UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Filogeografia de figueiras Neotropicais (*Ficus*: Moraceae)

Priscila Canesqui da Costa

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: Biologia Comparada

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Filogeografia de figueiras Neotropicais (*Ficus*: Moraceae)

Priscila Canesqui da Costa

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: Biologia Comparada

Ribeirão Preto

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Priscila Canesqui da

Filogeografia de figueiras Neotropicais (*Ficus*, Moraceae),
2015.

126 p.: il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências
e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia
Comparada.

Orientador: Pereira, Rodrigo Augusto Santinelo.

1. Diversidade genética. 2. Pleistoceno. 3. Diversificação. 4.
América do Sul. 5. Espécies arbóreas.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, ao Departamento de Biologia, e à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto pela oportunidade de realização deste doutorado;

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (2011/01205-0); à CAPES pela bolsa concedida no início do projeto e pelo auxílio PROAP;

Ao prof. Dr. Rodrigo Augusto Santinelo Pereira pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por compartilhar comigo todo o seu conhecimento sobre figueiras;

Aos colegas do Laboratório de Ecologia Vegetal: Larissa, Fernando, Paulo, Luciano e Sérgio. Agradeço pela imensa ajuda com coletas de campo e com infinitas discussões sobre figueiras e insetos associados.

Ao Dr. Finn Kjellberg (CRNS-Montpellier) pelos ensinamentos sobre a história evolutiva das figueiras, pelo envio de amostras da região da Guiana Francesa e pelo apoio na elaboração do projeto que resultou nesta tese;

A pesquisadora Dr. Euridice Honorio (Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana), pelo envio de amostras do Peru e Equador;

Aos curadores de herbários que pelo empréstimo e autorização da utilização de material para este estudo,

À prof. Dra. Aline Pedroso Lorenz-Lemke (UFMS) por me receber tão carinhosamente em seu laboratório, e me ajudar a enfrentar o enorme desafio de trabalhar com Filogeografia de espécies arbóreas amplamente distribuídas ao longo dos Neotrópicos;

Aos meus queridos colegas do LEBio (Laboratório de Evolução e Biodiversidade – UFMS): Weg, Ana Letícia, Ricardo, Mayara, Eli, Emerson e Letícia. Vocês me ensinaram tudo o que foi possível sobre análises moleculares, e fizeram o dia-a-dia no laboratório muito mais feliz! Agradeço imensamente ao Weg, que me ajudou muito com todas as análises estatísticas e interpretações. Sem você, companheiro, este trabalho seria muito mais difícil. Obrigada.

À Otilene, Silvana e Débora por me receberem em suas casas durante algumas das coletas de campo;

Aos colegas Fabiane, Paola, Carol, Marjorie e Ben também agradeço pelos muitos cafés com discussões;

Às queridas Morgana, Elisa e Nanda por me receberem com tanto carinho em suas casas quando precisei;

À minha irmã Fabiola por ter me recebido em Campo Grande durante o grande e árduo período de análises moleculares no LEBio;

Aos meus pais por acreditarem neste projeto tanto quanto eu. Este resultado é de vocês também;

Por fim, à família Munin muito obrigada pelo imenso apoio. Agradeço especialmente ao Roberto, meu companheiro querido de todas as horas, pelo apoio e incentivo incondicionais.

Sumário

FIGURAS E TABELAS	1
RESUMO.....	3
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO GERAL: FILOGEOGRAFIA DE FIGUEIRAS NEOTROPICAIS (<i>FICUS</i>: MORACEAE)	5
1. INTRODUÇÃO	5
1.1 – AS FIGUEIRAS	5
1.1.1 – Subgênero <i>Pharmacosycea</i>	7
1.1.2 – Subgênero <i>Spherozuke</i> (<i>Urostigma</i>):	9
1.2 – FILOGEOGRAFIA	10
1.2 – A REGIÃO NEOTROPICAL	14
REFERÊNCIAS.....	19
CAPÍTULO 1	27
CONEXÕES AMAZÔNIA – MATA ATLÂNTICA: ESTUDO DE CASO COM FIGUEIRAS NEOTROPICAIS	27
RESUMO.....	28
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
ESPÉCIES ESTUDADAS	33
COLETA DE DADOS, EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO DNA	34
DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA POPULACIONAL	35
RESULTADOS.....	38
- cpDNA	38
- ITS	46
MODELAGEM DE DISTRIBUIÇÃO E ANÁLISES DEMOGRÁFICAS	54
DISCUSSÃO	62
PADRÕES DE DIVERSIDADE GENÉTICA E MODELAGENS PALEOCLIMÁTICAS	62
MUDANÇAS PALEOCLIMÁTICAS E AS RELAÇÕES ENTRE AS ESPÉCIES	65

CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
CAPÍTULO 2	76
FILOGEOGRAFIA DE <i>FICUS CITRIFOLIA</i>, UMA FIGUEIRA HEMIEPÍFITA NEOTROPICAL	76
RESUMO.....	77
ABSTRACT	78
INTRODUÇÃO	79
MATERIAL E MÉTODOS.....	82
ESPÉCIE ESTUDADA	82
<i>FICUS CITRIFOLIA</i>	82
COLETA DE DADOS, EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E ALINHAMENTO DO DNA.....	83
DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL	84
MODELAGEM DE DISTRIBUIÇÃO E HISTÓRIA DEMOGRÁFICA	85
DIVERGÊNCIA DAS LINHAGENS.....	87
RESULTADOS.....	88
DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL	88
MODELAGENS DE DISTRIBUIÇÃO	94
DIVERGÊNCIA DAS LINHAGENS.....	96
DISCUSSÃO	102
DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL	102
MODELAGEM DE DISTRIBUIÇÃO E PADRÕES DEMOGRÁFICOS	104
CENÁRIO DE DIVERSIFICAÇÃO DAS LINHAGENS E OS MODELOS PALEOCLIMÁTICOS	106
CONCLUSÕES.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115
ANEXOS.....	117
ANEXO I – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO I	118
ANEXO II – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO II	125

FIGURAS E TABELAS

Capítulo I: Conexões Amazônia – Mata Atlântica: estudo de caso com figueiras Neotropicais

FIGURAS:

Figura 1. Distribuição geográfica dos haplótipos e rede de haplótipos das populações de <i>F.insipida</i> e <i>F. adhatodifolia</i>	43
Figura 2. Árvore filogenética das linhagens de <i>F.insipida</i> e <i>F. adhatodifolia</i>	44
Figura 3. Agrupamentos gerados pelo BAPS com os haplótipos do cpDNA de <i>F. insipida</i> e <i>F. adhatodifolia</i>	47
Figura 4. Agrupamentos gerados pelo BAPS com os haplótipos do cpDNA de <i>F. insipida</i> ..	48
Figura 5. Agrupamentos gerados pelo BAPS com os haplótipos do cpDNA de <i>F. adhatodifolia</i>	49
Figura 6. Mapa da distribuição e rede haplótipos do ITS de <i>F. insipida</i> e <i>F. adhatodifolia</i> .	51
Figura 7. Agrupamentos gerados pelo BAPS com as sequências de ITS de <i>F. insipida</i> e <i>F. adhatodifolia</i>	52
Figura 8. Agrupamentos gerados pelo BAPS com as sequências de ITS de <i>F. insipida</i>	53
Figura 9. Modelos preditivos de distribuição de <i>F. insipida</i>	55
Figura 10. Modelos preditivos de distribuição de <i>F. adhatodifolia</i>	56
Figura 11. Sobreposição das duas espécies durante o último máximo glacial.....	57
Figura 12. Sobreposição das duas espécies durante o interglacial.....	58
Figura 13. <i>Mismatch distribution</i> das frequências de cpDNA de <i>F. insipida</i> e <i>F. adhatodifolia</i>	60
Figura 14. <i>Mismatch distribution</i> das frequências de ITS de <i>F. insipida</i> e <i>F. adhatodifolia</i> ..	61

TABELAS:

Tabela 1: Localidades e Índices de diversidade por população de <i>F. insipida</i> e <i>F. adhatodifolia</i>	41
---	----

Capítulo II: Filogeografia de *Ficus citrifolia* (Moraceae): uma figueira hemiepítia Neotropical

FIGURAS:

Figura 1. Distribuição geográfica dos haplótipos e rede de haplótipos das populações de <i>F. citrifolia</i>	91
Figura 2. Agrupamentos gerados pelo BAPS com os haplótipos de <i>F. citrifolia</i>	92
Figura 3. Modelos preditivos de distribuição de <i>F. citrifolia</i>	95
Figura 4. <i>Bayesian Skyline Plot</i> das populações de <i>F. citrifolia</i>	98
Figura 5. Árvore filogenética das linhagens de <i>F. citrifolia</i>	99
Figura 6. Difusão espacial das linhagens de <i>F. citrifolia</i>	100

TABELAS:

Tabela 1: Localidades e Índices de diversidade por população de <i>F. citrifolia</i>	89
Tabela 2: Análises demográficas das populações de <i>F. citrifolia</i> baseadas na coalescência ...	96
Tabela 3: Migrantes por geração nas populações de <i>F. citrifolia</i> ..	97

RESUMO

Oscilações climáticas globais levaram a mudanças na paisagem durante o período Quaternário. A filogeografia é uma disciplina que busca compreender os processos envolvidos na estruturação espacial da diversidade genética, que é uma das consequências das expansões e retrações da vegetação. Estudos filogeográficos na região Neotropical são importantes para o entendimento da origem e manutenção da grande biodiversidade desta região. Para investigar a influência destes processos na evolução de espécies arbóreas, analisamos os padrões de distribuição da diversidade genética de três espécies do gênero *Ficus* amplamente distribuídas na região Neotropical. *Ficus insipida* e *F. adhatodifolia* são duas espécies próximas deste gênero, que ocorrem nas duas maiores formações florestais da região Neotropical, e apresentam similaridades ecológicas e morfológicas. Os padrões filogeográficos observados neste estudo revelaram uma diversificação recente, com hibridação ancestral na região central da América do Sul, região de contato entre a Amazônia e a Mata Atlântica. Por sua vez, os padrões filogeográficos observados em *F. citrifolia* revelaram que as flutuações climáticas do Pleistoceno não foram responsáveis por uma estruturação na distribuição espacial da diversidade genética desta espécie. A alta diferenciação genética entre as populações e a presença de haplótipos fixados estão relacionados com efeitos do fundador. A diversificação das linhagens iniciou no Pleistoceno, com a separação de dois clados principais. Devido à ausência de clados estruturados geograficamente, as relações filogenéticas das linhagens de *F. citrifolia* parecem ter sido influenciadas por eventos de dispersão a longas distâncias, seguidos de fortes gargalos de garrafa.

