 2008). Trabalhos recentes com espécies de Mata Atlântica utilizaram MNE para reconstruir possíveis cenários de refúgios em períodos glaciais, e auxiliar na elucidação dos padrões filogeográficos desse Bioma (p.ex., Carnaval e Moritz 2008; Carnaval et al. 2009; Loiselle et al. 2010; Thomé et al. 2010). Os resultados destes trabalhos apontam a necessidade de um maior número de estudos desta natureza para que possamos avançar no entendimento da história filogeográfica desse complexo Bioma.

Objetivo Central da Tese

Considerando a relevância da Mata Atlântica e a distribuição natural da espécie *T. cassinoides* em subpopulações ao longo de praticamente toda extensão latitudinal desse Bioma, esta tese visou investigar a diversidade genética inter e intrapopulacional dessa espécie, utilizando marcadores nucleares de microssatélites e marcadores plastidiais. Esses resultados somados a análises de estruturação genética populacional, utilização da MNE e variações demográficas são então utilizados para investigar a história filogeográfica de *T. cassinoides*.

Bibliografia

Aidar, M.P.; Godoy, J.R.; Bergmann, J.; Joly, C.A. 2001. Atlantic Forest succession over calcareous soil, Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira – PETAR, SP. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 24, n. 4, p. 455– 469.

Amaro, R.C.; Rodrigues, M.T.; Yonenaga-Yassuda, Y.; Carnaval, A.C. 2012. Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: Molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.62, p.880-888.

Andrade, I.M.; Mayo, S.J.; van den Berg, C.; Fay, M.F.; Lexer, C.; Kirkup, D. 2007. A preliminary study of genetic variation in populations of *Monstera adansonii* var. *klotzschiana* (Araceae) from North-East Brazil estimated with AFLP molecular markers. *Annals of Botany*, v.100, p.1143-1154.

Assis, M.A. 1999. Florística e caracterização das comunidades vegetais da planície costeira de Picinguaba, Ubatuba, SP. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 248p.

Avice, J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman e Hall, New York, USA.

Avice, J.C. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Ed. Harvard University, Cambridge, MA, USA.

Avice, J.C.; Arnold, J., Ball, R.M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A.; Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.18, p.489-522.

Barbará, T.; Martinelli, G.; Fay, M.F.; Mayo, S.J.; Lexer, C. 2007. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to Neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Molecular Ecology*, v.16, p.1981–1992.

Bennett, K.D.; Provan, J. 2008. What do we mean by 'refugia'? Quaternary Science Reviews, 27, 2449-2455.

Birky, C.W.; Maruyama, T.; Fuerst, P. 1983. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplast, and some results. Genetics, v.1003, p.513-527.

Brown, K.S.; Ab'Saber, A.N. 1979. Ice-age forest refuges and evolution in Neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological and pedological data with biological endemism. Paleoclimas, v.5, p.1–30.

Cabanne, G.S.; Santos, F.R. Miyaki, C.Y. 2007. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. Biological Journal of the Linnean Society, v.91, p.73-84.

Cabanne, G.A.; d'Horta, F.M.; Sari, E.H.R.; Santos, F.R.; Miyaki, C.Y. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. Molecular Phylogenetics and Evolution, v.49, p.760–773.

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

Carnaval, A.C.; Moritz, C.; Hickerson, M.; Haddad, C.; Rodrigues, M. 2009. Stability predicts diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. Science, v. 323, p. 785-789.

Carvalho, P.E.R. 1994. Espécies Florestais Brasileiras: recomendações silviculturais potencialidades e uso da madeira. Colombo: EMBRAPA-CNPQ. Brasília, DF, Brasil. 640p.

Cavallari-Neto, M. 2004. Efeito do manejo na diversidade genética de populações naturais de *T. cassinoides* Lam (DC), por marcadores isoenzimáticos. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais), Universidade de São Paulo (Esalq), Piracicaba, SP. 67p.

Colevatti, R.G. 2000. Variabilidade genética em *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae): estrutura genética, sistemas de cruzamento, filogeografia e subsídios para a conservação. Tese (Doutorado em Ecologia), Universidade de Brasília, Brasília, DF. 140p.

Collevatti, R.G.; Castro, T.G.; Lima, J.S.; Telles, M.P.C. 2012. Phylogeography of *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae), an endangered tree species from rocky savannas, suggests bidirectional expansion due to climate cooling in the Pleistocene. *Ecology and Evolution*, v.2, p.1024-1035.

Cozzolino, S.; Noce, M.E.; Musacchio, A.; Widmer, A. 2003. Variation at a chloroplast minisatellite locus reveals the signature of habitat fragmentation and genetics bottlenecks in the rare orchid *Anacamptis palustris* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, v.90, p.1681-1687.

Diegues, A.C.S. 1991 (Coord.) A caxeta no Vale do Ribeira (SP): estudo sócio-econômico da população vinculada à extração e ao desdobro da caxeta. Programa de Pesquisa em Áreas Úmidas. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 120p.

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

Dumolin-Lapegue, S.; Pemonge, M.H.; Petit, R.J. 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology*, v.6, p.393–397.

Feres, J.M.; Martinez, M.L.L.; Martinez, C.A.; Menestriner, M.A.; Alzate-Marin, A.L. 2009. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*. *Molecular Ecology*, v.9, p.434-437.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Embrapa-Cenargen. Brasília, DF. 220p.

Gentry, A.H. 1992. Bignoniaceae Part II (Tribo Tecomeae). In: *Flora Neotropica*, Monograph 25 (II), New York, USA. 370p.

Grazziotin, F.G.; Monzel, M.; Echeverrigaray, S.; Bonatto, S.L. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, v.15, p.3969-3982.

Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian Forest Birds. *Science*, v.165, p.131-137.

Hartl, D.; Clark, A.G. 2010. Princípios de genética de populações. Ed Artimed. Porto Alegre, RS, Brasil. 660p.

Hey, J.; Machado, C.A. 2003. The study of structured populations-new hope for a difficult and divided science. *Nature Review Genetics*, v.4, p.535-543.

Hijmans R.J.; Graham C.H. 2006. The ability of climate envelope models to predict the effect of climate change on species distributions. *Global Change Biology*, v.12, p.1–10.

Instituto de Estudos Socioambientais do Sul da Bahia (IESB), Instituto de Geociências da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IGEO-UFRJ), Departamento de Geografia da Universidade Federal Fluminense (UFF). 2007. Levantamento da cobertura vegetal nativa do bioma Mata Atlântica. Relatório final. PROBIO 03-2004, Brasília, 84p.

Kageyama, P.; Gandara, F.B. 1994. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira, Anais. Publicação ACIESP v.87, p.01-09.

Kimura, M.; Weiss, G.H.; 1964. The stepping-stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, v.49, p.561-574.

Kolb. R.B. 1998. Respostas Metabólicas e morfoanatômicas de sementes e plantas de *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC (Bignoniaceae) à hipóxia. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 86p.

Kremen, C.; Cameron, A.; Moilanen, A.; Phillips, S.J.; Thomas, C.D.; Beentje, H.; Dransfield, J.; Fisher, B.L.; Glaw, F.; Good, T.C.; Harper, G.J.; Hijmans, R.J.; Lees, D.C.; Louis, E.; Jr, Nussbaum, R.A.; Raxworthy, C.J.; Razafimpahanana, A.; Schatz, G.E.; Vences, M.; Vieites, D.R.; Wright, P.C.; Zihra, M.L. 2007. Aligning conservation priorities across taxa in Madagascar with high-resolution planning tools. *Science*, v.320, p.222–226.

Levin, D.A. 1981. Dispersal versus gene flow in plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v.68, p.233-253.

Lira, C.F.; Cardoso, S.R.S.; Ferreira, P.C.G.; Cardoso, M.A.; Provan, J. 2003. Longterm population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Molecular Ecology*, v.12, p.3219–3225.

Loiselle, B.A.; Graham, C.H.; Goerck, J.M.; Ribeiro, M.C. 2010. Assessing the impact of deforestation and climate change on the range size and environmental niche of bird species in the Atlantic forest, Brazil. *Journal of Biogeography*, v.37, p.1288-1301.

Lorenz-Lemke, A.P.; Muschner, V.C.; Bonatto, S.L.; Cervi, A.C.; Salzano, F.M.; Freitas, L.B. 2005. Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Annals of Botany*, v.95, p.799-806.

Lorenzi, H. 1998. *Árvores Brasileiras*. vol. 1. Ed. Plantarum, Nova Odessa, SP, Brasil, 352p.

McCauley, D. 1995. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Tree*, v.10, p.198-202

Metzger, J. P. 2009. Editorial Conservation issues in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Conservation*, v. 142, p. 1138–1140.

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

Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; da Fonseca, G.A.B.; Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, p. 853-858.

Olmstead, R.G.; Palmer, J.D. 1994. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *American Journal of Botany*, v.81, p.1205–1224.

Palma-Silva, C.; Lexer, C.; Paggi, G.M.; Barbara', T.; Bered, F.; Bodanese-Zanettini, M.H. 2009. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity*, v.103, p.503–512.

Pierce, B. A. 2004. Genética um enfoque conceitual. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, Brasil. 774p.

Pinheiro, F.; Palma-Silva, C.; Barros, F.; Cozzolino, S. 2009. Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*. *Genetics and Molecular Biology*, v.32, p.337-339.

Pinheiro, F.; Barros, F.; Palma-Silva, C.; Meyer, D.; Fay, M.F.; Suzuki, R.M.; Lexer, C.; Cozzolino, S. 2010. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology*, v.19, p.3981-3994.

Pinheiro, F.; Barros, F.; Palma-Silva, C.; Fay, M.F.; Lexer, C.; Cozzolino, S. 2011. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography*, v.38, p.1923-1935.

Phillips S.J.; Robert, P.; Anderson, R.P.; Schapired, R.E. 2005. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, v.190, p.231-259.

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

Rizzini, C.T.; 1979. Tratado de fitogeografia do Brasil – Aspectos sociológicos e florísticos. Ed. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. 375p.

Rosseto, M. 2001. Sourcing of SSR Markers from related plant species. *In*: R.J. Henry (Ed), Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting of plants vol. 1. CAB Publishing, New York, NY, USA. 325p.

Sampaio, D.; Souza, V.C.; Oliveira, A.A.; Rodrigues, R.R.; Souza, J.P. 2010. Árvores da Restinga. Ed. Neotrópica, São Paulo, Brasil, 280p.

Scarano, F.R. 2002. Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic Rainforest. *Annals of Botany*, v.90, p.517–524.

Schaal, B.A.; Hayworth, D.A.; Olsen, K.M.; Rauscher, J.T.; Smith, W.A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, v.7, p.465-474.

Silva, S.M.; Britez, R.M.; Souza, S.W.; Joly, A.C. 1994. Fitossociologia do componente arbóreo da floresta de Restinga da Ilha do Mel, Paranaguá, PR. III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira, Anais. Publicação ACIESP v.3, p.33-48.

Slatkin, M. 1977. Gene flow and the genetic drift in a species subject to frequent local extinction. *Theoretical Population Biology*, v.12, p.253-262.

Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, v.236, p.787-792.

Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, v.47, p. 264-279.

SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. 1993. Atlas da evolução dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1985 a 1990. São Paulo, Brasil.

SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. 2000. Atlas dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica. São Paulo, Brasil.

SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. 2008. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período de 2000 a 2005. São Paulo, Brasil. <http://barraswww.sosmataatlantica.org.br>

Stehmann, J.R.; Forzza, R.C.; Salino, A.; Sobral, M.; Costa, D.P.; Kamino, L.H.Y. (editores). 2009. Plantas da Floresta Atlântica. Ed. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 516p.

Taberlet, P.; Gielly, L.; Pautou, G.; Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, v.17, p.1105–1109.

Tchaicka, L.; Eizirik, E.; Oliveira, T.G.; Cândido Jr, J.F.; Freitas, T.R.O. 2007. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Molecular Ecology*, v.16, p.819-838.

Thomé, M.T.; Zamudio, K.R.; Giovanelli, J.G.R.; Haddad, C.F.B.; Baldissera-Jr, F.A.; Alexandrino, J. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.55, p.1018-1031.

Turchetto-Zolet, A.C.; Cruz, F.; Vendramin, G.G.; Simon, M.F.; Salgueiro, F.; Margis-Pinheiro, M.; Margis, R. 2012. Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.65, p.174-182.

Vanzolini, P.E.; Williams, E.E. 1970. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria: Iguanidae). *Arquivos de Zoologia*, v.19, p.1–298.

Waltari, E.; Hijmans, R.J.; Peterson, A.; Nyári, A.S.; Perkins, S.L.; Guralnick, R.P. 2007. Locating Pleistocene refugia: comparing phylogeographic and ecological niche model predictions. *PLoS ONE* v.2, p. 563.

Write, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics*, v.16, p.97-159.

Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, v.28, p.114-138.

Ziller, S.R. 1992. Análise fitossociológica de “caxetais”. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR. 101p.

Microsatellite Loci for *Tabebuia cassinoides* (Bignoniaceae)

Vania Quibao Pretti¹, Elaine Françoso², Danilo Augusto Sforça³, Fabio Pinheiro⁴,
Diogo Meyer⁵ and Lúcia G. Lohmann¹

1-Laboratório de Sistemática Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. 2-Laboratório de Genética e Evolução de Abelhas, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. 3-Laboratório de Análise Genética e Molecular, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. 4-Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brasil. 5- Laboratório de Biologia Evolutiva e Conservação de Vertebrados, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Corresponding authors: V.Q. Pretti and L.G. Lohmann
E-mails: vaniapretti@gmail.com e llohmann@usp.br

ABSTRACT

Tabebuia cassinoides (Lam.) DC. (Bignoniaceae) popularly known as "caxeta", is an endemic tree from the Brazilian Atlantic Forest. This species is commercially exploited and thus, knowledge about its genetic structure along the Atlantic Forest is important for the improvement of the management plans that currently exist for this region. Molecular markers represent a powerful tool for population genetic studies. The objective of the present study is to construct a microsatellite enriched genomic library for *T. cassinoides*, to select polymorphic loci, and to standardize their PCR

amplification conditions. Out of the 15 loci examined, five were polymorphic. The number of alleles per locus ranged from two to eight, with a mean of 4.4. Considering the economic importance of *T. cassinoides*, the microsatellite loci here described will contribute to its ecology and conservation.

Key words: *Tabebuia cassinoides*, microsatellite primers, Bignoniaceae, Atlantic Forest.

INTRODUCTION

Tabebuia cassinoides (Lam.) DC., popularly known as “caxeta,” is restricted to the Swamp Forests from the Atlantic Rain Forest of Eastern Brazil, occurring from the state of Paraná until the northern portions of the state of Espírito Santo (Gentry, 1992). The wood of *T. cassinoides* is very durable and widely used economically. Therefore, the knowledge of the ecology, natural history, population dynamics and genetic structure of *T. cassinoides* along the Atlantic forest is of great important for the management plans currently existing for the region (Resolution SMA 11/92 CETESB). One of the greatest limitations of plant population genetic studies is the development of molecular markers with adequate levels of variation to resolve the questions of interest. More recently, special attention has been given to microsatellite loci (Sunnucks, 2000) due to their high level of polymorphisms and because those markers are thought to be naturally selected (Schlötterer, 1998). The objective of this study is to construct a microsatellite enriched genomic library for *T. cassinoides*, select polymorphic loci and standardize their PCR amplification conditions.

MATERIAL AND METHODS

Total DNA was extracted from one dry leaf of *T. cassinoides* using the DNA extraction kit Invisorb spin plant mini kit (Invitek), following the manufacturer's protocol, with minor modifications. Marker isolation involved the construction of a genomic library partially enriched for (CT)_n and (GT)_n repeats by using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles (Kijas et al., 1994), with modifications (Billote et al., 1999). DNA fragments enriched with microsatellites were ligated into a pGEM-T Easy vector (Promega) as described by the supplier and the product was used to transform competent cells of *E. coli* XL1 Blue. Ninety-six recombinant colonies were obtained and sequenced by Macrogen (South Korea). Forward and reverse sequences were edited in Geneious Pro 5.3.5 (Drummond et al., 2009) and the same software was used to locate the regions containing microsatellites with Phobos plugin (Mayer, 2010). Primers were designed with the software Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Among the clones containing microsatellite regions, 19 allowed design and synthesized primers. Forward primers were synthesized with a 19-bp long 5' M13 tail (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') by the method of Schuelke (2000).

To determine polymerase chain reaction (PCR) amplification conditions and general genetic parameters, 67 individuals from two Brazilian populations (Linhares, 36 samples and Iguape, 31 samples), were analyzed. Total DNA was extracted following the procedures described above. PCR reactions were set following the protocols described in Francisco et al. (2010), and using the following amplification conditions: 94°C/3min, 35 cycles of 94°C/30s, (60°C/1min or 54°C/1min; Table 1), 72°C/1min and 72°C/10min. PCR products were separated by electrophoresis in an Applied Biosystems

3730 Genetic Analyzer. GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems) was used as size standard.

The software GeneMarker 1.85 (SoftGenetics) was used for genotyping automatically the individuals followed by visual checking. Genetic diversity indexes were calculated in the GenAlEx 6.4 (Peakall & Smouse, 2006) and tests for Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) were conducted in ARLEQUIN 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Linkage disequilibrium was calculated in GENEPOP 4.1 (Rousset, 2008).

The cross amplification of 21pairs of primers developed for *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook.f. ex S.Moore (Braga et al., 2007) were tested for *T. cassinoides* using the same amplification protocol described above.

RESULTS

Fifteen out of 19 primer pairs amplified their respective loci successfully. Out of these 15 loci, five loci were polymorphic (Table 1). The number of alleles per locus ranged from two to eight. Expected and observed heterozygosities ranged from 0,1123 to 0,6685 (mean 0,4298) and 0,0434 to 0,7272 (mean 0,3908), respectively. We found an absence of polymorphism at locus Tcass F9 in the population from Linhares (Espírito Santo). Three loci, Tcass B5 and Tcass H3 in the population from Iguape (São Paulo), and Tcass B11 from the population from Linhares, showed a significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.001$), due to heterozygote deficiency in the population from Iguape and heterozygote excess in the population from Linhares (Table 1). The natural subdivision of populations of *T. cassinoides* may be the cause of the disequilibrium observed in these loci. No linkage disequilibrium between any pair of loci was detected. GenBank accession numbers to those sequences are the following: TcassB5=JQ905595, TcassB11=JQ905596, TcassE2=JQ905597, TcassF9=JQ905598,

and TcassH3=JQ905599. The cross amplification in *T.cassinoides* using primers designed for *T.aurea* did not lead to satisfactory results. Only seven of the 21 primer pairs amplified, and only three of these were polymorphic (14, 29%) (Table 2).

CONCLUSIONS

We detected a low efficiency of cross amplifications using primers developed for *T. aurea* in *T. cassinoides*. Considering the economic importance of *T. cassinoides*, the microsatellite loci described here will greatly contribute to a further understanding of the ecology and conservation of this taxon.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Alexandre Rizzo Zuntini for assistance during field-work, and Drs. Anette P. de Souza, Ana Cristina Bondioli, Daniela Calcagnotto, and Riviane Garcez for assistance during the preparation of the genomic library of *T. cassinoides*. We also thank CNPq for a Ph.D. scholarship to VQP (Proc. 142040/2009-6) and a Pq-2 grant to LGL, and Fapesp for Ph.D. scholarships to EF (Proc. 2010/20548-2).

TABLE1. Polymorphic microsatellite loci characterized for *Tabebuia cassinoides* (Lam) DC.and genetic indexes for two populations (Iguape and Linhares). **T(A)**: optimal annealing temperature in ⁰C; **AN**: allele numbers; **Ho**: observed heterozygosity; **He**: expected heterozygosity **Mono**: monomorphic locus

Primers	Sequences	T(A)	Repeat	A N	Size (bp)	Iguape	He	Linhares	He	Genbank
						Ho		Ho		
Tcass B5	(F) ACAAGTCTTAACCTTTTCAGATGC (R) ACAGGCACCTCAGATTTAGAAC	54	(CT) ₁₅ CCCT(CT) ₄	8	238-254	0.0869	0.4917*	0.6666	0.6685	JQ905595
Tcass B11	(F) GCCAGCAGGACGGTTGTGAT (R) TGGCGTCATCCCGCTCTATG	54	(AG) ₂ AC(AG) ₈	5	212-234	0.3333	0.4028	0.7272	0.4806*	JQ905596
Tcass E2	(F) TGGAGTTGGGATTTCCCCGTTGA (R) ACAACGACACTCTGGTGAATCTTGC	60	TTTC(T) ₆ (TC) ₂ (TTC) ₄ (TC) ₈ (T) ₄ TC	3	265-278	0.57143	0.5785	0.1176	0.1123	JQ905597
Tcass F9	(F) ACCCAAAGCTCCCAAAGCAGCA (R) CAGGTTCGTCGCTTGGCTATGGA	54	(GA) ₁₁	2	222-226	0.45833	0.4388	mono	mono	JQ905598
Tcass H3	(F) GAGAATCCTGAGGCGATAACATGAGGT (R) ACATGCAAATGGTGGCCTTAATCAGA	54	(CATA) ₂ CAT(GA) ₁₂	4	193-207	0.0434	0.2637*	0.5128	0.4315	JQ905599

*P<0,001

TABLE2. Cross amplification test in *Tabebuia cassinoides* with primers developed for *Tabebuia aurea*. Successful amplifications (+), and failed amplifications (--) are indicated.