ABSTRACT

Global climate oscillations led to changes in the landscape during the Quaternary. Phylogeography is a discipline that seeks to understand the processes involved in spatial structure of genetic diversity, which is a consequence of expansions and retractions of vegetation. Phylogeographic studies in the Neotropics are important to the understanding the origin and maintenance of high biodiversity of this region. To investigate the influence of these processes in the evolution of tree species, we analyzed the distribution patterns of genetic diversity of three species of the genus *Ficus* widespread in the Neotropics. *Ficus insipida* and *F. adhatodifolia* are two closely related species of this genus, which occur in two major forest types of the Neotropical region, and present ecological and morphological similarities. The phylogeographic patterns observed in this study revealed a recent diversification, with ancestral hybridization in central South America, the contact area between the Amazon and the Atlantic Forest. In turn, the phylogeographic patterns observed in *F. citrifolia* revealed that the climatic fluctuations of the Pleistocene were not responsible for the spatial structuring of the genetic diversity distribution. The high genetic differentiation between populations and the presence of fixed haplotypes are related to founder effects. The diversification of lineages initiated in the Pleistocene, with the separation of two major clades. Due to the absence of geographically structured clades, the phylogenetic relationships of *F. citrifolia* lineages appear to have been influenced by long distances dispersal events, followed by strong bottlenecks.

INTRODUÇÃO GERAL: Filogeografia de figueiras Neotropicais (*Ficus*: Moraceae)

1. INTRODUÇÃO

1.1 – As figueiras

A família Moraceae, da qual pertence o gênero *Ficus* L. (figueiras), tem distribuição cosmopolita e pantropical, com a maioria de suas espécies existentes encontradas nos trópicos do Velho Mundo (Berg, 2001). A radiação dentro da família foi estimada em 89,1 Ma (72,6 - 110,0), reforçando a hipótese da origem no período Cretáceo, após a separação da África e da América do Sul. A presença de espécies derivadas de ancestrais do hemisfério Norte, reforçam a hipótese da origem da diversificação de espécies da família Moraceae através de migrações vindas da Laurásia (Zerega *et al.*, 2005). O estudo da origem e diversificação desta família é muito interessante principalmente para entender os mecanismos evolutivos que levaram ao surgimento e a manutenção da relação mutualística entre figueiras e suas vespas polinizadoras (Agaoninae: Chalcidoidea) (Weiblen, 2002).

O gênero *Ficus* compreende aproximadamente 750 espécies, distribuídas em seis subgêneros e 19 seções (Berg & Corner, 2005). Este gênero é amplamente distribuído nos trópicos e subtropicais ao redor do mundo, sendo que aproximadamente 120 espécies ocorrem nas Américas (Berg, 1989). Uma das principais características do gênero *Ficus* é a inflorescência, ou sicônio, que apresenta uma estrutura globosa em formato de urna, cujas flores se desenvolvem internamente. O sicônio possui uma única abertura para o exterior que é protegida por brácteas, chamada ostíolo (Verkerke, 1989).

Figueiras e suas vespas polinizadoras são completamente dependentes uma das outras para a reprodução, na qual as vespas são os únicos vetores de pólen das figueiras e suas larvas se desenvolvem e se alimentam única e exclusivamente nas flores das mesmas (Weiblen, 2002). O ciclo de vida destes dois organismos se inicia quando as flores femininas liberam compostos voláteis altamente específicos (Hossaert-McKey *et al.*, 1994), que atraem a vespa polinizadora

carregada de pólen e já fecundada. Esta vespa entra no sicônio pelo ostíolo, e realiza tanto a polinização quanto a oviposição de seus ovos nas flores femininas. Assim, algumas flores dentro do sicônio desenvolvem sementes, enquanto outras mantem a prole da vespa polinizadora que passa todo o seu desenvolvimento larval dentro das flores femininas se alimentando de endosperma. Quando as vespas chegam a fase adulta, as flores masculinas dentro do figo já estão liberando pólen, e estas vespas copulam e coletam pólen, que será levado para outra figueira que esteja receptiva. Assim, o ciclo reinicia (Weiblen, 2002).

A relação mutualística e obrigatória entre figueiras e vespas polinizadoras da família Agaonidae levou a codiversificação destes organismos há cerca de 75 milhões de anos na Eurásia, durante o Cretáceo (Cruaud *et al.*, 2012). A maioria das espécies de figueira são polinizadas por uma ou poucas espécies de vespas, e a maioria das espécies de vespas polinizadoras estão associadas a uma única espécie de figueira (Cook & Rasplus, 2003). Os episódios reprodutivos das figueiras são caracterizados pela produção altamente sincrônica de figos em um mesmo indivíduo, e pela produção altamente assincrônica de episódios reprodutivos dentro de uma mesma população. Assim, as figueiras garantem a sobrevivência da população de vespas e a polinização cruzada (Bronstein, 1987). Além disso, a relação de dependência das vespas polinizadoras faz com que longas distâncias (~88,60 km; Ahmed *et al.*, 2009) sejam percorridas por elas em busca de sítios de oviposição, e intensifica o fluxo gênico via pólen das figueiras (Yu & Nason, 2013). Assim como a manutenção do mutualismo *Ficus* – vespas polinizadoras é garantida com a assincronia nos eventos reprodutivos em diferentes indivíduos, esta característica também garante o fornecimento de frutos para diversas espécies de frugívoros, principalmente morcegos e aves ao longo do ano todo e garante a dispersão das sementes (Shanahan *et al.*, 2001). Apesar disso, o fluxo gênico via semente parece ser mais restrito do que o de pólen nas figueiras (Yu *et al.*, 2010; Yu & Nason, 2013).

O gênero *Ficus* está dividido em seis subgêneros (*Pharmacosycea*, *Sycomorus*, *Sycidium*, *Synoecia*, *Ficus*, *Shperozuke* -*Urostigma*), que por sua vez são divididos em seções (Berg & Corner 2005; Pederneiras, *et al.* 2015). Destes subgêneros somente *Pharmacosycea* e *Shperozuke* têm seções distribuídas nos Neotrópicos. No total, o subgênero *Pharmacosycea* têm duas seções: seção *Pharmacosycea*, que ocorre exclusivamente na região Neotropical, e seção *Orosycea*, que está distribuída na Oceânia, África e Ásia. Por sua vez, o subgênero *Shperozuke* têm cinco seções: seção *Americana*, que ocorre exclusimanente nos Neotrópicos, e as seções *Galoglychia*, *Malvanthera*, *Shperozuke*, *Conosycea*, que estão distribuídas na Oceânia, África e Ásia (Berg & Corner 2005). Portanto, somente as seções *Pharmacosycea* e *Americana* ocorrem na região Neotropical. Segundo a hipótese biogeográfica mais recentemente publicada, as espécies que ocorrem exclusivamente na região Neotropical ocuparam a região em dois eventos de colonização distintos. A hipótese biogeográfica para a divergência da seção *Pharmacosycea* e seu polinizador *Tetrapus* é 74,9-62,1 Ma, e pode ter ocorrido via “stepping-stone” em ilhas vulcânicas do Atlântico Norte. A seção *Americana* iniciou sua diversificação na América do Sul há cerca de 38.2-32.3 Ma (Cruaud *et al.*, 2012).

1.1.1 – Subgênero *Pharmacosycea*

O subgênero *Pharmacosycea* é dividido em duas seções: *Orosycea*, que ocorre na Ásia, na África e na Australásia, e *Pharmacosycea* que ocorre somente na região Neotropical (Berg, 1989). Todo o subgênero apresenta modo reprodutivo monóico. A espécies da seção *Pharmacosycea* são polinizadas por espécies de vespas do gênero *Tetrapus* Mayr e produzem grandes quantidades de pólen que aderem ao corpo das vespas polinizadoras e são carregados passivamente (Kjellberg *et al.*, 2005).

A seção *Pharmacosycea* tem cerca de vinte espécies e está amplamente distribuída nos Neotrópicos. A maioria das espécies desta seção apresenta hábito arbóreo e terrícola (Berg & Villavicencio, 2004). As espécies desta seção são geralmente mais difíceis de identificar do que

em outros grupos dentro do gênero *Ficus*, devido a pouca diferenciação de caracteres, possivelmente devido a hibridização ou diversificação muito recente (Berg, 2006).

Em grupos com diversificação mais recente, estudos filogenéticos podem encontrar o compartilhamento de haplótipos entre espécies, resultado de retenção de polimorfismo ancestral ou hibridização (Funk & Omland, 2003). Nos estudos moleculares pioneiros da coevolução do gênero *Ficus* e suas vespas polinizadoras, tanto o subgênero *Pharmacosycea* quanto suas vespas polinizadoras do gênero *Tetrapus* Mayr. foram considerados grupos basais (Herre *et al.*, 1996; Machado *et al.*, 1996; Lopez-Vaamonde *et al.*, 2009). Entretanto, em estudo mais recente (Cruaud *et al.*, 2012), foi demonstrado que o gênero *Tetrapus* não é grupo irmão de todos os outros gêneros de polinizadoras, enquanto o subgênero *Pharmacosycea* continuou basal aos outros subgêneros de *Ficus*. Uma das hipóteses para este arranjo, é que seria um artefato da atração de ramos longos (*long branch attraction*, Felsenstein, 2004), o que foi resolvido no estudo mais recente pela inclusão de maior número de espécies de vespas e figueiras nas análises. Porém, ainda não foi suficiente para resolver o relacionamento da seção *Pharmacosycea* com as demais seções e subgêneros.

As espécies morfologicamente semelhantes *Ficus insipida* Willd e *F. adhatodifolia* Schott pertencem ao subgênero *Pharmacosycea*, seção *Pharmacosycea*. Esta seção conta com espécies que ocorrem em baixas altitudes e próximas a corpos d'água (Berg & Villavicencio, 2004), ficando restritas a florestas úmidas como a Amazônia e a Mata Atlântica. *Ficus insipida* distribui-se da América Central ao norte da Bolívia, passando pela Amazônia nos estados de Rondônia, Amazonas, Acre, Pará e Amapá, no Brasil, enquanto *F. adhatodifolia* distribui-se da região central da Bolívia até norte da Argentina passando pelo centro-oeste do Brasil, nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e é frequente no litoral sul e sudeste brasileiro. Segundo Berg e Villavicencio (2004), *F. adhatodifolia* poderia ser considerada uma subespécie de *F. insipida*. Apesar de apresentarem muitas similaridades, os autores as distinguiram pelo

tamanho da estípula (*F. insipida* > 10 cm; *F. adhatodifolia* <10 cm, geralmente entre 4,5-6,0 cm) e a lâmina foliar de *F. adhatodifolia* é muitas vezes pilosa, enquanto em *F. insipida* é sempre glabra. Além disso, os polinizadores das duas espécies também são diferentes (J-Yves Rasplus, dados não publicados).