<i>primers</i>	reference	status amplification	result. genotipagem
Tau 07	Braga et. al. 2007	--	--
Tau 08	Braga et. al. 2007	--	--
Tau 09	Braga et. al. 2007	--	--
Tau 10	Braga et. al. 2007	--	--
Tau 13	Braga et. al. 2007	+	--
Tau 14	Braga et. al. 2007	+	polymorphic
Tau 15	Braga et. al. 2007	+	polymorphic
Tau 16	Braga et. al. 2007	--	--
Tau 17	Braga et. al. 2007	+	monomorphic
Tau 18	Braga et. al. 2007	--	--
Tau 19	Braga et. al. 2007	--	--
Tau 20	Braga et. al. 2007	--	--
Tau 21	Braga et. al. 2007	+	polymorphic
Tau 22	Braga et. al. 2007	+	--
Tau 23	Braga et. al. 2007	--	--
Tau 24	Braga et. al. 2007	--	--
Tau 27	Braga et. al. 2007	+	--
Tau 28	Braga et. al. 2007	--	--
Tau 30	Braga et. al. 2007	--	--
Tau 31	Braga et. al. 2007	--	--

REFERENCES

- Braga AC, Reis AMM, Leoi LT, Pereira RW and Collevatti RG (2007). Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). *Molecular Ecology*, 17: 53-56.
- Billotte N, Lagoda PJJ, Risterucci A and Baurens FC (1999). Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277–288.
- Drummond AJ, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Thierer T and Wilson A (2009). Geneious v4.7. Available from <http://www.geneious.com/>
- Excoffier L, Lischer HEL (2010). Arlequin suite v. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Franciso FO, Brito RM, Gonçalves PHP, Pioker F, Domingues-Yamada CAMT and Arias MC (2010). Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the stingless bee *Plebeia remota* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps. *Apidologie* 32: 323-332.
- Gentry AH (1992). Flora Neotropica, Monograph 25 (II), Bignoniaceae Part II (Tribo Tecomeae). New York, NY, USA. 370p.
- Kijas JM, Fowler JC, Garbett CA and Thomas MR. (1994). Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *BioTechniques* 16:656-60.
- Mayer C (2010). Phobos v. 3.3.11 Programa de busca de repetições. Disponível em: http://www.rub.de/spezzoo/cm/cm_phobos.htm

- Peakall R, Smouse PE (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Rousset F (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103–106.doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In S. Krawetz and S. Misener [eds], *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*, 365-386. Humana Press, Totowa.
- Schlötterer C (1998). Are microsatellites really simple sequences? *Current Biology* 8:R132-R134.
- Schuelke M (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- Sunnucks P (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution* 15:199-203.

Genetic diversity in natural populations of *Tabebuia cassinoides* (Bignoniaceae): case study on genetic differentiation between “caxetais” in the municipalities of Iguape (SP) and Ilha Comprida (SP)

Vania Quibao Pretti¹, Fabio Pinheiro², Diogo Meyer³ and Lúcia G. Lohmann¹

¹Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 05508-090, São Paulo, SP, Brazil. ²Instituto de Botânica, 04301-012, São Paulo, SP, Brazil, ³Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 05508-09, São Paulo, SP, Brazil.

Abstract

Population genetic studies of tropical tree species have revealed highly complex distribution patterns for individuals within populations. This study uses nuclear microsatellite markers to verify how the geographical distribution of a species with aggregated, clearly delimited and fragmented distribution, *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC. might influence the genetic diversity structure at a local level. Despite the detection of alleles that are exclusive to each of the population clusters studied, over 95% of the genetic variability is concentrated within these populations, showing a low level of differentiation and lack of genetic structure. We suggest that the fragmentation of these populations is only geographic due to edaphic needs, and that the clustered and naturally fragmented distribution of *T. cassinoides* does not indicate subdivision within populations.

Key words: *Tabebuia cassinoides*, local gene flow, subpopulations.

Introduction

Understanding how individuals of tropical species perpetuate spatially and temporally in natural populations is essential for a better understanding of the genetic structure of these taxa (Kageyama and Gandara 1994). Genetic variation within and between populations represents the basis of evolution, with the amplitude of intra-population genetic variation affecting the adaptive potential of populations in the face of environmental changes (Pierce 2004). In order to determine the evolutionary processes that shaped the current patterns of genetic variation it is necessary to understand the types and frequencies of genotypes and alleles that are available in populations of each taxon (Pierce 2004). However, innumerable patterns of geographic distribution of individuals can be found in tropical systems, making it very complicated for us to understand and delimit natural populations in Tropical systems (Diniz-Filho et al. 2008).

Indeed, Tropical tree species are known to present highly complex distribution patterns at the population level (Condit et al. 2000). In particular, density, abundance, rarity, soil type, and topographical variation, among other factors are commonly thought to have influenced the distribution of natural plant populations due to their sessile nature. Furthermore, the distribution pattern of each tree species can also change depending on the age of the samples, with adult individuals being concentrated in the places that are most suited to that species and younger individuals being more widely scattered (Condit et al. 2000). Moreover, most species are grouped into smaller subpopulations that are not always clearly delimited (Diniz-Filho et al. 2008; Hartl and Clark 2010). Populational subdivision can cause an increase in genetic drift and inbreeding, both of which are associated with smaller-sized populations, generally leading to a loss of variation in subpopulations due to allele fixation (Ellstrand and Elam 1993). Therefore, the way in which natural populations are distributed directly influences their population structure as it determines up to which point each local population can be considered an independent evolutionary unit (Slatkin 1993). In particular, the direction and degree of

gene flow between populations represent important forces for the maintenance and/or homogenization of genetic differences (Slatkin 1993).

The tree species *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC., popularly known as “caxeta”, presents an aggregated and naturally fragmented distribution pattern that is associated with clearly delimited patches of waterlogged soil, where most of its individuals are found (92.5%) (Assis 1999). *Tabebuia cassinoides* is pollinated by bees and its winged seeds are dispersed by wind or water (Cavallari-Neto 2004). Individual “caxetais” are separated by various kilometers, which, in theory, compromises gene flow between them. As a result, it is difficult to determine whether each “caxetal” consists of a genetically independent population or whether the sets of “caxetais” located in a given region constitute a genetically unique population merely subdivided geographically due to the ecological characteristics.

This study used nuclear microsatellite data to investigate how the aggregated, well-delimited and fragmented distribution of *T. cassinoides* might impact the genetic structure of this taxon at a local level. More specifically, we address: (1) Whether there are differences in the genetic composition of each “caxetal”; (2) Whether the percentage of genetic diversity between the “caxetais” is significant or not; and, (3) Whether the “caxetais” of a single region can be considered as a single population or evolutionary set.

Material and Methods

Sampling

We sampled 80 individuals from two “caxetais” from Iguape (São Paulo state) and one caxetal from Ilha Comprida (São Paulo state) (Table 1). To avoid collecting the same plant more than once, we located possible offshoots and made sure that samples were separated by a minimum of 4m. All vouchers are deposited at SPF, the Herbarium from the University of São Paulo. In the field, collected leaves were immediately cut into small pieces and placed in individual identification bags containing

silica gel. Total genomic DNA was extracted using an Invitex (Invisorb, Spin Plant Mini Kit) extraction kit following the manufacturer's instructions with slight modifications.

Molecular markers

We tested 41 nuclear microsatellite markers for *T. cassinoides* (Tables 1 and 2), out of which eight were selected for the present study. Of the eight markers selected three were originally developed for *Tabebuia aurea* (Tau 14, Tau 15 and Tau 21) (Braga et al. 2007) and five were developed for *T. cassinoides* (Tcass B05, Tcass B11, Tcass E02, Tcass F09 and Tcass H03) (Pretti et al. In prep.). PCR reactions were prepared following Francisco et al. (2010) and submitted PCR amplifications following the conditions suggested by Pretti et al. (In prep.). PCR products were genotyped using an Applied Biosystems 3730 Genetic Analyzer with GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems) as a molecular size standard. Genotyping results were read using the software GeneMarker 1.85 (SoftGenetics), with each generated peak being visually inspected.

Thirteen markers for plastid DNA (cpDNA) regions were tested in accordance with the protocols indicated for each primer pair (Supplement Table 3). However, none of these regions displayed variation between the three "caxetais" compared and those analyses were not followed.

Genetic diversity "caxetais"

We created a matrix with the genotyping results on GeneALEX v.6.4 (Peakall and Smouse 2006). The genetic diversity of each "caxetal" was accessed using the number of private alleles ascertained by GeneALEX, while the expected heterozygosity (H_e), observed heterozygosity (H_o) and inbreeding F_{is} coefficient (Weir and Cockerham 1984) were estimated with Arlequin v.3.5 (Excoffier and Lischer 2010). Allelic richness was calculated by dividing the number of alleles found in the population by the total number of samples.

Genetic structure

Fst values and population structure through total and local molecular variance (AMOVA; Excoffier et al. 1992) were obtained using Arlequin v.3.5 (Excoffier and Lischer 2010). Individuals were then classified into genetic groups (K) and the proportion of genetic mixing of each individual (Q) was estimated using the Bayesian attribution method implemented in Structure 2.3.3 (Pritchard et al. 2000). The data was analyzed using different values for K (1-10) and without considering any type of complementary information (i.e., origin) in order to determine the most likely number of groups. All analyses were conducted assuming independence of allelic frequencies under the mixture model, and using a 100,000 burn-in, 50,000 MCMC replicates and 10 interactions for K to ensure statistical stability (Pritchard et al. 2000).

Results

Genetic variation within the sampled “caxetais”

Tabebuia cassinoides presented low genetic diversity overall, with locus 2 (6 alleles) being the most polymorphic (Table 2). The number of alleles per locus, allelic richness, values of Heterozygosity observed (Ho) and Heterozygosity expected (He) for each caxetal, and inbreeding coefficient values are presented in Table 2. Locus 8 was fixed for “caxetal” 3, and all of “caxetais” sampled presented exclusive alleles at low frequencies, except for allele 217 in locus 5 which presented a frequency of approximately 20% for “caxetal” 2. Loci 1 and 5 presented significant Hardy and Weinberg Equilibrium (HWE) deviations for all populations, while loci 2, 4 and 6 presented HWE deviations for populations 1, 2 and 3, respectively. Allelic frequency for each allele in the different “caxetais” is presented in Figure 1. The value for the inbreeding coefficient for all “caxetais” taken together was 0.22156. AMOVA calculations indicated that 95.19% of the total genetic diversity of *T. cassinoides* is located within “caxetais”, while 4.18% is located between “caxetais”. No geographic

structure was detected between “caxetais”; the proportion of Q mixture for each individual is shown in Figure 2.

Discussion

Our results indicate a lack of genetic structure among “caxetais” assuming, a-priori, $K=3$ (Figure 4). Our AMOVA data indicated that over 95% of the genetic variability is within the three “caxetais” sampled, indicating low levels of genetic differentiation and only 5% variability between them. Our data corroborate previous studies on the genetic variability of two managed and non-managed “caxetais” in the Iguape region, which also showed that 95% of the genetic variability was contained within, and 5% between the studied stands (Sebben et al. 2001). High hybridization coefficient values (F_{is}) were observed in each of the “caxetais” when analyzed separately, indicating an excess of homozygosity. Those results can be interpreted as evidence of the Wahlund effect (Hartl and Clark 2010) in *T. cassinoides* populations, due to fragmented structuring. However, inbreeding coefficient (F_{is}) values for the three “caxetais” analyzed together also presented high F_{is} value and therefore did not demonstrate a fall in inbreeding through union, contrary to what one would expect if populations were genetically subdivided (Hartl and Clark 2010).