1.1.2 – Subgênero *Spherozuke* (*Urostigma*):

O subgênero *Spherozuke* está distribuído em todas as regiões tropicais no mundo e é dividido em cinco seções: *Conosycea*, *Spherozuke*, *Malvanthera*, *Galoclychia* e *Americana* que é a única seção que ocorre nas Américas, com mais de 100 espécies distribuídas ao longo dos Neotrópicos. Uma das principais características deste subgênero é a habilidade de formar raízes adventícias, que permitiu as espécies deste grupo adotarem o hábito hemiepífítico, fato que as torna conhecidas como figueiras estranguladoras (Carauta 1989).

As espécies da seção *Americana* são polinizadas por vespas do gênero *Pegoscapus* Cameron, que apresenta adaptações tais como bolsa de pólen para realizar a polinização ativa característica de todo o subgênero. A seção *Americana* tem espécies com ampla distribuição, que podem conter diferentes “formas”, que também caracterizam complexos de espécies (Berg, 1989). Estes complexos compreendem algumas formas com distribuição alopátrica que são morfologicamente muito parecidas (Berg, 1989). *Ficus citrifolia* é uma árvore monóica que normalmente cresce como hemiepífita em outras árvores ou edificações, ocorrendo frequentemente em áreas perturbadas, em toda a América Central e América do Sul (Berg, 2007; Pereira *et al.*, 2007). No Brasil, esta espécie é polinizada por *Pegoscapus tonduzi* (Pereira *et al.*, 2007).

O estudo da diversidade genética em espécies arbóreas de ampla distribuição é um grande desafio logístico devido à grande quantidade de coletas e de trabalho de laboratório, exigindo que colaborações nacionais e internacionais sejam estabelecidas, como ocorreu neste estudo. Com isso, é possível investigar a história biogeográfica de diferentes espécies e

comparar padrões e processos envolvidos na diversificação de espécies próximas ou que apresentam distribuição similares. O conhecimento sobre a diversificação das linhagens de *Ficus* na região Neotropical ainda é escasso (Poelchau & Hamrick, 2012; Honório *et al.*, 2014). Estudos filogeográficos com figueiras podem revelar o impacto das variações ambientais ao longo do tempo sobre populações de espécies arbóreas tropicais. O objetivo deste estudo foi analisar os padrões filogeográficos de três espécies de figueiras Neotropicais. No primeiro capítulo, apresentamos as relações filogeográficas de *F. insipida* e *F. adhatodifolia*, focando nas suas estreitas relações filogenéticas: *F. insipida* ocorre na América Central e na porção amazônica da América do Sul, enquanto *F. adhatodifolia* ocorre na Mata Atlântica, podendo chegar até a porção central do continente, onde a distribuição das duas espécies se sobrepõe. No segundo capítulo, apresentamos os padrões filogeográficos de *F. citrifolia*, outra espécie amplamente distribuída nos Neotrópicos, que apresenta hábito hemiepífito e ocorre preferencialmente em áreas abertas.

1.2 – Filogeografia

Estudos sobre a história evolutiva das diversas espécies de plantas e animais têm fornecido informações importantes sobre suas respostas em relação a mudanças climáticas e geológicas ao longo do tempo. Com o avanço das técnicas em biologia molecular e o crescente interesse na reconstrução da história evolutiva das espécies surgiu a Filogeografia, disciplina que busca compreender a história evolutiva das espécies através dos princípios e processos históricos e contemporâneos que influenciam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas dentro de uma espécie ou entre espécies próximas (Avise, 2000).

Flutuações climáticas e/ou geológicas podem influenciar os padrões de distribuição da diversidade genética dentro de uma espécie. A estruturação espacial da diversidade genética pode ser observada em populações de diversas espécies de plantas, animais e fungos e pode estar relacionada com a distribuição das populações no espaço. Populações mais próximas

podem ser geneticamente mais similares, por exemplo, devido a ausência de fluxo gênico entre populações distantes (Wright, 1943). Em muitas espécies de plantas, por exemplo, o fluxo gênico via pólen e semente é limitado a algumas dezenas de indivíduos há poucos metros de distância (Loveless & Hamrick, 1984). Por outro lado, características como ampla distribuição, reprodução cruzada, e dispersão por vento ou animais estão associadas a uma baixa diferenciação entre populações de espécies arbóreas, o que revela um fluxo gênico intenso entre populações mais distantes (Dick *et al.*, 2003).

Além da distribuição da diversidade genética no espaço, a Filogeografia também busca compreender como diferentes linhagens se relacionam no tempo. Por isso, é necessária a utilização de um modelo que leve em consideração a história da variação genética destas linhagens e suas relações de ancestralidade. A teoria da coalescência é uma ferramenta matemática que descreve a distribuição das linhagens genealógicas nas populações, e fornece informações sobre a origem e manutenção da diversidade genética (Rosenberg & Nordborg, 2002). Esta teoria fornece um modelo de reconstrução que parte do pressuposto de que todas as linhagens distintas atuais compartilharam do mesmo ancestral comum em algum ponto de sua história, e leva em consideração estimativas de parâmetros demográficos, tais como tamanho populacional e taxas de migração (Avise, 2000).

Com a conexão entre a genética de populações e a teoria da coalescência, aliadas a sistemática, é possível inferir sobre os processos envolvidos na diversificação de espécies, que se inicia com o isolamento reprodutivo entre populações, com posterior acúmulo de divergências (Noor & Feder, 2006). Com este acúmulo, há um aumento na diferenciação entre as populações que levam a formação de unidades evolutivas independentes, o que caracteriza a especiação. Este processo de diversificação ocorre devido a pressões seletivas do ambiente e, em populações pequenas, por efeito do fundador e deriva genética (Avise, 2000). Dentre os padrões genéticos que podem ser observados em todos os processos de especiação está a topologia da

árvore de genes de espécies próximas. No início deste processo, a maioria das árvores demonstram polifilia e, com a permanência do isolamento reprodutivo, as árvores gênicas são convertidas ao *status* de parafilético para posteriormente monofilia recíproca (Avise, 2000).

As relações genealógicas podem ser influenciadas tanto pela distribuição das linhagens no espaço quanto pelo tempo desde o início do isolamento reprodutivo entre elas, e estes fatores são responsáveis por incongruências entre as árvores de genes e árvores de espécies. Visto que a diversidade genética observada pode ser anterior ao tempo de divergência das populações em questão, sua distribuição está mais relacionada com a persistência dos polimorfismos ancestrais do que com o fluxo gênico (Templeton *et al.*, 1995). Este fenômeno é chamado retenção do polimorfismo ancestral ou arranjo incompleto de linhagens (*incomplete lineage sorting*). Outro fator que influencia as relações genealógicas das linhagens é a transferência horizontal, que é mediada por um vetor (vírus ou fungo) ou por eventos de hibridação (Richardson & Palmer, 2006; Abbott *et al.*, 2013), e aumenta a similaridade genética de linhagens pouco relacionadas em uma filogenia.

Tanto a hibridização quanto a retenção de polimorfismo ancestral podem ser observadas a partir da discordância entre as relações genealógicas intraespecíficas ou entre espécies próximas e as características fenéticas das mesmas. A detecção e análise de tais eventos podem ser problemáticas sem a avaliação de marcadores moleculares adequados. Apesar da dificuldade em identificar as causas das incongruências, elas podem ser inferidas quando há disparidades entre as relações genealógicas de sequências de DNA nucleares e cloroplastidiais, devido a herança uniparental tipicamente maternal do cloroplasto enquanto genes nucleares são herdados de ambos parentais. Eventos de hibridação são especialmente comuns em regiões de contato entre espécies que divergiram há pouco tempo, onde a probabilidade de não haver isolamento reprodutivo é maior (Avise, 2000). Por outro lado, quando há um compartilhamento genético ao longo de uma ampla região geográfica, não somente nas zonas de contato, e não há

características morfológicas que indiquem hibridação, a hipótese de retenção de polimorfismo ancestral pode ser assumida. Em espécies de *Petunia* da região sul do Brasil, uma discordância entre marcadores nucleares e cloroplastidiais revelou uma retenção de polimorfismo ancestral, devido ao compartilhamento de haplótipos entre espécies típicas, sem a presença de intermediários, e entre populações muito distantes geograficamente (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010). Além disso, a diversificação das espécies de *Petunia* é muito recente (cerca de 1 milhão de anos), fato que também aumenta as chances de arranjo incompleto de linhagens.

A utilização de marcadores moleculares com taxas de mutação variáveis e diferentes modos de herança (p.ex. marcadores nucleares e de organelas) permitem a avaliação da diversidade genética em diferentes escalas temporais (Petit *et al.*, 2003). A maioria dos estudos filogeográficos com plantas utiliza a variação genética encontrada no genoma plastidial ou de cloroplasto (cpDNA). Várias regiões deste genoma, especialmente as não codificantes, apresentam taxas evolutivas adequadas para tais estudos. O genoma de cloroplasto é haplóide, não sofre recombinação, e a variação ocorre tanto por meio de substituições nucleotídicas quanto por inserções/deleções e microinversões (Avise, 2004; Freeland, 2005; Kim & Lee, 2005). Devido à herança geralmente uniparental do cloroplasto, estes marcadores só contêm informações sobre o fluxo gênico via sementes, que pode ser diferente do fluxo gênico via pólen (Avise, 2004; Freeland, 2005; Caetano *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2011; Yu & Nason, 2013).

Em *loci* nucleares é esperado que a estruturação filogeográfica seja menos pronunciada devido ao maior tamanho populacional efetivo (N_e) relacionado a este tipo de marcador. Por exemplo, em uma população dióica onde machos e fêmeas são igualmente abundantes e tem a mesma variância no sucesso reprodutivo, *loci* nucleares tem um N_e quatro vezes maior do que um marcador citoplasmático (Hare, 2001). Portanto, para avaliar o impacto dos diferentes padrões de fluxo gênico observados entre marcadores uniparentais e biparentais sobre a

estruturação genética das populações, marcadores nucleares têm sido usados em associação com os citoplasmáticos em estudos filogeográficos (Dick *et al.*, 2010; Rymer *et al.*, 2012; Turchetto *et al.*, 2012b). Dentre os marcadores nucleares destacam-se os espaçadores internos transcritos (ITS) do DNA ribossomal, muito utilizado em estudos evolutivos de diversas espécies de plantas (Baldwin & Sanderson, 1995; Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Turchetto-Zolet *et al.*, 2012a; Honório *et al.*, 2014). Ele é principalmente utilizado devido a disponibilidade de muitos *primers* universais desenvolvidos, a facilidade de amplificação mesmo com espécimes de herbário, ao seu tamanho moderado (cerca de 700 pb), e a sua alta diversidade (Felliner & Rosselló, 2007).

Os processos e fatores evolutivos descritos acima foram diretamente pelas alterações ambientais climáticas e/ou geológicas. Flutuações climáticas que ocorreram nos últimos milhões de anos mudaram a distribuição das espécies e influenciaram a diversidade genética intra e interpopulacional de espécies em todo o planeta (Hewitt, 2000; 2004). O aumento da frequência e da amplitude destas oscilações climáticas caracterizam o Quaternário (< 2,5 milhões de anos, Ma), que é dividido nos períodos Pleistoceno e Holoceno. O Pleistoceno ficou marcado por intensos períodos glaciais frios e secos intercalados por curtos intervalos interglaciais, nos quais o clima era mais quente e úmido. Os efeitos deste período na configuração da paisagem variaram com a latitude e a topografia. Durante os períodos glaciais as regiões em latitudes mais altas foram cobertas por gelo e as formações florestais das regiões temperadas se deslocaram em direção ao equador. O clima mais frio e seco levou a uma redução das florestas tropicais e a expansão de desertos e de formações vegetacionais abertas (p.ex. campos) e espécies de regiões montanhosas expandiram para áreas mais baixas (Hewitt, 2004).

1.2 – A região Neotropical

A grande diversidade taxonômica encontrada nos Neotrópicos torna os estudos filogeográficos com organismos desta região ainda mais complexos. Por exemplo, em algumas

espécies de plantas amplamente distribuídas foram observadas profundas diferenças genéticas intraespecíficas, com diferenças fenotípicas (presença de subespécies ou variedades). Nestes estudos a classificação de espécie foi mantida (Palma-Silva *et al.*, 2009; Turcheto-Zolet *et al.*, 2012a; 2012b; Scotti-Saintagne *et al.*, 2013a). Por sua vez, alguns autores caracterizaram a espécies crípticas ainda não descritas, mesmo com a presença de poucas diferenças genotípicas e fenotípicas (Scotti-Saintagne *et al.*, 2013b; Cavers *et al.*, 2013).

A história paleoclimática da região Neotropical, que abrange parte da América do Norte (Flórida – EUA), a América Central e a América do Sul, é de fundamental importância para o entendimento dos mecanismos de origem e manutenção de sua grande biodiversidade. Segundo a Teoria dos Refúgios Pleistocênicos (Haffer, 1969), a diversificação de espécies na região Neotropical estaria relacionada com as mudanças dramáticas da vegetação devido a flutuações climáticas que ocorreram durante o período Quaternário (< 2,5 milhões de anos, Ma) (Hooghiemstra & van der Hammen, 1998). No entanto, análises moleculares têm demonstrado que os processos de diversificação nesta região não estão restritos a um intervalo de tempo particular (Rull, 2011). Alguns estudos têm revelado que as origens da diversificação de algumas espécies Neotropicais são muito mais antigas, e estão relacionadas a mudanças que ocorreram no Neogeno (23-2,5 Ma) (Antonelli & Sanmartin, 2011; Scotti-Saintagne *et al.*, 2012b; Cavers *et al.*, 2013; Fine *et al.*, 2014). Dependendo do grupo taxonômico, fatores como o soerguimento dos Andes, as incursões marinhas na Amazônia e a formação do Istmo do Panamá tem igual ou maior relação com a diversificação nesta região do que as flutuações climáticas do Pleistoceno (Rull, 2011). No entanto, flutuações climáticas do Quaternário também foram importantes para a diversificação de algumas linhagens de plantas Neotropicais, tais como as espécies dos gêneros *Inga* (Richardson *et al.*, 2001), *Guatteria* (Erkens *et al.*, 2007) e *Petunia* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010).

Segundo dados palinológicos, a região Neotropical sofreu mudanças locais na paisagem durante o Quaternário. As florestas sazonalmente secas, localizadas na porção central da América do Sul, sofreram mudanças complexas e sua área atual parece ser remanescente de uma ampla área de campos subtropicais (Behling, 1998; Ledru *et al.*, 2006). Apesar do clima frio e seco deste período, a região norte da América do Sul onde se encontra a floresta ombrófila Amazônica sofreu mudanças regionais, com a permanência de grandes manchas de floresta úmida, onde as espécies que não toleravam o clima seco do Quaternário foram capazes de se refugiar (Haffer & Prance, 2001). Estudos filogeográficos têm encontrado descontinuidades genéticas na porção central e expansão demográfica na porção sul da Mata Atlântica (Carnaval & Moritz, 2008; Martins, 2011). A mudança na distribuição das espécies de plantas durante o Quaternário na América do Sul depende das suas características biológicas. Por exemplo, espécies de *Petunia*, que ocorrem nos campos subtropicais do sul do Brasil, tiveram a expansão da sua distribuição associada aos períodos glaciais do Quaternário (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010). Diferentemente do padrão observado em espécies de plantas associadas a formações florestais, como *Schyzolobium parahyba*, que passou por uma retração no Último Máximo Glacial, seguida de expansão nos períodos interglaciais (Turchetto-Zolet *et al.* 2012)

Diversos fatores ecológicos como os sistemas de reprodução, os mecanismos de polinização e dispersão, e a fenologia, podem determinar a estruturação genética em populações de plantas (Loveless & Hamrick, 1984). Um exemplo é a relação complexa entre plantas e seus polinizadores e dispersores, na qual o fluxo gênico depende tanto do comportamento dos animais quanto da fenologia das plantas (Dick *et al.*, 2008). Petit *et al.* (2005) verificaram que o fluxo gênico via pólen é muito maior em espécies de plantas polinizadas pelo vento e a estruturação genética observada nestas espécies é maior do que nas que são polinizadas por animais. No entanto, uma clara estruturação geográfica revelada por marcadores citoplasmáticos do DNA de cloroplasto foi observada em espécies arbóreas (Ennos, 1994), e

revelou que tanto o modo de polinização quanto a dispersão de sementes influenciam a estruturação genética das populações.

Dentre os estudos já realizados com espécies arbóreas da região Neotropical foi possível observar padrões divergentes de estruturação da diversidade genética, relacionados com as características ecológicas das espécies e com a história das formações vegetacionais as quais estão associadas. *Simaruba amara* Aubl. (Simaroubaceae), que ocorre na região Amazônica e na América Central, apresentou uma alta diferenciação genética entre as populações destas duas regiões, em estudo realizado com marcadores microssatélites (Hardesty *et al.*, 2010). Esta planta pioneira é de vida longa, polinizada por pequenos insetos e dispersada por várias espécies de vertebrados. A alta diferenciação provavelmente está relacionada com a sua baixa capacidade de dispersão através do Andes, uma das principais barreiras ao fluxo gênico da região Neotropical (Hardesty *et al.*, 2010). Assim como a simarouba, o guanandi (*Symphonia globulifera* L.; Clusiaceae) e o mogno (*Swietenia macrophylla* King; Meliaceae) também apresentaram estruturação genética entre as populações da América Central e do Sul, reveladas por marcadores microssatélites e por sequências de DNA nuclear (marcador ITS), respectivamente (Dick *et al.*, 2003; Dick & Heuertz, 2008; Lemes *et al.*, 2010). Estas duas espécies são polinizadas por beija-flores e mariposas, e dispersadas por vertebrados e pelo vento respectivamente. Apesar das diferentes formas de dispersão e polinização destas duas espécies, ambas são tolerantes a locais mais secos, o que facilitaria a dispersão entre a Amazônia e a América Central. Estes padrões corroboram com a hipótese de vicariância, na qual as plantas eram amplamente distribuídas na região da Amazônia antes do soerguimento dos Andes. As populações Neotropicais da espécie arbórea *Ceiba petandra* L. (Malvaceae) apresentaram divergências nucleotídicas entre as populações da América Central e da Amazônia que sugerem há cerca de 3 Ma, próximo ao evento mais recente de soerguimento dos Andes (em torno de 4 Ma; Dick *et al.*, 2007). Diferentemente, a espécie pioneira de vida longa Jacarandá (*Jacaranda*

copaia Juss.; Bignoniaceae), amplamente distribuída na região Amazônica e na América Central, apresentou maior diferenciação genética entre populações da Amazônia do que entre as populações da Amazônia e da América Central (Scotti-Saintagne *et al.*, 2012a). Esta espécie é polinizada por abelhas e dispersada pelo vento e os autores relacionam a alta diferenciação entre as populações da Amazônia com a baixa capacidade de dispersão desta espécie.

Na região Neotropical, uma outra forte barreira ao fluxo gênico é o Cerrado do Brasil central. A espécie pioneira *Schizolobium parahyba* Vell. (guapuruvu), que é polinizada por abelhas e tem sementes dispersadas pelo vento ocorre preferencialmente em áreas abertas e apresentou uma forte quebra filogenética entre as populações da Amazônia e da Mata Atlântica. Apesar de ocorrer em áreas abertas, esta espécie parece ter fortes restrições hídricas, fato que reforça a hipótese de que o Cerrado constitui uma forte barreira ao fluxo gênico para muitas espécies que ocorrem nas duas principais florestas da América do Sul (Turchetto-Zolet *et al.*, 2012a).

A Mata Atlântica é considerada um dos biomas mais diversos do planeta, com altos níveis de endemismo (Costa *et al.*, 2000). Esta formação florestal ocupa principalmente a região litorânea do Brasil, uma área de topografia complexa que sofreu influências das atividades tectônicas do Terciário e das mudanças no nível do mar durante o Quaternário (Martins & Coutinho, 1981; Suguio *et al.*, 2005). Estudos filogeográficos têm identificado uma divisão norte-sul na Mata Atlântica. Por exemplo, a espécie de bromélia *Vriesea gigantea* Gaud., que ocorre na Mata Atlântica, teve sua distribuição restrita a mais do que um refúgio nesta região durante as mudanças climáticas do Pleistoceno e, assim como em *Schizolobium parahyba*, demonstrou que houve uma ocupação recente da região sul da Mata Atlântica. Além disso, houve uma diminuição da diversidade genética em populações mais ao norte (Palma-Silva *et al.*, 2009; Turchetto-Zolet *et al.*, 2012a).