Exclusive alleles were identified in each of the different “caxetais”. Even though these exclusive alleles were only present in low frequencies (Figure 2), this data might contribute for the quantification of total genetic diversity of *T. cassinoides* on a broader scale. It is often the case that genetic structure is not apparent through the observation of nuclear DNA data but genetic structure based on cpDNA regions is found. While the former reflects gene flow via pollen among populations, the latter is indicative of gene flow via seed dispersal among angiosperm populations (Levin 1981). However, since the cpDNA is haploid and generally not recombinant, their rates of polymorphism are usually very low for studies at intra-specific level (Taberlet et al. 1991; Dumolin-

Lapegue et al. 1997; McCauley 1995). Indeed, this was shown to be the case for *T. cassinoides* in the present study (Supplements Table 3).

Conclusions

Our data suggests that the naturally fragmented and subdivided structure of *T. cassinoides* does not lead to significant genetic differentiation between the individual population groupings known as “caxetais”, indicating that these groupings behave as a single population at local levels. However, future studies involving a greater number of molecular markers may redefine our knowledge of the effect of fragmentation on the population genetic structure of *T. cassinoides*.

Tables

Table 1. Location of the sampled “caxetais”

Caxetal/ Abbreviation	Municipality	Latitude	Longitude	Samples
IG-O	Iguape	-24.577505	-47.550708	31
IG-L	Iguape	-24.663045	-47.540498	20
IC	Ilha Comprida	-24.719531	-47.535794	29

Table 2. Characterization of the genetic variability of *Tabebuia cassinoides* in three different “caxetais”. Number of alleles per population (NAP), total number of alleles in the three “caxetais” (TNP), number of private alleles (PA), Heterozygosity expected (He), Heterozygosity observed (Ho), allelic richness (AR), and Inbreeding coefficient (Fis).

Caxetal	NAP/TNP	PA	He	Ho	AR	Fis
IG-O	24/29	3	0.3489	0.2567	0.77	0.13242
IC	24/29	4	0.4217	0.3238	0.83	0.17664
IG-L	21/29	1	0.3634	0.2500	1.05	0.31760

Figures

Figure 1. Allele Frequency per locus. In blue pop1= IG-O, in red pop2=IC, in green pop3=IG-L.

Figure 2. Lack of structure among the three different “caxetais” studied.

References

- Assis, M.A. 1999. Florística e caracterização das comunidades vegetais da planície costeira de Picinguaba, Ubatuba, SP. Thesis (Doctorate in Vegetal Biology), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 248p.
- Braga, A.C.; Reis, A.M.M.; Leoi, L.T.; Pereira, R.W.; Collevatti, R.G. 2007. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). *Molecular Ecology*, 7, 53-56.
- Cavallari-Neto, M. 2004. Efeito do manejo na diversidade genética de populações naturais de *T. cassinoides* Lam. (DC.), por marcadores isoenzimáticos. Dissertation (Master's Degree in Forest Resources), Universidade de São Paulo (Esalq), Piracicaba, SP. 67p.
- Condit, R.; Ashton P.S.; Baker P.; Bunyavejchewin, S.; Gunatilleke S.; Gunatilleke N.; Hubbell, S.P.; Foster, R.B.; Itoh, A.; LaFrankie, J.V.; Lee, H.S.; Losos, E.; Manokaran, N.; Sukumar, R.; Yamakura, T. 2000. Spatial patterns in the distribution of tropical tree species. *Science*, v. 288, p.1414-1418.
- Diniz- Filho, J.A.F; Telles, M.P.C.; Bonatto, S.L.; Eizirik, E.; Freitas, T.R.O.; Marco Jr, P.; Santos, F.R.; Sole-Cava, A.; Soares, T.N. 2008. Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. *Journal of Biogeography*, v.35, p.753-763.
- Dumolin-Lapegue, S.; Pemonge, M.H.; Petit, R.J. 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology*, v.6, p.393–397.
- Ellstrand, N.C.; Elam, D.R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 24, p. 217-42.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, v.131, p.479-491.

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

Franciso, F.O.; Brito, R.M.; Gonçalves, P.H.P.; Pioker, F.; Domingues-Yamada, C.A.M.T.; Arias, M.C. 2010. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the stingless bee *Plebeiaremot* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps. *Apidologie*, v.32, p.323-332.

Hartl, D.; Clark, A.G. 2010. *Princípios de genética de populações*. Ed Artimed. Porto Alegre, RS, Brasil. 660p

Kageyama, P.; Gandara, F.B. 1994. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira, Anais. Publicação ACIESP v.87, p.01-09.

Levin, D.A. 1981. Dispersal versus gene flow in plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v.68, p.233-253.

McCauley, D. 1995. The use of chloroplast DNA polymorphysm in studies of gene flow in plants. *Tree*, v.10, p.198-202

Pierce, B. A. 2004. *Genética um enfoque conceitual*. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, Brasil. 774p.

Peakall, R.; Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 288-295.

Pretti, V.Q.; Françoso, E.; Sforça, D.A.; Pinheiro, F.; Meyer, D.; Lohmann, L.G. (in prep.) Microsatellite loci for *Tabebuia cassinoides* (Bignoniaceae). *Genetics and Molecular Research*.

Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v.155, p.945-959.

Sebbenn, A.M.; Seoane, C.E.S.; Kageyama, P.Y.; Lacerda, C.M.B. 2001. Estrutura genética em populações de *Tabebuia cassinoides*: implicações para o manejo florestal e a conservação genética. Revista do Instituto Florestal, v.13, p.99-113.

Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. Evolution, v.47, p. 264-279.

Taberlet, P.; Gielly, L.; Pautou, G.; Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology, v.17, p.1105–1109.

Weir, B.S.; Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution, v. 38, p. 1358–1370.

Genetic structure and diversity of the “caxetais” from the Brazilian Atlantic Forest in the light of past environmental changes

Vania Quibao Pretti¹, Fabio Pinheiro², Ana Carolina Carnaval³, Alexandre Rizzo Zuntini¹, Diogo Meyer⁴, Alberto Vicentini⁵, Eric Waltari³ and Lúcia G.Lohmann¹

¹Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 05508-090, São Paulo, SP, Brazil. ²Instituto de Botânica, 04301-012, São Paulo, SP, Brazil. ³Biology Department, City University of New York, 10031, New York, NY, USA. ⁴Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 05508-09, São Paulo, SP, Brazil. ⁵Departamento de Botânica, Instituto de Pesquisas da Amazônia, 69060-001, Manaus, AM, Brazil.

Key words: Atlantic Forest, Phylogeography, *Tabebuia cassinoides*, Historical Gene Flow.

e-mails: vaniapretti@gmail.com, llohmann@usp.br

Abstract

The Atlantic Forest is a biodiversity hotspot and one of the most diverse biomes in the planet. This biome includes a mosaic of different vegetation types that include the Atlantic Forest Nucleus (AFN) and other plant communities that are peripheral to the Atlantic Forest (PVCAF; “Peripheral Vegetation Communities of the Atlantic Forest”), such as the coastal scrubs (*restingas*), montane forests and swamps. Climatic changes during the Quaternary may have impacted differently the species found in the various plant communities encountered in the Atlantic Forest. In the present study, we use data from nuclear microsatellites and sequencing of the trnC-ycf6 region of chloroplast DNA (cpDNA) to assess the genetic structure of *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC., popularly known as “caxeta”, the predominant tree in a PVCAF type known as “caxetais”. In addition, we generated correlative models to simulate species’

distributions under the present climate, the Holocene (6,000 years ago) and the Last Glacial Maximum (21,000 years ago) in order to interpret our molecular results in the light of present and past climates. While our cpDNA data suggest that *T. cassinoides* is divided into three phylogeographical groups (North, Central and South), the nDNA data suggest a division between the North and Central phylogeographical groups exclusively. Climate modeling in association with demographic information indicate that population size and the areas of potential occurrence of *T. cassinoides* were stable during the Last Glacial Maximum (LGM), suggesting that the break in gene flow between the North, Central and South phylogeographical regions occurred prior to the LGM. This pattern converges with results found for other species in the peripheral communities and diverges from those found within the AFN, highlighting the importance of additional studies on the various Atlantic Forest plant communities in order to better understand the processes that shaped the evolution of this complex biome.

Introduction

The Atlantic Forest is a biodiversity hotspot (Myers *et al.* 2000, Murray-Smith *et al.* 2008) and one of the most biodiverse biomes in the planet. Yet, little is still known about the processes that led to such high levels of biodiversity in this region. Studies on the Atlantic Forest tend to approach this biome broadly, without considering the various vegetation types present therein, such as the Submontane Rain Forests, Cloud Rainforests, Riparian Forests, Rainforest Patches and Coastal Swamp Forests (Rizzini 1979). Indeed, the Atlantic Forest can be considered a mosaic of vegetation that includes the Atlantic Forest Nucleus (AFN) and Peripheral Vegetal Communities (PVCAF), such as the coastal scrubs (*restingas*), cloud montane forests and swamp forests (Scarano 2002). However, detailed knowledge on the complex environmental heterogeneity of the Atlantic Forest is still lacking (Scarano 2002, Stehmann *et al.* 2009).

Climate changes that affected the Atlantic Forest region during the Quaternary seem to have directly or indirectly influenced the various communities included in the Atlantic Forest (Ybert *et al.* 2003, Behling *et al.* 2007, Carnaval & Moritz 2008, Barth *et al.* 2011). The potential effect of past climate changes on species distribution patterns can be simulated using Ecological Niche Modeling (ENM) and species distribution models that allow the visualization of possible areas of species occurrence in the past (Kremen *et al.* 2007, Hijmans & Graham 2006). As such, ENMs represent a powerful complement to phylogeographical studies, by offering an objective and spatially explicit means to predict potential species' distribution patterns in the past (Waltari *et al.* 2007). Indeed, several recent phylogeographic studies have greatly benefited from the inclusion of data derived from ENMs (p.ex., Carnaval & Moritz 2008; Carnaval *et al.* 2009; Loiselle *et al.* 2010; Thomé *et al.* 2010).

To date, a series of studies have investigated how climatic changes might have influenced the genetic diversity and structure of taxa found in the Atlantic Forest (Lira *et al.* 2003, Cabanne *et al.* 2007, 2008, Carnaval *et al.* 2009, Palma-Silva *et al.* 2009, Thomé *et al.* 2010, Pinheiro *et al.* 2011, Ribeiro *et al.* 2011, Amaro *et al.* 2012). Most of these studies have focused on the dense ombrophylous forests from the AFNs (Lira *et al.* 2003, Cabanne *et al.* 2007, 2008, Carnaval *et al.* 2009, Palma-Silva *et al.* 2009, Thomé *et al.* 2010, Ribeiro *et al.* 2011), and several of these have shown a recession of this vegetation type into refuge areas in the northern portions of the Atlantic Forest during the Last Glacial Maximum in areas that presented more stable climatic conditions (Graziotin *et al.* 2006, Carnaval *et al.* 2009, Palma-Silva *et al.* 2009). Much less attention has been devoted to organisms from the PVCAF, such as the coastal scrubs (Pinheiro *et al.* 2011) and upper montane forests (Amaro *et al.* 2012). Yet, those studies suggested that montane forests (Amaro *et al.* 2012) and coastal scrubs (Pinheiro *et al.* 2011) were stable during the LGM. The apparent contradiction between the data currently available highlights the importance of additional studies on different

vegetation types of the PVCAFs for a better understanding of the climatic dynamics of the Atlantic Forest as a whole.

Swamp forests (Coastal Hydrophilic Forest sensu Rizzini 1979) represent an important vegetation type of the PVCAFs. These areas are popularly known as “caxetais” (Scarano 1998) as they are predominantly composed of *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC., known locally as “caxeta”. The “caxetais” are low-diversity plant formations distributed along the Atlantic Forest rim from the north of Espírito Santo down to Paraná (Gentry 1992). This vegetation type is quite different from all plant communities of the Atlantic Forest due to the high predominance of *T. cassinoides* (Scarano 1998, Assis 1999). As waterlogged soil is key for the occurrence of *T. cassinoides*, the “caxetais” tend to be aggregated and naturally fragmented across the landscape. Just like the rest of the Atlantic Forest formation, the “caxetais” are also threatened with extinction due to soil drainage and the destruction of swampy environments (Ribeiro *et al.* 2009). Despite the relevance of this peripheral community, this vegetation type remains poorly studied (Rizzini 1979, Ziller 1992, Silva *et al.* 1994, Kolb 1998, Scarano 1998, Assis 1999, Cavallari-Neto 2004).

In this paper, we combined molecular characters (e.g., nuclear microsatellite and cpDNA sequencing) with correlative models of species distributions [present, Holocene (6,000 years ago) and LGM (21,000 BP)] in order to investigate the phylogeographical structure of *T. cassinoides* across its area of distribution and interpret the genetic patterns in the light of past historical climatic events. More specifically, we test the following hypotheses: (1) “caxetais” behaved in the same way as other PVCAFs during the Quaternary climatic oscillations, not suffering any changes to their range of occupation and even expanding during the Last Glacial Maximum (LGM); and (2) “caxetais” behaved in the same way as the AFN during the Quaternary climatic oscillations, suffering retractions during the Last Glacial Maximum (LGM) followed by a re-expansion of the forest cover during the Holocene.

Material and Methods

Population sampling

We sampled 133 individuals from eleven different “caxetais” distributed throughout the Atlantic Forest in five different geographic locations (Table 1). Each set of samples collected within each geographical region is referred to as a population (Table 1). To avoid collecting the same individual more than once, we located possible offshoots and made sure that samples were separated by a minimum of 4m. All vouchers are deposited at the Herbarium from the University of São Paulo (SPF). In the field, leaves were immediately cut into small pieces and placed in individual identification bags containing silica gel. Total genomic DNA was extracted using an Invitex (Invisorb, Spin Plant Mini Kit) extraction kit following the manufacturer’s instructions with slight modifications.

Molecular sampling

Nuclear microsatellite data. We selected eight microsatellite markers out of the 41 markers tested (Supplements Table 1 and 2). Of the eight markers selected, three were originally isolated for *Tabebuia aurea* (Tau 14, Tau 15 and Tau 21) (Braga *et al.* 2007), while five were developed specifically for *T. cassinoides* (Tcass B05, Tcass B11, Tcass E02, Tcass F09 and Tcass H03) (Pretti *et al.* In prep). PCR reactions were prepared following Francisco *et al.* (2010) and amplified using the following amplification conditions: 3 min at 94°C, followed by 35 cycles of 30 sec at 94°C, 1 min at 60°C or 54°C, and 1 min at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C. PCR products were genotyped using an Applied Biosystems 3730 Genetic Analyzer with GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems) as a molecular size standard. Genotyping results were read with GeneMarker 1.85 (SoftGenetics), with visual inspection of the individual peaks.

Chloroplast DNA sequences. Thirteen markers were tested for cpDNA (Supplements Table 3). However, only the trnC-ycf6 (Shaw *et al.* 2005) showed

sufficient levels of variation and was pursued in our study. Fragments of *trnC-ycf6* were amplified using 10 μ l reactions containing 2 μ l of 5X Buffer, 1 μ l of MgCl₂ (25mM), 0.4 μ l of DNTP (10mM), 0.2 μ l of BSA (New England Biolabs, Ipswich, USA), 0.2 μ l of each primer (10 μ M), 0.4 units of GoTaq Hot Start Polymerase (Promega, Maddison, USA) and 0.5 μ l of genomic DNA. Thermocycling conditions were: 1 min at 95°C, followed by 40 cycles of 10 sec at 95°C, 30 sec at 54°C, and 1 min at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C. PCR products were purified using Illustra ExoStar (GE, Buckinghamshire, UK) in a thermocycler, following the manufacturer's instructions with an additional step of 62°C over 15 min to renature the DNA. Sequencing was performed at Macrogen (South Korea) using only the primer *ycf6R*.

Genetic diversity and structure

Nuclear microsatellite data. We created a matrix with the genotyping results and assessed the genetic diversity using allele-frequencies on GeneALEX 6.4 (Peakall & Smouse 2006). Heterozygosity expected (H_e), heterozygosity observed (H_o) and the inbreeding coefficient (F_{is}) (Weir & Cockerham 1984) were obtained with Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Genotyping errors were tested from stuttering, null alleles and short allele dominance using MICRO-CHECKER 2.2.3. (Oosterhout *et al.* 2004). Allelic richness was calculated by dividing the number of alleles found in the population by the total number of individual samples.

F_{st} values were obtained using GeneALEX 6.4 (Peakall & Smouse 2006). Population structure through total and local molecular variance (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992), and the correlation between F_{st} and geographic distance were tested using the same program. In addition, the Bayesian attribution method implemented via Structure 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000) was used to classify the individuals into genetic groups (K) and estimate the proportion of genetic mixing (Q) of each individual. The data was analyzed using different values for K (1-10), without considering any type of complementary information (e.g., origin) in order to determine the most likely number of

groups. The analysis was conducted assuming independent allelic frequencies under the mixture model, with 100,000 burn-in, 50,000 MCMC replicates and 10 interactions for K to ensure statistical stability (Pritchard *et al.* 2000). Simulation results were converted into graphs for visual analysis using Structure Harvester (Earl & von Holdt 2012).

Chloroplast DNA sequences. Chloroplast DNA sequences were aligned in Muscle (Edgar 2004) and put into DNAsp (Librado & Rozas 2009) to assess haplotype diversity. Haplotype networks were constructed with the software Network 4.6.1.0 (Fluxus Technology) using Median-Joining algorithm (Bandelt 1999).

Demography

Possible recent demographic alterations based on excess heterozygosity were tested using the coalescent focus implemented in BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet & Luikart 1996). Since reductions in the effective population size are related to lower numbers of alleles, these tests are able to detect recent and pronounced reduction in effective population size and in heterozygosity (Piry *et al.* 1999). The analysis was conducted using the two-phased mutation model – TPM, known as the most adequate model for microsatellite evolution (Dirienzo *et al.* 1994) in a total of 10,000 simulations, as suggested by Piry *et al.* (1999) for microsatellite data, with 95% contribution of the stepwise mutation model and 5% of multiple-step mutations, for which mutation size variation was 12, as suggested in the user manual.

Geographic distribution modeling

We used current and past (Holocene Optimum, HO and Last Glacial Maximum, LGM) monthly climate data at 2.5' (4 km) for the modeling component of this project. Holocene Optimum (6k YBP) and Last Glacial Maximum (21k YBP) data are based upon the ECHAM general circulation model simulation (Deutsches Klimarechenzentrum Modellbetreuungsgruppe 1992). Distribution models for the

present and past were based on the bioclimatic variables from the WorldClim data set (Hijmans *et al.* 2005). These variables represent summaries of means and variation in temperature and precipitation, and characterize dimensions of climate considered particularly relevant to determine species distributions. Simulations for Holocene Optimum (HO) take into consideration possible marine oscillations caused by a 3.5-meter rise at sea level (as suggested by Martin *et al.* 1979, 1984, Angulo & Lessa 1997, Angulo *et al.* 1999 apud Ybert *et al.* 2003) (Figure 2D).

Models were masked to the Brazilian Atlantic rainforest, bounded by 57° W, 35° W, 33° S, and 3° S. For inputted locality data, we collated 88 georeferenced occurrence records, resulting in 13 unique locations. We used Maxent 3.3.3k (Phillips *et al.* 2006, Phillips & Dudik 2008) to construct distribution models. Maxent generates models using only presence records, contrasting them with pseudo-absence or background data resampled from the remainder of the study area. In each case, we developed present-day models and then projected them to HO and LGM conditions. We modeled averages of five replicates using the “crossvalidate” option, selecting an “equal training sensitivity and specificity” threshold to determine suitable habitats.

Results

Genetic diversity and structure

Low biodiversity values were found for *T. cassinoides* (Table 2). The number of alleles per locus varied between 3 (locus 4) and 11 (locus 1 and 6), and allelic richness per population varied from 2.4095 to 4.4464 (Table 2). Locus 5 is fixed for the Paraná population (1), while locus 4 is fixed in the Espírito Santo population (5). Heterozygosity observed (H_o) and heterozygosity expected (H_e) per population varied from 0.52604 to 0.25672, and from 0.58832 to 0.34898, respectively (Table 2). Hardy-Weinberg Equilibrium (EHW) deviations were identified due to excess heterozygosity (locus 2, populations ES and RJ) and deficit heterozygosity (locus 7, populations ES and RJ, and Locus 1, population SP-Ig). AMOVA calculations showed that 61% of the total

genetic diversity of *T.cassinoides* is located within populations, while 39% of the total genetic diversity is located between populations. Fis values for each population are presented in Table 2.

Fst values were obtained for each population pair based on nuclear microsatellite results. Fst values ranged from 0.053 to 0.283 (Table 3). Fst values were correlated with the geographic distance between populations, showing a linear relationship between these two variables with values of $P = 0.04$ and $R^2 = 0.7819$ (Figure 1), suggesting isolation through distance.

The results of simulations performed in Structure consistently identified $K = 2$ groupings. The proportion of Q mixture for each individual is shown in Figure 2C.

Only four haplotypes based on cpDNA were found for *T. cassinoides*. These haplotypes were distributed in a highly structured way, with three clear divisions across the sampled area (Figures 3A-B). While the haplotype H4 was exclusive to the ES population (5), haplotypes H2 and H3 were exclusive to the RJ population (4), and haplotype H1 was shared between the SP-Ca (3), SP-Ig (2) and PR (1) populations.

Demography

The results obtained through the Wilcoxon signed-rank test run through BOTTLENECK did not reveal any significant TPM values, with p varying from 0.089 to 0.240 (Table 4), and indicating that none of the five populations suffered a strong recent population decline.

Geographic distribution models

The results obtained through ecological niche modeling indicate stability in the areas of possible occurrence of *T. cassinoides* during the Last Glacial Maximum (LGM) and 6.000 years ago (HO), when compared with the species' present distribution along the coastal plains. Both simulations suggest a restriction in distribution between the north of São Paulo and southern Rio de Janeiro (Figures 2 A and D). The simulation for

the rise in sea-level 6.000 years ago (HO) did not reveal any possible rupture between *T. cassinoides* populations due to variations in this environmental factor.