REFERÊNCIAS

- Abbott, R. *et al.* (2013) Hibridization and Speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, **26**, 229 – 246
- Ahmed, S., Compton, S.G., Butlin, R.K. & Gilmartin, P.M. (2009) Wind-borne insects mediate directional pollen transfer between desert fig trees 160 kilometers apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 20342-20347
- Antonelli, A., Sanmartin, I. (2011) Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon*, **60**, 403–414.
- Avise, J.C. (2000) *Phylogeography - the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avise, J.C. (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Chapman & Hall, New York, NY
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J. (1995) Age and rate of diversification of the Hawaiian silversword alliance (Compositae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **95**, 9402–9406.
- Behling, H. (1998) Late Quaternary vegetational and climatic changes in Brazil. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **99**, 143–156
- Berg, C. C. (1989) Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia*, **45**, 605-611.
- Berg, C.C. (2001) *Moreae, Artocarpeae, and Dorstenia (Moraceae)*. New York Botanical Garden Press, New York, NY.
- Berg, C.C. & Villavicencio, X. (2004) Taxonomic studies on *Ficus* (Moraceae) in the West Indies, extra-Amazonian Brazil and Bolivia. *Ilicifolia*, **5**, 1-132.
- Berg, C.C. & Corner, E.J.H. (2005) Moraceae – *Ficus*. *Flora Malesiana*, 17. National Herbarium Nederland, Universiteit Leiden Branch, The Netherlands.
- Berg, C.C. (2006) The subdivision of *Ficus* subgenus *Pharmacosycea* section *Pharmacosycea* (Moraceae). *Blumea*, **51**, 147 – 151.
- Berg, C.C. (2007) Proposals for treating four species complexes in *Ficus* subgenus *Urostigma* section *Americanae* (Moraceae). *Blumea*, **52**, 195 – 312.

- Bronstein, J.L. (1987) Maintenance of species-specificity in a Neotropical fig – pollinator wasp mutualism. *Oikos*, **48**, 39 – 46.
- Carauta, J.P.P. (1989) *Ficus* (Moraceae) no Brasil: Conservação e Taxonomia. *Albertoa*, **2**, 1-365
- Carnaval, A.C., Moritz, C. (2008) Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Rainforest. *Journal of Biogeography*, **35**, 1187 – 1201
- Cavers, S., Telford A., Cruz F. A., Castañeda A.J.P., Valencia R., Navarro C., Buonamici A., Lowe A. J. & Vendramin G. G. (2013) Cryptic species and phylogeographical structure in the tree *Cedrela odorata* L. throughout the Neotropics. *Journal of Biogeography*, **40**, 732-746.
- Cook, J.M. & Rasplus, J-Y. (2003) Mutualists with attitude: coevolving fig wasp and figs. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**, 241 – 248.
- Costa, L.P., Leite, Y.L.R., da Fonseca, G.A.B. & da Fonseca, M.T. (2000) Biogeography of South American forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic forest. *Biotropica*, **32**, 872–881.
- Cruaud, A. *et al.* (2012) An Extreme Case of Plant-Insect Codiversification: Figs and Fig-pollinating Wasps. *Systematic Biology*, **61**, 1029-1047.
- Dick, C.W., Abdul-Salim, K. & Bermingham, E. (2003) Molecular systematic analysis reveals cryptic Tertiary diversification of a widespread tropical rain forest tree. *The American Naturalist*, **162**, 691–703.
- Dick, C.W., Bermingham, E., Lemes, M.R. & Gribel, R. (2007) Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. *Molecular Ecology*, **16**, 3039– 3049
- Dick, C.W. & Heuertz, M. (2008) The complex biogeographic history of a widespread tropical tree species. *Evolution*, **62**, 2760–2774.
- Dick, C.W., Hardy, O.J., Jones, F.A. & Petit, R.J. (2008) Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. *Tropical Plant Biology*, **1**, 20–33.
- Ennos, R.A., Sinclair, W.T., Hu, X-S., & Langdon, A. (1994) Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. *Molecular Systematics*

- and Plant Evolution* (ed. by P.M. Hollingsworth, R.M. Bateman and R.J. Gornall), pp. 1–19. Taylor & Francis Ltd, London.
- Erkens, R.H.J., Chatrou, L.W., Maas, J.W., van der Niet, T., & Savolainen, V. (2007) A rapid diversification of rain forest trees (*Guatteria*, Annonaceae) following dispersal from Central into South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**, 399–411
- Fellner, G.N. & Rosselló, J.A. (2007) Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**, 911 – 919.
- Felsenstein, J. (2004) *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates Inc. Sunderland. MA.
- Freeland, J.R. (2005) *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Fine, P.V.A, Zapata, F. & Daly, D.C. (2014) Investigating processes of Neotropical rains forest tree diversification by examining the evolution and historical biogeography of the Protieae (Burseraceae). *Evolution*, **68**, 1988-2004.
- Funk, D.J. & Omland, K.E. (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **34**, 397–423
- Gentry, A.H. (1982) Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between Central and South America, Pleistocene climatic fluctuations, for an accident of the Andean orogeny? *Annals Missouri Botanical Garden*, **69**, 557–593.
- Haffer, J. (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, **165**, 131–137.
- Haffer, J. & Prance, G.T. (2001) Climatic forcing of evolution in Amazonia during Cenozoic: On the refuge theory of biotic differentiation. *Amazoniana*, **16**, 579 – 608.
- Hardesty, B.D., Dick, C.W., Hamrick, J.L., Degen, B., Hubbell, S.P. & Bermingham, E. (2010) Geographic influence on genetic structure in the widespread Neotropical tree *Simarouba amara* (Simaroubaceae). *Tropical Plant Biology*, **3**, 28–39.
- Hare, M.P. (2001) Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 700 – 706
- Herre, E.A., Machado, C.A., Bermingham, E., Nason, D., Windsor, D.M., McCafferty, S.S., van Houten, W. & Bachman, K. (1996) Molecular Phylogenies of Figs and their Pollinators. *Journal of Biogeography*, **23**, 521–530.

- Hewitt, G.M. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907-913.
- Hewitt, G.M. (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **359**, 183-195.
- Hooghiemstra, H. & van der Hammen, T. (1998) Neogene and Quaternary development of the Neotropical rain forest: the forest refugia hypothesis, and a literature overview. *Earth-Science Reviews*, **44**, 147–183.
- Honorio, E.N.C., Dexter, K.G., Poelchau, M.F., Hollingsworth, P.M., Phillips, O.L. & Pennington, R.T. (2014). *Ficus insipida* subsp. *insipida* (Moraceae) reveals the role of ecology in the phylogeography of widespread Neotropical rain forest tree species. *Journal of Biogeography*, **41**, 1697-1709.
- Hossaert-Mckey, M., Gibernau, M. & Frey, J.E. (1994) Chemosensory attraction of fig wasps to substances produced by receptive figs. *Entomologia experimentalis et applicata*, **70**, 185-191.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A. & Stevens, P.F. (1999) *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sunderland: Sinauer.
- Kim, K-J, Lee, H-L (2005) Widespread occurrence of small inversions in the chloroplast genomes of land plants. *Molecules and Cells*, **19**, 104–113.
- Kjellberg F., Jousselin, E., Hossaert-McKey, M. & Rasplus, J.-Y. 2005. Biology, Ecology and Evolution of Fig-pollinating Wasps (Chalcidoidea, Agaonidae). *Biology, ecology and evolution of gall-inducing arthropods* (ed. by A. Raman, C.W. Schaefer, and T.M. Withers), pp. 539–571. New Hampshire, Science.
- Ledru, M.P., Ceccantini, G., Gouveia, S.E.M. (2006) Millennial scale climatic and vegetation changes in a northern Cerrado (Northeast, Brazil) since the last glacial maximum. *Quaternary Science Reviews*, **25**, 1110–1126.
- Lemes, M.R., Dick, C.W., Navarro, C., Lowe, A.J., Cavers, S. & Gribel, R. (2010) Chloroplast DNA microsatellites reveal contrasting phylogeographic structure in mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) from Amazonia and Central America. *Tropical Plant Biology*, **3**, 40–49.
- Lorenz-Lemke, A.P., Togni P. D., Mader G., Kriedt R. A., Stehmann J. R., Salzano F. M. & Bonatto S. L. 2010. Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South

- American highlands: a phylogeography perspective on native *Petunia* (Solanaceae). *Molecular Ecology*, **19**: 5240 – 5251.
- Lopez-Vaamonde C., Cook J.M., Rasplus J.-Y., Machado C.A. & Weiblen G. (2009) Molecular dating and biogeography of fig-pollinating wasps. *Molecular Phylogenetic Evolution*, **52**, 715–726.
- Loveless, M.D., Hamrick, J.L. (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **15**, 65–95.
- Machado, C.A.; Herre, E.A.; Mccafferty, S.; Bermingham, E. (1996) Molecular phylogenies of fig pollinating and non-pollinating wasps and the implications for the origin and evolution of the fig-fig wasp mutualism. *Journal of Biogeography*, **23**, 531-542, 1996.
- Martins, F.M. (2011). Historical Biogeography of the Brazilian Atlantic forest and Carnaval-Moritz model of Pleistocene Refugia: what do phylogeographical studies tell us? *Biological Journal of the Linnean Society*, **104**, 499–509.
- Martins, L.R., Coutinho, P.N. (1981) The Brazilian continental margin. *Earth-Science Reviews*, **17**, 87–107
- Noor, M.A.F., Feder, J.L. (2006) Speciation genetics: evolving approaches. *Nature Reviews Genetics*, **7**, 851–861
- Novaes, R. M. L., Filho J. P. L., Ribeiro R. A. R. & Lovato M. B. (2010). Phylogeography of *Plathymentia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrado in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology*, **19**, 985-998.
- Palma-Silva, C., Paggi, G.M., Barbara, T., Bered, F. & Bodanese-Zanettini. (2009). Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a Neotropical forest species. *Heredity*, **103**, 503-512.
- Pederneiras, L.C., Carauta, J.P.P., Neto, S.R. & Mansano, V.F. (2015) An overview of the infrageneric nomenclature of *Ficus* (Moraceae). *Taxon*, **64**, 589 – 594.
- Pennington, RT, Lavin, M, Prado, D.E, *et al* (2004) Historical climate change and speciation: neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both tertiary and quaternary diversification. *Philosophical Transactions Royal Society B*, **359**, 515–537.