Discussion

In this study, we combined genetic molecular data with past distribution modeling, and demographic variations to understand the genetic structure of the species *T. cassinoides*, the most representative species in “caxetal,” a peripheral phytophysiology of the Atlantic forest. Inferences were made to understand the role of the past climatic oscillations and marine fluctuation from the Pleistocene (LGM and HO) in the phylogeographic pattern of this species.

Our demographic analyses and past climatic modeling suggest stability in population sizes in areas of possible occurrence of *T. cassinoides* during the LGM and HO, following the pattern detected for other taxa from peripheral communities (Pineiro *et al.* 2011, Amaro *et al.* 2012).

Relationship between populations

Nuclear DNA-based F_{st} values obtained from comparisons between each population pair shows extensive genetic differentiation between populations, especially between those located at the extremes of the species' distribution ranges. In particular, a high genetic differentiation was observed between the ES (5) population and the others (Table 3). The lowest genetic differentiation was between the PR (1) and SP-Ig (2) populations, with values being considerably lower than those found in any other neighboring population pairs. A significant correlation was observed between genetic distance (F_{st}) and geographical distance ($p = 0.04$ and $R^2 = 0.7819$) using the Mantel test, suggesting isolation through distance (Wright 1943).

The highest number of alleles (including exclusive alleles) were found in the state of Rio de Janeiro suggesting that this region represents the center of genetic diversity of *T. cassinoides* (Table 2). The identification of two distinct cpDNA

haplotypes for that same region (Figures 2A and B) corroborates this hypothesis. This result is in agreement with result from *Vriesea gigantea*, those of which have also identified the state of Rio de Janeiro as a center of genetic and taxonomic diversity (Palma-Silva *et al.* 2009).

Relationship between genetic diversity and the north-south latitudinal gradient of the Atlantic forest

No relationship was found between the genetic diversity of *T. cassinoides* and the north-south latitudinal gradient of the Atlantic Forest. While these results are in agreement with data from *Epidendrum fulgens* (Orchidaceae; Pinheiro *et al.* 2011), a strong relationship was detected between genetic diversity of and latitudinal gradient in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae; Palma-Silva *et al.* 2009). The association between genetic diversity and Atlantic Forest latitude is connected with the idea that the forest may have expanded towards the south after the last glacial maximum, with populations located at more northern latitudes of the forest being genetically more diverse than those further south (Carnaval *et al.* 2009). The lack of a reduction in genetic diversity of *T. cassinoides* on the north-south latitudinal gradient represents further evidence that the peripheral communities possess population dynamics that are distinct from the communities from the Atlantic Forest Nucleus (AFN). Our data showed a slightly lower genetic diversity of *T. cassinoides* in populations located at the limit of its distribution range

Phylogeographic regions

Our climatic modeling maps indicated a region of possible rupture in the geographic distribution of *T. cassinoides* between the northern portion of the state of São Paulo and southern portions of the state of Rio de Janeiro during the last glacial maximum (LGM) and during the last 6.000 years (HO) (Figure 2A and D). This break in geographic distribution coincides with the genetic structure identified through Bayesian

analyses of the nuclear microsatellite data obtained with STRUCTURE, as well as with one of the separations proposed by the haplotype network constructed from cpDNA (Figures 2A, B, C and D). The similarity between these results suggests a historical genetic rupture of the species in this region that is likely associated with the difficulties encountered by gene flow via seed and pollen. Niche modeling did not indicate retraction in possible areas of occurrence of *T. cassinoides* during the periods simulated: the Last Glacial Maximum (LGM, 21.000 years ago) and the Mid-Holocene (HO, 6.000 years ago). On Mid-Holocene simulations our analyses did not show any significant reduction in species occurrence, even when a 3.5-meter rise at sea level was factored in (Martin *et al.* 1979, 1984, Angulo & Lessa 1997, Angulo *et al.* 1999 apud Ybert *et al.* 2003). These results were corroborated by data obtained via BOTTLENECK, which also did not encounter any evidence of a brusque or recent reduction in effective populational size for *T. cassinoides*. Furthermore, the presence of exclusive alleles in each population and high F_{st} values strongly suggest that these populations have been separated for a long time, as observed in other organisms (e.g., Burton 1997, Antunes *et al.* 2006, Jakob *et al.* 2009).

The results from our cpDNA analysis suggest that *T. cassinoides* is divided into three phylogeographical groups: North [ES (5)], Central [RJ (4)] and South [SP-Ca (3), SP-Ig (2) and PR (1)]. Nuclear DNA data, on the other hand, considers the North and Central phylogeographical groups as a single unit (Figures 2A and B). This result suggests that gene flow via pollen between the RJ (4) population and the ES (5) population was greater than gene flow via seed. Alternatively, it is also possible that this pattern may simply have resulted from a higher degree of ancestral polymorphism shared by the nDNA in this region.

Phylogeographical break patterns found for *T. cassinoides* coincide with some patterns found for plant species from the Atlantic Forest nucleus (Palma-Silva *et al.* 2009, Ribeiro *et al.* 2011). However, most phylogeographical studies on plants have attributed these genetic ruptures throughout species' ranges to climatic changes that

occurred during the LGM, without estimating the duration of these events. Here, we propose that the phylogeographical patterns identified for *T. cassinoides* are associated with historical ruptures in gene flow due to the presence of geographical barriers that pre-date the LGM. The genetic ruptures based on cpDNA and nuclear DNA that originated the South phylogeographical group [Populations SP-Ca (3), SP-Ig (2) and PR (1)] are likely associated with the presence of the Bocaina Mountains and other formations in the Serra do Mar mountain range, which comes very close to the Atlantic coast between the northern portion of São Paulo and the southern portion of Rio de Janeiro (Almeida & Carneiro 1998). As such, it is possible that this region may have been left without the extensive plains and areas of coastal scrub in which *T. cassinoides* tends to occur. This same region was also identified as an important gene-flow barrier to *Vriesea gigantea*, a species from the AFN (Palma-Silva *et al.* 2009).

Our cpDNA data also suggests a possible genetic rupture between the RJ (4) and ES (5) populations, which may have been caused by the presence of the Rio Doce valley, another geographic gene-flow barrier to Atlantic Forest taxa (Lira *et al.* 2003, Ramos *et al.* 2009, Ribeiro *et al.* 2011). It is worth noting though that a great geographic distance separates these two populations and that the lack of sampled populations between those areas prevents a precise identification of where exactly this gene-flow rupture occurred. Unfortunately, the geographically intermediate populations have suffered from extreme anthropogenic intervention and massive degradation of the region's coastal plains (Ribeiro *et al.* 2009), preventing collections of *T. cassinoides* in this region (Figure 2E). This impact might lead to genetic signature loss making it impossible to record the historical processes affecting species' demographics (Carnaval *et al.* 2009).

Final remarks and future directions

Our results suggest that climatic oscillations that took place during the Last Glacial Maximum (21,000 years BP) did not directly influence the population structure of *T. cassinoides*. Instead, gene-flow ruptures that seem to have structured the populations of *T. cassinoides* in two (according to nDNA data) or three (according to cpDNA data) large phylogeographical groups are thought to pre-date the LGM. The presence of exclusive alleles in each population, in combination with the presence of fixed alleles in populations located at the extremes of the distribution range of *T. cassinoides* and the high values for inter-population genetic variability and F_{st} indicate that all sampled populations have been separated for a very long time, even when the populations located in the SOUTH phylogeographical group are considered [SP-Ca (3), SP-Ig (2) and PR (1)]. Overall, these results support the hypothesis that species from the PVCAF did not suffer demographic alterations as intense as those that occurred among species associated with the AFN during the Last Glacial Maximum.

This paper also shows the importance of phylogeographical studies on the various vegetation types that comprise the Atlantic Forest mosaic. Studies of this nature are critical for a better understanding of the effect of Quaternary climatic changes on the genetic structure of taxa of this complex biome.

Tables

Table 1. Geographic coordinates of the sampled populations. The presence of more than one set of geographical coordinates per region indicates the locations of the different “caxetais” included in that population. The number of correspondence between the geographical region and the Structure graph is given in brackets. SN represents the number of sampled individuals per locality.

População	Latitude	Longitude	SN
PR(1)	-25.5098	-48.8146	09
PR(1)	-25.6718	-48.5153	16
Ig-SP(2)	-24.5776	-47.5512	29
Ca-SP(3)	-23.5725	-45.3047	19
RJ(4)	-22.5568	-42.2992	11
RJ(4)	-22.6529	-42.4897	05
RJ(4)	-22.6501	-42.4869	05
RJ(4)	-22.5101	-42.2882	03
ES(5)	-18.9954	-40.0033	12
ES(5)	-19.1532	-39.9307	19
ES(5)	-19.1062	-39.9118	05

Table 2. Genetic variability of populations of *Tabebuia cassinoides*. NAP = number of alleles in the population (NAP); TNA = total number of alleles; PA = number of private alleles; He = heterozygosity expected; Ho = heterozygosity observed; AR = allelic richness (AR); Fis = inbreeding coefficient.

Population/Region	NAP/TNA	PA	He	Ho	AR	Fis
PR (1)	20/58	03	0.35254	0.35429	0.80	-0.0050
Ig-SP (2)	24/58	02	0.34898	0.25672	0.77	0.1235
Ca-SP (3)	25/58	03	0.40452	0.41561	1.04	-0.0032
RJ (4)	39/58	12	0.58832	0.52604	1.62	0.1079
ES (5)	24/58	06	0.42131	0.45461	0.61	-0.1251

Table 3. Fst values obtained through the pair-by-pair comparison of populations (below diagonal) and the geographical distance between populations, in km (above diagonal).

	PR	Ig-SP	Ca-SP	RJ	ES
PR	*	162	412	696	1160
Ig-SP	0.053	*	250	534	997
Ca-SP	0.064	0.106	*	284	748
RJ	0.167	0.172	0.158	*	464
ES	0.277	0.283	0.253	0.176	*

Table 4. Probability tests for the reduction of population size of *T. cassinoides* based on multi-locus nuclear genotype estimates. The “Wilcoxon signed rank” test was conducted with a two-phased mutational model (TPM) to test for excess heterozygosity.

Population	TPM
Paraná (1)	0.40548 (p=0,089)
Iguape-SP (2)	0.29848 (p=0,093)
Caraguatatuba-SP (3)	0.2251 (p=0,119)
Rio de Janeiro (4)	0.2043 (p=0,094)
Espirito Santo (5)	0.36716 (p=0,240)

Figures

Figure 1. Relationship between genetic distribution (Fst values) and geographic distance in Km.

Figure 2. Distribution models describing available habitat predictions for *T.cassinoides*: (A) Last Glacial Maximum (21.000 years ago), (D) Holocene Optimum (6.000 years ago) and (E) Present-day remnants of Atlantic Forest. Red spots indicate the collection sites for the samples used in the simulations. In (A), the colored balls on the map indicate the haplotype of the region based on the haplotype network constructed with cpDNA (B). Arrows connect the geographical regions to the results for genetic structure in the populations as ascertained from nDNA using the Structure (C).

References

- Almeida FFM, Carneiro CR (1998) Origem e evolução da serra do mar. *Revista Brasileira de Geociências*, **28**, 135-150.
- Amaro RC, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y, Carnaval AC (2012) Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **62**, 880-888.
- Antunes A, Faria R, Johnson WE, Guyomard R, Alexandrino P (2006) Life on the edge: the long-term persistence and contrasting special genetic structure of distinct brown trout life histories at their ecological limits. *Journal of Heredity*, **07**, 193-205.
- Assis MA (1999) Florística e caracterização das comunidades vegetais da planície costeira de Picinguaba, Ubatuba, SP. Ph.D. Dissertation, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brazil, 248pp.
- Barth OM, Barreto, C F, Vilela, CG, Baptista-Neto, JA (2011) Pollen Analysis Revealing the Paleoenvironment of a 3520 years B.P. old Sediment in the Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Anuário do Instituto de Geociências-UFRJ*, **34**, 9-13.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-Joining for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.
- Behling H, Dupont L, Safford HF, Wefer G (2007) Late Quaternary vegetation and climate dynamics in the Serra da Bocaina, southeastern Brazil. *Quaternary International*, **161**, 22-31.
- Braga AC, Reis AMM, Leoi LT, Pereira RW, Collevatti RG (2007) Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). *Molecular Ecology*, **7**, 53-56.
- Burton RS (1997) Genetic evidence for long-term persistence of marine invertebrate populations in an ephemeral environment. *Evolution*, **51**, 993-998

- Cabanne GS, Santos FR, Miyaki CY (2007) Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, **91**, 73-84.
- Cabanne GA, d'Horta FM, Sari EHR, Santos FR, Miyaki CY (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **49**, 760–773.
- Carnaval AC, Moritz C (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, **35**, 1187-1201.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, **323**, 785-789.
- Cavallari-Neto M (2004) Efeito do manejo na diversidade genética de populações naturais de *T. cassinoides* Lam. (DC.), por marcadores isoenzimáticos. Ms. Thesis, Universidade de São Paulo (Esalq), Piracicaba, São Paulo, Brazil, 67pp.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottle- necks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001-2014.
- Deutsches Klimarechenzentrum Modellbetreuungsgruppe (1992) The ECHAM3 atmospheric general circulation model. *Deutsches Klimarechenzentrum Tech. Report*, **6**, 1-184.
- Direnzo A, Perterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatikin M, Freimer NB (1994) Mutational process of simple sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **91**, 3166-3170.
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, **4**, 359-361.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Research*, **32**, 1792–1797.

- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite v. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 564-567.
- Franciso FO, Brito RM, Gonçalves PHP, Pioker F, Domingues-Yamada CAMT, Arias MC (2010) Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the stingless bee *Plebeiaremot* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps. *Apidologie*, **32**, 323-332.
- Gentry AH (1992). Flora Neotropica, Monograph 25 (II), Bignoniaceae Part II (Tribo Tecomeae). New York, NY, USA. 370p.
- Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S, Bonato SL (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, **15**, 3969-3982.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, **25**, 1965-1978.
- Hijmans RJ, Graham CH (2006) The ability of climate envelope models to predict the effect of climate change on species distributions. *Global Change Biology*, **12**, 1–10.
- Jakob SS, Martinez-Meyer E, Blattner FR (2009) Phylogeographic analyses and paleodistribution modelling indicate Pleistocene *in situ* survival of *Hordeum* species (Poaceae) in southern Patagonia without genetic or special restriction. *Molecular Biology and Evolution*, **26**, 907-923.
- Kolb RB (1998) Respostas Metabólicas e morfoanatômicas de sementes e plantas de *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC. (Bignoniaceae) à hipóxia. Ms Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil, 86pp.

- Kremen C, Cameron A, Moilanen A, Phillips SJ, Thomas CD, Beentje H, Dransfield J, Fisher BL, Glaw F, Good TC, Harper GJ, Hijmans RJ, Lees DC, Louis E, Jr Nussbaum RA, Raxworthy CJ, Razafimpahanana A, Schatz GE, Vences M, Vieites DR, Wright PC, Zihra ML (2007) Aligning conservation priorities across taxa in Madagascar with high-resolution planning tools. *Science*, **320**, 222–226.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451–1452.
- Lira CF, Cardoso SRS, Ferreira PCG, Cardoso MA, Provan J (2003) Long term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Molecular Ecology*, **12**, 3219–3225.
- Loiselle BA, Graham CH, Goerck JM, Ribeiro MC (2010) Assessing the impact of deforestation and climate change on the range size and environmental niche of bird species in the Atlantic forest, Brazil. *Journal of Biogeography*, **37**, 1288–1301.
- Murray-Smith C, Brummitt NA, Oliveira-Filho AT, Bachman S, Moat J, Lughadha EMN, Lucas EJ (2008) Plant Diversity Hotspots in the Atlantic Coastal Forests of Brazil. *Conservation Biology*, **23**, 151–163.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853–858.
- Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbara T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2009) Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity*, **103**, 503–512.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288–295.
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE (2006) Maximum entropy modelling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, **190**, 231–259.

- Phillips SJ, Dudik M (2008) Modelling of species distributions with Maxent: New extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*, **31**, 161-175.
- Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Fay MF, Lexer C, Cozzolino S (2011) Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography*, **38**, 1923-1935.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**, 502-503.
- Pretti VQ, Françoso E, Sforça DA, Pinheiro F, Meyer D, Lohmann LG (in prep.) Microsatellite loci for *Tabebuia cassinoides* (Bignoniaceae). *Genetics Molecular Research*.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Ramos ACS, Lemos-Filho JP, Lovat MB (2009) Phylogeographical structure of the Forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinoideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. *Journal of Heredity*, **100**, 206-216.
- Ribeiro C R, Metzger JP, Martensen A C, Ponzoni FJ, Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, **142**, 1141-1153.
- Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Ramos ACS, Lovato MB (2011) Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, **106**, 46–57.
- Rizzini CT (1979) Tratado de fitogeografia do Brasil – Aspectos sociol3gicos e flor3sticos. Ed. Universidade de S3o Paulo. S3o Paulo, Brazil. 375p.

- Scarano FR (2002) Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic Rainforest. *Annals of Botany*, **90**, 517-524.
- Scarano FR, Rios RI, Esteves FA (1998) Tree species richness, diversity and flooding regime: case studies of recuperation after anthropic impact in Brazilian flood-prone forest. *International Journal of Ecology and Environmental Sciences*, **24**, 223-235.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, **92**, 142-166.
- Silva SM, Britez RM, Souza SW, Joly AC (1994) Fitossociologia do componente arbóreo da floresta de Restinga da Ilha do Mel, Paranaguá, PR. III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira, Anais. Publicação ACIESP, **3**, 33-48.
- Stehmann JR, Forzza RC, Salino A, Sobral M, Costa DP, Kamino LHY (editores) (2009) Plantas da Floresta Atlântica. Ed. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 516p.
- Thomé MT, Zamudio KR, Giovanelli JGR, Haddad CFB, Baldissera-Jr FA, Alexandrino J (2010) Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **55**, 1018-1031.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- Waltari E, Hijmans RJ, Peterson A, Nyári AS, Perkins SL, Guralnick RP (2007). Locating Pleistocene refugia: comparing phylogeographic and ecological niche model predictions. *PLoS ONE*, **2**, e563.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, **28**, 114-138.
- Ybert JP, Bissa WM, Catharino LME, Kurtner M (2003) Environmental and sea-level variations on the southeastern Brazilian coast during the Late Holocene with

comments on prehistoric human occupation. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **189**, 11-24.

Ziller SR (1992) Análise fitossociológica de caxetais. Ms. Thesis, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil, 101pp.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo caracterizou a diversidade genética inter e intra-populacional da espécie *Tabebuia cassinoides* ao longo de sua área de distribuição. Em particular, buscamos verificar como a sua distribuição geográfica agregada, bem delimitada e fragmentada na paisagem, poderia gerar uma estruturação da diversidade genética em nível local; e como as oscilações climáticas e transgressões marinhas, ocorridas no Último Máximo Glacial (Last Glacial Maximum – LGM), poderiam ter influenciado o padrão filogeográfico da espécie ao longo de toda sua área de distribuição.

Para responder as questões propostas nessa tese, utilizamos marcadores moleculares de regiões nucleares de microssatélites e o seqüenciamento da região trnC-ycf6 do DNA plastidial (Shaw et al. 2005) para acessar a variabilidade genética da espécie. Inicialmente testamos os marcadores nucleares PPR-AT5 (Yuan et al. 2010) e ncpGS (Emshwiller e Doyle 1999), os quais somaram mais de 1800pb mas não apresentaram nenhum sítio informativo. Em seguida, testamos 20 pares de “primers” desenvolvidos para *Tabebuia aurea* (Braga et al. 2007), desses somente 3 se mostraram polimórficos, gerando a necessidade de construirmos uma biblioteca de microssatélites específica para *T. cassinoides*. O desenvolvimento dessa biblioteca resultou na síntese de 19 pares de iniciadores (do inglês “primers”) dos quais 15 apresentaram sucesso na amplificação e 5 foram polimórficos. Para estudos de genética populacional em plantas, análises mistas do genoma nuclear e do genoma de cloroplasto, com seus diferentes modelos de herança são muito importantes para um melhor entendimento de suas histórias evolutivas, provendo informações sobre a relativa importância do fluxo gênico ocorrido via dispersão de pólen ou sementes (McCauley 1995; Schall et al. 1998; Collevatti 2000, Collevatti et al. 2012; Tuchetto-Zolet et al. 2012). Sendo assim, 13 marcadores de DNA plastidial foram testados dos quais somente o trnC-ycf6 (Shaw et al. 2005) apresentou uma quantidade suficiente

de sítios informativos, levando a um total de quatro haplótipos diferentes obtidos através do programa DNAsp (Librado e Rozas 2009).

De uma forma geral, nossos resultados sugerem que localmente a fragmentação das populações de *T. cassinoides* é somente geográfica devido a suas necessidades edáficas, e que o modo de distribuição agregada e naturalmente fragmentada não indica a subdivisão genética das populações. Essa ausência de estruturação populacional foi inferida com análises de diversidade genética que indicaram que mais de 95% da variabilidade é compartilhada entre os “caxetais” em uma escala local, e utilizando o método bayesiano de atribuição de grupos a genótipos, implementado no programa Structure. Em escala local, não encontramos variação para o marcador plastidial nos três “caxetais” na região de Iguape, resultado esperado para um estudo nessa escala devido as características da molécula de cpDNA, haplóide e tipicamente não recombinante, com taxas de polimorfismo em geral muito baixas para estudos em níveis intra-específicos (Taberlet et al. 1991; Dumolin-Lapegue et al. 1997; McCauley 1995).

Com base nesses dados, um conjunto de “caxetais” co-ocorrentes numa escala local foram considerados como a mesma população genética, permitindo que populações amostradas ao longo de toda a escala de distribuição da espécie, pudessem ser compostas por diferentes números de “caxetais” nas diferentes localidades de coleta, de acordo com a ocorrência desses “caxetais” na região e a possibilidade de acesso a essa vegetação.