- Petit, R.J., Aguinagalde, I., de Beaulieu, J.-L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palmé, A., Martín, J.P., Rendell, S. & Vendramin, G.G. (2003). Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*, **300**, 1563-1565.
- Petit, R.J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D. & Vendramin, G.G. (2005). Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, **14**, 689 - 701.
- Pereira, R.A.S., Rodrigues E. & Menezes Jr, A.O. (2007) Phenological patterns of *Ficus citrifolia* (Moraceae) in a seasonal humid-subtropical region in Southern Brazil. *Plant Ecology*, **188**, 265 – 275.
- Pinheiro, F., de 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*, **38**, 1923–1935.
- Poelchau, M.F & Hamrick, J.L. (2012). Comparative phylogeography of three common Neotropical trees. *Journal of Biogeography*, **40**, 618 – 631.
- Ramos, A.C.S., Lemos-Filho, J.P, Ribeiro, R.A, Santos, F.R, Lovato, M.B. (2007). Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. *Annals of Botany*, **100**, 1219–1228.
- Raven, P.H., & Axelrod, D.I.. (1974). Angiosperm biogeography and past continental movements. *Annals of Missouri Botanical Garden*, **61**, 539–673.
- Richardson, J.E., Pennington, R.T., Pennington, T.D. & Hollingsworth, P.M. (2001). Rapid diversification of a species-rich genus of Neotropical rain forest trees. *Science*, **293**, 2242–2245.
- Richarson, A.O. & Palmer, J.D. (2006). Horizontal gene transfer in plants. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 1–9.
- Rønsted, N., Weiblen, G.D., Cook, J.M., Salamin, N., Machado, C.A. & Savolainen, V. (2005) 60 million years of co-divergence in the fig-wasp symbiosis. *Proceeding of the Royal Society B: Biological Science*, **272**, 2593-2599.

- Rosenberg, N.A., Nordborg, M. (2002) Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 380 – 390.
- Rundle, H.D. & Nosil, P. (2005) Ecological speciation. *Ecology Letters*, **8**, 336 – 352
- Rull, V. (2011). Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, **26**, 508–513.
- Rymer, P.D., Dick, C.W., Vendramin, G.G., Buonamici, A. & Boshier, D. (2012) Recent phylogeographic structure in a widespread ‘weedy’ Neotropical tree species, *Cordia alliodora*(Boraginaceae). *Journal of Biogeography*, **40**, 693–706
- Scotti-Saintagne C., Dick, C.W., Caron, H., Vendramin, G.G., Troispoux, V., Sire, P., Casalis, M., Buonamici, A., Valencia, R., Lemes, M.R., Gribel, R. & Scotti, I. (2013a). Amazon diversification and cross-Andean dispersal of the widespread Neotropical tree species *Jacaranda copaia* (Bignoniaceae). *Journal of Biogeography*, **40**, 707–719.
- Scotti-Saintagne C., Dick, C.W., Caron, H., Vendramin, G.G., Guichoux, E., Buonamici, A., Duret, C., Sire, P., Valencia, R., Lemes, M.R., Gribel, R. & Scotti, I. (2013b). Phylogeography of a species complex of lowland Neotropical rain forest trees (*Carapa*, Meliaceae). *Journal of Biogeography*, **40**, 676–692.
- Shanahan, M., So, S., Compton, S.G. & Corlett, R. (2001) Fig-eating by vertebrates frugivores: a global review. *Biological Reviews*, **76**, 529-572.
- Suguio, K., Angulo, R.J., Carvalho, A.M., Corrêa, I.C.S., Tomazelli, L.J., Willwock, J.A. & Vital, H. (2005). Paleoníveis do mar e paleolinhas de costa. *Quaternário do Brasil* (ed. by C.R.G Souza, K. Suguio, A.M.S. Oliveira and P.E. Oliveira P.E.), pp. 114-129. Ribeirão Preto: Holos.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A., Sing, C.F. (1995) A cladistic-analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA-sequence data. 3. Cladogram estimation. *Genetics*, **132**, 619–633
- Turchetto-Zolet, A.C., Cruz, F., Vendramin, G.G., Simon, M.F., Salgueiro, F., Margis-Pinheiro, M. & Margis, R. (2012a) Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae– Caesalpinioideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **65**, 174–182.

- Turchetto-Zolet, A.C., Pinheiro F., Salgueiro F. & Palma-Silva C. (2012b) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, **22**, 1193-1213.
- Verkerke, W. (1989). Structure and function of the fig. *Experientia*, **45**, 612–622.
- Zerega, N.J.C., Clement, W.L., Datwyler, S.L. & Weiblen, G.D. (2005) Biogeography and divergence times in the mulberry family (Moraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**, 402 – 416
- Weiblen, G.D. (2002). How to be a fig wasp. *Annual Review of Entomology*, **47**, 299-330.
- Wright, S. (1943). Isolation-by-distance. *Genetics*, **28**, 114-38
- Yu, H., Nason, J.D., Xuejun, G.E. & Zeng, J. (2010) Slatikin's Paradox: when direct observation and realized gene flow disagree. A case study in *Ficus*. *Molecular Ecology*, **19**, 4441 – 4453.
- Yu. H. & Nason, J.D. (2013). Nuclear and chloroplast DNA phylogeography of *Ficus hirta*: obligate pollination mutualism and constraints on range expansion in response to climate change. *New Phytologist*, **197**, 276–289.

CAPÍTULO 1

Conexões Amazônia – Mata Atlântica: estudo de caso com figueiras Neotropicais

RESUMO

As formações florestais úmidas da região Neotropical passaram por mudanças na distribuição geográfica ao longo de sua história evolutiva que influenciaram o grau de conectividade entre estas formações florestais. O objetivo deste estudo foi avaliar como estas mudanças afetaram os padrões filogeográficos de duas espécies próximas do gênero *Ficus* (*Ficus insipida* e *F. adhatodifolia*) que estão distribuídas alopatricamente nas formações florestais da Amazônia e Mata Atlântica. Marcadores cloroplastidiais (*trnH-psbA*, *trnS-trnG*) e um espaçador transcrito interno (ITS) foram utilizados para descrever a diversidade genética das espécies. A estruturação genética foi avaliada com rede de haplótipos. O tempo de divergência das linhagens reveladas pelo cpDNA foi estimado por uma abordagem coalescente bayesiana. Modelagens de nicho ecológico foram utilizadas para estimar as mudanças na distribuição das espécies durante o último período glacial do Pleistoceno. Padrões de expansão populacional foram observados para *F. insipida*, enquanto *Ficus adhatodifolia* apresentou uma baixa diversidade em todas as populações. Os resultados observados em ambas espécies estão relacionados com as mudanças de distribuição durante flutuações paleoclimáticas. Haplótipos compartilhados por *F. insipida* e *F. adhatodifolia* foram observados na região central da América do Sul, revelando uma provável zona de contato entre elas. Estes resultados reforçam a hipótese de que mudanças na distribuição das duas principais formações florestais da América do Sul influenciaram a diversidade genética de espécies que ocorrem em áreas mais úmidas e com vegetação mais densa. Portanto, as mudanças climáticas do Pleistoceno influenciaram tanto a distribuição da diversidade genética nas populações das duas espécies, quanto suas relações filogenéticas.

ABSTRACT

Rainforests of Neotropical region undergone changes in geographic distribution throughout its evolutionary history that influenced the degree of connectivity between these rainforests formations. The aim of this study was to evaluate how these changes affected the phylogeographic patterns of two closely species of the genus *Ficus* (*Ficus insipida* and *F. adhatodifolia*) that are distributed alopatricamente forest formations in the Amazon and Atlantic rainforest. Chloroplast markers (*trnH-psbA*, *trnS-trnG*) and an internal transcribed spacer (ITS) were used to describe the genetic diversity of the species. The genetic structure was evaluated with haplotype network. The divergence time of lineages revealed by cpDNA was estimated by a Bayesian coalescent approach. Ecological niche modeling were used to estimate the changes in species distribution during the last glacial period of the Pleistocene. Population growth patterns were observed for *F. insipida* whereas *Ficus adhatodifolia* showed a low diversity in all populations. The results observed in both species are related to the distribution changes during paleoclimatics fluctuations. Haplotypes are shared by *F. insipida* and *F. adhatodifolia* were observed in the central region of South America, revealing a possible contact area between them. These results reinforce the hypothesis that changes in the distribution of the two main forest formations in South America influenced the genetic diversity of species that occur in wetter areas with denser vegetation. Therefore, climate change Pleistocene influenced both the distribution of genetic diversity in populations species, and their phylogenetic relationships.

INTRODUÇÃO

O grau de conexão entre as principais formações florestais úmidas da região Neotropical é variável e dinâmico e está associado a própria heterogeneidade do ambiente e a eventos geológicos e climáticos que afetaram a região nos últimos milhões de anos (Burnham & Graham, 1999; Fiaschi & Pirani, 2009). As florestas da América Central e da Amazônia, por exemplo, eram isoladas geograficamente até a formação do Istmo do Panamá (~3.5 Ma) (Coates & Obando, 1996). Com a formação do Andes (início ~ 25 Ma; Parra, 2009), parte da floresta Amazônica foi dividida na região da província biogeográfica de Chocó, e este isolamento levou a formação da floresta tropical Andina (Gregory-Wodzicki, 2000). A floresta Amazônica e a Mata Atlântica, que estão situadas na América do Sul, estão separadas por uma zona climática seca que compreende savanas (Cerrado) e florestas sazonalmente secas, que juntas representam uma das maiores barreiras ao fluxo gênico entre espécies que ocorrem nas duas maiores formações florestais da América do Sul (Prado & Gibbs, 1993; Fiaschi & Pirani, 2009; Turchetto-Zolet *et al.*, 2012a).

Padrões observados em diversas espécies arbóreas que ocorrem nas formações florestais da América Central e da floresta Amazônica revelaram uma quebra filogeográfica entre as populações das florestas da América Central (*cis*) e as populações da floresta Amazônica (*trans*), resultando em uma separação de clados *cis* e *trans* Andinos. (Dick *et al.*, 2003; Dick & Heuertz, 2008; Hardesty *et al.*, 2010; Lemes *et al.*, 2010, Turchetto-Zolet *et al.* 2012b, Honório *et al.* 2014). Esta quebra filogeográfica pode ser explicada pelo modelo da vicariância no qual o último soerguimento dos Andes (~3.5 Ma) teria formado uma barreira importante ao fluxo gênico (Gregory-Wodzicki, 2000).

A porção central da América do Sul é considerada uma grande barreira ao fluxo gênico entre espécies das florestas úmidas. Esta região central é composta pelo Chaco mais ao sul, pelo Cerrado brasileiro na região central e pela Caatinga na região nordeste da América do Sul. Em

estudo realizado com a espécie arbórea *Schizolobium parahyba* (Leguminosae), que ocorre nas formações florestais da América Central e da América do Sul, incluindo Amazônia e Mata Atlântica, foi observada uma alta diferenciação entre as populações destas duas florestas, fato associado a presença deste corredor seco como barreira ao fluxo gênico (Turchetto-Zolet *et al.*, 2012a). Apesar das florestas Amazônica e Mata Atlântica parecerem isoladas, matas de galeria e manchas florestais de matas decíduas e semi-decíduas que ocorrem na região do Cerrado constituem uma rede de conexão entre as duas florestas (Oliveira-Filho & Ratter, 1995). Há também evidências de um aumento das coberturas florestais na região nordeste, onde hoje encontra-se a caatinga, durante o Pleistoceno que conectou a Amazônia à Mata Atlântica (De Oliveira *et al.*, 1999; Puerto *et al.*, 2001; Costa, 2003). Uma outra rota de conexão histórica entre as duas formações florestais ocorreu ao longo da bacia do rio Paraná (Por 1992). Aves, marsupiais e primatas utilizaram estas rotas para expandir sua distribuição nas duas principais formações florestais da América do Sul (Costa, 2003; Alfaro *et al.*, 2012; Batalha-Filho *et al.*, 2013).

A abordagem comparativa dos padrões geográficos da diversidade genética em espécies co-distribuídas ou em complexos de espécies pode revelar incongruências, como o compartilhamento de alelos entre estas espécies. Esta incongruência pode estar relacionada com processos de hibridização, que ocorrem principalmente quando há uma região de contato entre populações que divergiram há pouco tempo. O compartilhamento de alelos entre espécies próximas com divergência recente também está relacionado com a retenção de polimorfismo ancestral (*incomplete lineage sorting*), no qual espécies próximas apresentam traços genéticos similares que precedem sua separação (Maddison, 1997; Arbogast & Kenagy, 2001). Aliado aos estudos genéticos, a utilização de modelagem de distribuição permite a caracterização das exigências ambientais das espécies, que estão associadas a sua probabilidade de ocorrência em um determinado local (Guizan & Zimmermann, 2000). Além disso, a utilização de

paleomodelos permite inferir sobre os padrões de distribuição da diversidade genética relacionando-os à dinâmica da distribuição das espécies no passado e no presente (Colevatti *et al.*, 2012).

As plantas do gênero *Ficus* (Moraceae) são amplamente distribuídas na região Neotropical e são conhecidas por sua relação mutualística e obrigatória com seus polinizadores, que transportam pólen por longas distâncias (Kjellberg *et al.*, 2005; Harrison & Rasplus, 2006; Ahmed *et al.*, 2009). Além disso, estas espécies produzem uma grande quantidade de figos (infrutescência da planta), que contém centenas de sementes pequenas, que são consumidos por vertebrados frugívoros, principalmente morcegos e aves (Shanahan *et al.*, 2001). Em relação aos padrões geográficos da diversidade genética das figueiras na região Neotropical, há informações referentes a uma espécie da seção *Pharmacosycea* e outra da seção *Americana*. Em *F. insipida* subespécie *insipida* (seção *Pharmacosycea*) foi observada uma alta diferenciação entre as populações da América Central e da Amazônia (Honorio *et al.*, 2014). Essa diferenciação genética parece estar associada à baixa capacidade dos indivíduos desta espécie em se estabelecer em ambientes mais secos (Banack *et al.*, 2002; Coelho *et al.* 2014). De fato, formações sazonais separam essas duas regiões. Uma maior diferenciação foi observada no DNA de cloroplasto de *F. insipida* subespécie *insipida*, revelando que o fluxo gênico via semente é provavelmente restrito. Ao contrário, uma menor diferenciação do genoma nuclear indicou que o fluxo gênico via pólen é intenso, mesmo entre populações distantes geograficamente. Dados de uma espécie da seção *Americana*, *F. bonijesulapensis*, espécie endêmica das Florestas Sazonalmente Secas do Brasil, revelaram um padrão de expansão na direção sul, enquanto as diferentes formações da caatinga brasileira foram prováveis zonas de refúgio durante o Pleistoceno para esta espécie (Vieira *et al.*, 2015).

De acordo com a hipótese de expansão/retração da distribuição de espécies, a estruturação genética é moldada pelas as oscilações climáticas do Pleistoceno (Clark *et al.*,

2009; Stewart *et al.*, 2010). Espécies adaptadas a climas úmidos, por exemplo, retraíram sua distribuição durante os períodos glaciais mais secos, voltando posteriormente a sua distribuição mais ampla nos períodos mais úmidos do Pleistoceno (Palma-Silva *et al.*, 2009; Novaes *et al.*, 2010; Turchetto-Zolet *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2014). A estruturação e a diversidade genética observada nestas espécies, portanto, refletem este período de retração seguido de expansão. Aqui, nós verificamos se há a presença de estruturação genética em duas espécies filogeneticamente próximas de figueiras Neotropicais, *F. insipida* e *F. adhatodifolia*, e se esta estruturação está associada às oscilações climáticas do Pleistoceno. Além da estruturação genética, as oscilações climáticas deste período também podem influenciar o processo de diversificação de espécies próximas (Lorenz-Lemke *et al.* 2010). Aqui, nós também testamos se o isolamento reprodutivo entre *F. insipida* e *F. adhatodifolia* foi afetado pelas expansões e retrações do Pleistoceno, por meio da análise do relacionamento filogenético das linhagens das duas espécies no espaço e no tempo.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies estudadas

O gênero pantropical *Ficus* compreende cerca de 750 espécies (Berg, 2001). As espécies aqui estudadas pertencem ao subgênero *Pharmacosycea*, seção *Pharmacosycea*. A maioria das espécies desta seção estão associadas a ambientes mais úmidos, ficando assim restritas às formações florestais da região Neotropical (Berg & Villavicencio, 2004). Esta seção é composta por cerca de vinte espécies, e a maior riqueza de espécies ocorre no Equador, seguido dos países da América Central (Berg, 2012). *Ficus adhatodifolia* ocorre desde a região central da Bolívia até o norte da Argentina. No litoral do Brasil é frequentemente encontrada em áreas de Mata Atlântica desde o Rio Grande do Sul até a Bahia, onde sua frequência de ocorrência é mais baixa. *Ficus insipida* ocorre desde o México até a Bolívia, nas florestas mais úmidas, frequentemente encontrada nas margens de rios (Berg e Villavicencio, 2004). Esta espécie

compreende duas subespécies, uma que é amplamente distribuída (*insipida*), que ocorre desde a América Central ao norte da Bolívia, e a subespécie *scabra* que ocorre somente na região do Planalto Guiano. Segundo Berg & Villavicencio (2004), as duas espécies são frequentemente confundidas. Estes autores ainda ressaltam a possibilidade de *F. adhatodifolia* ser uma terceira subespécie de *F. insipida*. No entanto, a manutenção do *status* de espécie se deu pela distinção entre o tamanho da estípula terminal (*F. insipida* > 10 cm; *F. adhatodifolia* < 10 cm, geralmente entre 4,5-6,0 cm) e pela lâmina foliar que em *F. adhatodifolia* é muitas vezes pilosa enquanto em *F. insipida* é sempre glabra (Berg & Villavicencio, 2004). Não há registros de populações simpátricas destas espécies.

Coleta de dados, extração, amplificação e sequenciamento do DNA

Para *F. insipida* foram utilizadas amostras frescas e herborizadas de 28 populações na Amazônia e na América Central. Para *F. adhatodifolia* foram utilizados 60 indivíduos de 10 populações. Foram utilizadas as regiões não codificadoras do DNA cloroplastidial (cpDNA) *trnH-psbA* (Sang *et al.*, 1997) e *trnS-trnG* (Hamilton, 1999), além da região DNA ribossomal nuclear ITS (*Internal Transcribed Spacer*; White *et al.*, 1990). Estes marcadores foram escolhidos devido ao maior sucesso de amplificação e maior variabilidade dentre outros marcadores testados previamente em estudos com *Ficus* (Li *et al.*, 2012; Yu & Nason, 2012; Yu *et al.*, 2012; Honório *et al.*, 2014). A distância entre as populações variou entre 100 e 6000 km. Folhas jovens e sadias foram coletadas e desidratadas em sílica-gel. Para cada população amostrada foi confeccionada uma exsicata que foi depositada em herbário (Tabela S1).

O DNA foi extraído com CTAB (adaptado de Doyle & Doyle 1990) e com o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). As condições de amplificação foram: *trnH-psbA* - 95°C 2 min, 30 ciclos de 94°C – 1 min, 52°C – 50 s, 72°C – 1 min, e 72°C – 5min; *trnS-trnG* - 95°C 2 min, 35 ciclos de 94°C – 1 min, 50°C – 50 s, 72°C – 1 min e 72°C – 5min; ITS - 95°C 3 min, 30 ciclos de 95°C – 1 min, 50°C – 1 min, 72°C – 1 min e 30 s, e 72°C – 5min. Todos os

marcadores utilizados foram amplificados em reações de 25 µl contendo 0.2 mM de cada primer, 0.2 mM de dNTPs, 1 U de Taq DNA Polimerase (Promega), 1X de Tampão de PCR, 1,5 - 2,0 mM de MgCl₂ e 50 - 150 ng de DNA molde. As amplificações foram feitas em termociclador *Mastercycler®Gradient* (Eppendorf). Os produtos foram quantificados, purificados com PEG (polietilenoglicol) 20% e enviados para sequenciamento (20 ng de DNA por reação) em equipamento *ABI Prism 3100 automated DNA sequencer* (Applied Biosystems).

Diversidade genética e estruturação genética populacional

As sequências foram alinhadas usando o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) implementado no software MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2007). No cpDNA, regiões poli-A/T e microinversões, por apresentarem caráter homoplásico (Kelchner, 2000, Kim & Lee, 2004) não foram consideradas nas análises. *Indels* com mais de 1 pb foram codificados para representarem um evento mutacional. As duas regiões do cpDNA foram concatenadas para as análises.