Em termos da variação geográfica total da espécie, detectamos uma forte estruturação genética, parcialmente distinta entre as análises de DNA nuclear e plastidial (vide capítulo 3). Nossos resultados sobre a diversidade genética da espécie *T. cassinoides* indicam o estado do Rio de Janeiro como provável centro de diversidade da espécie, devido ao maior número de alelos encontrados, maior número de alelos exclusivos para marcadores de microssatélites nuclear, e também devido a

presença de dois haplótipos exclusivos de cpDNA num total de quatro encontrados para toda a distribuição da espécie.

Neste estudo também observamos uma tendência de redução na diversidade genética de *T. cassinoides* nas populações localizadas em seus extremos de distribuição. Embora não exista um mapeamento da posição geográfica específica das áreas de “caxetais”, foi possível constatar a diminuição da ocorrência, o aumento da distância, e a redução da densidade populacional dos “caxetais” nas áreas limite da sua distribuição geográfica. Com base nesse conjunto de evidências é razoável supor que *T. cassinoides* se encaixe no modelo de “centro de abundância” observado para a maior parte das espécies que já tiveram sua estrutura genética determinada (Eckert et al. 2008). Porém, um mapeamento das áreas de ocorrência dos “caxetais” existentes é necessário para que possamos confirmar essa informação. Além disso, devido ao alto grau de degradação dos ambientes de ocorrência da espécie, torna-se difícil realizar um mapeamento das suas reais áreas de ocorrência ao longo de toda sua de distribuição, em especial no estado do Rio de Janeiro, onde a degradação dos ambientes de ocorrência da espécie é extrema devido a fatores antrópicos (Figuras 1A e B). Esse fato pode também levar a perda da assinatura genética da espécie, conforme apresentado no capítulo 3. Uma forte estruturação genética foi encontrada para os dados de DNA nuclear e plastidial, apesar de padrões parcialmente distintos terem sido detectados para cada fonte de dados. Enquanto os resultados da análise de cpDNA, sugerem que a espécie *T. cassinoides* está dividida em três grupos filogeográficos (Norte, Central e Sul), os resultados de DNA nuclear apenas se diferenciam dos anteriores por considerar os grupos filogeográficos Norte e Central como um único grupo. Os dados de modelagem de nicho ecológico gerados para os últimos 21.000 anos (Last Glacial Maximum – LGM) e 6.000 anos (Holocene Optimum – HO)

Figura 1. A e B. “Caxetais” degradados.

associados com análises demográficas gerados no programa Bottleneck sugerem a estabilidade do tamanho populacional e das possíveis áreas de ocorrência de *T.cassinoides* nesses períodos. Assim, aventamos a hipótese de que a quebra de fluxo gênico entre as regiões filogeográficas propostas no presente estudo sejam anteriores ao LGM. Esse padrão converge com resultados encontrados para outras espécies de comunidades vegetais periféricas e diverge daqueles encontrados para espécies do núcleo principal da Floresta Ombrófila Densa.

Este trabalho salienta a importância de novos estudos filogeográficos com espécies de diferentes comunidades vegetais que compõe a Floresta Atlântica para o melhor entendimento dos processos que moldaram a evolução desse complexo bioma.

Bibliografia

Braga, A.C.; Reis, A.M.M.; Leoi, L.T.; Pereira, R.W.; Collevatti, R.G. 2007. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). *Molecular Ecology*, v.7, p.53-56.

Colevatti, R.G. 2000. Variabilidade genética em *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae): estrutura genética, sistemas de cruzamento, filogeografia e subsídios para a conservação. Tese (Doutorado em Ecologia), Universidade de Brasília, Brasília, DF. 140p.

Collevatti, R.G.; Castro, T.G.; Lima, J.S.; Telles, M.P.C. 2012. Phylogeography of *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae), an endangered tree species from rocky savannas, suggests bidirectional expansion due to climate cooling in the Pleistocene. *Ecology and Evolution*, v.2, p.1024-1035.

Dumolin-Lapegue, S.; Pemonge, M.H.; Petit, R.J. 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology*, v.6, p.393–397.

Emshwiller, E.; Doyle, J.J. 1999. Chloroplast-expressed glutamine synthetase (npsGS): potential utility for phylogenetic studies with an example from *Oxalis* (Oxalidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.12, p.310–319.

Eckert, C.G.; Samis, K.E.; Loughheed, S.C. 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, v.17, p.1170-1188.

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

McCauley, D. 1995. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Tree*, v.10, p.198-202.

Schaal, B.A.; Hayworth, D.A.; Olsen, K.M.; Rauscher, J.T.; Smith, W.A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, v.7, p.465-474.

Shaw, J.; Lickey, E.B.; Beck, J.T.; Farmer, S.B.; Liu, W.; Miller, J.; Siripun, K.C.; Winder, C.T.; Schilling, E.E.; Small, R.L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, v.92, p.142-166.

Taberlet, P.; Gielly, L.; Pautou, G.; Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, v.17, p.1105–1109.

Turchetto-Zolet, A.C.; Cruz, F.; Vendramin, G.G.; Simon, M.F.; Salgueiro, F.; Margis-Pinheiro, M.; Margis, R. 2012. Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.65, p.174-182.

Yuan, Y.W.; Liu, C.; Marx, H.E.; Olmstead, R.G. 2010. An empirical demonstration of using pentatricopeptide repeat (PPR) genes as plant phylogenetic tools: phylogeny of Verbenaceae and the Verbena complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.54, p.23–35.

Suplementos

Table 1: Nuclear microsatellite markers tested

Primers	references	amplification results	genotyping results
Tau 07	Braga et al., 2007	Negative	unrealized
Tau 08	Braga et al., 2007	Negative	unrealized
Tau 09	Braga et al., 2007	Negative	unrealized
Tau 10	Braga et al., 2007	Negative	unrealized
Tau 13	Braga et al., 2007	Positive	unreliable
Tau 14	Braga et al., 2007	Positive	polymorphic
Tau 15	Braga et al., 2007	Positive	polymorphic
Tau 16	Braga et al., 2007	Negative	unrealized
Tau 17	Braga et al., 2007	Positive	monomorphic
Tau 18	Braga et al., 2007	Negative	unreliable
Tau 19	Braga et al., 2007	Negative	unreliable
Tau 20	Braga et al., 2007	Negative	unreliable
Tau 21	Braga et al., 2007	Positive	polymorphic
Tau 22	Braga et al., 2007	Positive	unreliable
Tau 23	Braga et al., 2007	Negative	unrealized
Tau 24	Braga et al., 2007	Negative	unrealized
Tau 27	Braga et al., 2007	Positive	unreliable
Tau 28	Braga et al., 2007	Negative	unrealized
Tau 30	Braga et al., 2007	Negative	unrealized
Tau 31	Braga et al., 2007	Negative	unrealized
Tcass A12	Pretti et al., In prep.	Positive	unreliable
Tcass B5	Pretti et al., In prep.	Positive	polymorphic
Tcass B10	Pretti et al., In prep.	Positive	monomorphic
Tcass B11	Pretti et al., In prep.	Positive	polymorphic
Tcass C1	Pretti et al., In prep.	Positive	unreliable
Tcass C3	Pretti et al., In prep.	Nonspecific	unrealized
Tcass C4	Pretti et al., In prep.	Positive	null alleles
Tcass D7	Pretti et al., In prep.	Negative	unrealized
Tcass D8	Pretti et al., In prep.	Positive	unreliable
Tcass E2	Pretti et al., In prep.	Positive	polymorphic
Tcass E12	Pretti et al., In prep.	Positive	unreliable
Tcass F2	Pretti et al., In prep.	Positive	unreliable
Tcass F5	Pretti et al., In prep.	Negative	unrealized
Tcass F6	Pretti et al., In prep.	Negative	unrealized
Tcass F9	Pretti et al., In prep.	Positive	polymorphic
Tcass G5	Pretti et al., In prep.	Positive	null alleles
Tcass G8	Pretti et al., In prep.	Positive	null alleles
Tcass G10	Pretti et al., In prep.	Positive	unreliable
Tcass H3	Pretti et al., In prep.	Positive	polymorphic

Table 2: Nuclear markers tested

Marker	References	Sequences	Size	Inf. characters
PPR AT5	(Yuan et al., 2010)	8	1151	0
ncpGS	(Emshwiller e Doyle, 1999)	6	667	0

Table3: Plastid markers tested

Marker	References	Sequences	Size	Inf. characters	Haplotypes	Status
trnC-ycf6	Shaw et al. 2005	8	800	7	4	Good
rpl32-trnL	Shaw et al, 2007	8	1100	4	3	LV
trnD-trnT	Shaw et al, 2005	8	900	0	1	NV
ycf6-psbM	Shaw et al. 2005	8	800	4	2	DS+LV
ndhJ-trnF	Shaw et al, 2007	8	1000	1	2	DS+LV
rps16-trnK	Shaw et al, 2007	8	1000	2	2	DS+LV
trnfM-trnS	Shaw et al, 2005	8	900	0	1	DS + NV
psbM-trnD	Shaw et al, 2005	8	700	0	1	Diffiucult sequencing
rps4-trnT	Shaw et al, 2005	-	-	-	-	Difficult amplification
trnT-trnL	Shaw et al, 2005	-	-	-	-	Difficult amplification
atpI-atpH	Shaw et al, 2007	-	-	-	-	Difficult amplification
psbA-trnH	Shaw et al, 2005	-	-	-	-	Difficult amplification
rpl16	Jordan et at., 1996	-	-	-	-	Difficult amplification

Bibliografia

Braga, A.C.; Reis, A.M.M.; Leoi, L.T.; Pereira, R.W.; Collevatti, R.G. 2007. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). *Molecular Ecology*, v.7, p.53-56.

Emshwiller, E.; Doyle, J.J. 1999. Chloroplast-expressed glutamine synthetase (ncpGS): potential utility for phylogenetic studies with an example from *Oxalis* (Oxalidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.12, p.310–319.

Jordan, W. C.; Courtney, M. W.; Neigel, J. E. 1996. Low levelsof intraspecific genetic variation at a rapidly evolving chloroplastDNA locus in North American duckweeds (Lemnaceae). *American Journal of Botany*, v.83, p.430-439.

Pretti VQ, Françoso E, Sforça DA, Pinheiro F, Meyer D, Lohmann LG (in prep.) Microsatellite loci for *Tabebuia cassinoides* (Bignoniaceae). *Genetics and Molecular Research*.

Shaw, J.; Lickey, E.B.; Beck, J.T.; Farmer, S.B.; Liu, W.; Miller, J.; Siripun, K.C.; Winder, C.T.; Schilling, E.E.; Small, R.L. 2005.The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, v.92, p.142-166.

Shaw, J.; Lickey, E.B.; Schilling, E.E.; SMALL, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetics studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, v.94, p.275-288.

Yuan, Y.W.; Liu, C.; Marx, H.E.; Olmstead, R.G. 2010. An empirical demonstration of using pentatricopeptide repeat (PPR) genes as plant phylogenetic tools: phylogeny of Verbenaceae and the Verbena complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.54, p.23–35.