Medidas de diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (h) (Nei, 1987), bem como a análise de variância molecular (AMOVA) foram utilizadas para avaliar a estruturação e a variação genéticas dentro e entre as populações das duas espécies estudadas. Essas análises foram realizadas utilizando os programas Arlequin ver. 3.5 (Excoffier *et al.*, 2009) e DNAsp (Librado & Rozas, 2009).

Para identificar grupos de populações geograficamente homogêneos e diferenciados geneticamente foi realizada uma análise espacial de variância molecular (SAMOVA) usando o programa Samova 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002). As análises foram feitas utilizando um número crescente de grupos K, até que todas as populações fossem alocadas em um número ótimo de grupos, com 100 simulações para cada K. O número de grupos ótimos foi selecionado quando os grupos apresentavam o maior F_{CT} (diferenciação entre grupos). Considerando que as duas espécies são muito próximas, o Samova foi feito com as espécies juntas, para testar a separação das espécies, e separadas para testar barreiras/grupos intraespecíficos. Também foi realizada

uma análise de estruturação genética populacional pelo Método bayesiano com o programa BAPS versão 5.3 (*Bayesian Analysis of Population Structure*) (Corander *et al.*, 2008). Este método utiliza a simulação de Monte Carlo via cadeias de Markov para formar agrupamentos biológicos por meio de estimativas das frequências alélicas em todas as populações.

As relações entre os haplótipos foram estimadas por rede de haplótipos construídas pelo método de *median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999) no programa NETWORK 4.5.0.0 (disponível em <http://www.fluxus-engineering.com>).

Para estimar o tempo de divergência e também avaliar o relacionamento filogenético entre os haplótipos foi utilizada a inferência bayesiana no programa BEAST 1.7.2 (Drummond *et al.* 2005). A reconstrução filogenética foi realizada utilizando a opção do relógio molecular relaxado (*uncorrelated lognormal relaxed molecular clock*). A *tree prior* utilizada foi o *Speciation - Yule Process*. Os modelos de substituição nucleotídica mais adequados aos dados foram identificados usando *Akaike Information Criterion*, que é implementado no JModelTest 2.1.4 (Posada 2008). Para ambos marcadores foi utilizada a opção do relógio molecular relaxado (*uncorrelated lognormal relaxed molecular clock*), com 5×10^6 cadeias, amostradas a cada 5000 gerações. A taxa evolutiva utilizada para o cpDNA foi de $1,1 \times 10^{-9} - 2,9 \times 10^{-9}$ substituições/sítio/ano (Wolfe *et al.* 1987), enquanto para o marcador ITS foi utilizada a taxa estimada para espécies arbóreas por Kay e colaboradores (2006) que variou de $2,0 \times 10^{-9}$ a $3,3 \times 10^{-9}$. *Ficus citrifolia* (subgênero *Spherozuke* seção *Americana*) foi utilizada como grupo externo. O software Tracer 1.6 (disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) foi utilizado para checar a convergência das Cadeias de Monte Carlo (MCMC) e o tamanho amostral efetivo adequado (>200). Depois disso, 10% das árvores geradas inicialmente foram deletadas como *burn-in*. O suporte estatístico dos dados foi determinado pela avaliação da probabilidade posterior Bayesiana. O tempo de coalescência para o ancestral comum mais recente foi calculado apenas para nós com probabilidade posterior > 0,9.

Modelagem de distribuição das espécies e análises demográficas

Além dos dados obtidos em campo, registros de ocorrência das espécies ao longo do Neotrópicos foram adquiridos no banco de dados Species Link (<http://splink.cria.org.br/>) e no banco de dados de pesquisa do professor Rodrigo A. S. Pereira (Universidade de São Paulo). Todos os registros foram avaliados para evitar prováveis erros de localização e identificação. Os dados de distribuição atual também foram utilizados para demonstrar a representatividade das amostras utilizadas nas análises moleculares realizadas no presente estudo (Figura S1).

Para a modelagem de distribuição nos cenários atual e no passado (140.000 e 21.000 anos atrás) foi utilizada a resolução espacial de 25 Km² e sete variáveis bioclimáticas, além de variável representando a altitude, todas disponíveis na base dados WordClim (disponível em: <http://www.worldclim.org/>) (Tabela S2). Inicialmente os modelos foram gerados com todas as camadas. Posteriormente novos modelos foram gerados com a exclusão da camada que apresentou menor contribuição, que foi selecionada por meio da técnica Jackknife (Giannini *et al.*, 2012).

Os modelos foram gerados no programa Maxent 3.3.3k (Disponível em <http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent/>). A calibração do modelo foi realizada por *bootstrap*, com 10 reamostragens de seleção aleatória dos pontos dividindo-se 70% dos pontos para treino do modelo e 30% para teste. O modelo final utilizado foi calculado pelos valores médios das reamostragens. O desempenho do modelo foi avaliado estatisticamente pelo AUC (Area Under the Curve), no qual o melhor desempenho do modelo é observado pelo valor mais próximo de 1 (Phillips & Dudík, 2008). Além disso, foram usadas a taxa de omissão e proporção binomial para entender o quanto o modelo foi omissor em prever a ocorrência dos pontos de teste e o quanto ele é significativo estatisticamente (Pearson, 2007). A ferramenta SDMToolbox foi utilizada em um programa SIG (Sistema de Informação Geográfica) para criar uma grade de densidade Gaussiana dando um peso maior para os pontos mais isolados na paisagem

geográfica (e.g., maior probabilidade de amostragem em locais de acesso mais fácil ou em áreas melhor estudadas). Esta ferramenta diminui o viés na amostragem envolvendo áreas extensas e foi incluída como uma camada no processo de modelagem (Brown, 2014).

Para inferir a história demográfica das espécies foram realizados dois testes de neutralidade: D de Tajima (1989) e F_s de Fu (1997), com 10000 simulações. A história demográfica de *F. insipida* e *F. adhatodifolia* foi investigada também pela análise de *mismatch distribution*, que analisa a distribuição de frequências das diferenças de bases (índice de Harpending Raggedness R) (Rogers & Harpending 1992). Nesta análise, populações que estiveram relativamente estáveis ao longo do tempo tem uma distribuição bimodal, enquanto populações que passaram por uma expansão demográfica recente apresentam uma distribuição unimodal. Estes testes foram utilizados para avaliar se houveram mudanças no tamanho populacional e foram feitos no programa Arlequin.

A análise *Bayesian Skyline Plot* (BSP) implementada no programa BEAST 1.7.2 (Drummond *et al.*, 2005) foi utilizada para estimar os tamanhos efetivos populacionais ao longo do tempo (em número de gerações) sem informações *a priori*. Os BSPs foram estimados com os dados de cpDNA e ITS, separadamente. Para esta análise, as taxas evolutivas foram as mesmas descritas para a construção da árvore bayesiana descrita anteriormente. O software Tracer 1.6 (disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) foi utilizado para checar a convergência das Cadeias de Monte Carlo (MCMC) e gerar o gráfico de reconstrução demográfica.

RESULTADOS

Variabilidade genética versus Estruturação genética

- cpDNA

Para os marcadores de cpDNA foram analisados 230 indivíduos no total (Tabela S1). Para o marcador de *trnH-psbA* foram alinhados 374 pares de bases no total, nos quais foram identificados 21 sítios polimórficos. O alinhamento do marcador *trnS-trnG* teve 654 pares de bases no total com sete sítios polimórficos. As análises foram realizadas com os marcadores concatenados, totalizando uma matriz de 1028 pares de bases. Para *F. insipida* 164 indivíduos amostrados em 29 populações foram utilizados nas análises (Tabela 1). Foram adicionadas sequências previamente depositadas no GenBank às análises realizadas no presente estudo (Tabela S1). Para *F. adhatodifolia* foram utilizados 64 indivíduos amostrados em 10 populações (Tabela 1).

A diversidade haplotípica total observada em *F. insipida* foi de 0,614, e variou entre 0 e 0,600 nas diferentes populações utilizadas nas análises, enquanto as únicas populações de *F. adhatodifolia* com diversidade haplotípica diferente de zero foram as N° 33 (0,400; Bahia) e N° 37 (0,200; Intervalos). A diversidade haplotípica total foi maior em *F. insipida* (0,614) do que em *F. adhatodifolia* (0,589; Tabela 1). Muitas populações foram monomórficas: 18 das 29 de *F. insipida* e oito das dez de *F. adhatodifolia* (Tabela 1; Figura 1). A diversidade nucleotídica foi maior nas populações de *F. insipida*, variando entre 0 e 0,0030, enquanto nas populações de *F. adhatodifolia* ficou entre 0 e 0,0008. No entanto, a diversidade nucleotídica total de *F. insipida* foi menor (0,0019) do que em *F. adhatodifolia* (0,0032; Tabela 1).

Considerando as duas espécies, 19 haplótipos foram observados para os marcadores de cpDNA (Tabela 1). Destes, 14 haplótipos são exclusivos de *F. insipida*, dos quais o H1 foi o mais amplamente distribuído ocorrendo em 21 das 29 populações estudadas desta espécie. Este também foi o haplótipo exclusivo em 14 populações. Somente um haplótipo (H5) foi observado em *F. insipida* subespécie *scabra* (população N° 24) na Guiana Francesa, e foi compartilhado com duas populações do Equador (N° 4 e 6) e uma da Bolívia (N° 28).

As populações de *F. insipida* da América Central não compartilharam nenhum haplótipo com as populações da América do Sul (Figura 1). Cinco haplótipos ocorreram nas populações de *F. adhatodifolia*. Destes, um haplótipo (H11) foi compartilhado com *F. insipida* (Figura 1). Este compartilhamento ocorreu entre as populações de *F. adhatodifolia* da região central da América do Sul (Nº 30, 31 e 32) e uma população de *F. insipida* da Amazônia peruana (Nº 9). Assim como na rede de haplótipos, na árvore bayesiana pode-se observar que há uma linhagem de *F. adhatodifolia* da Mata Atlântica em um clado separado (H16 - H19; probabilidade posterior >0.50) dos demais que inclui todos os haplótipos de *F. insipida* e de *F. adhatodifolia* da região central da América do Sul (Figura 2A). As relações entre os haplótipos observados nesta região também estão bem representadas pela rede de haplótipos (Figura 2B). Também pode-se observar dois clados da Mata Atlântica, um com os haplótipos que ocorreram na população Nº 33 da Bahia (H16 e H17), no nordeste do Brasil e outro com haplótipos que ocorreram na região sudeste Mata Atlântica (H18 e H19).

Tabela 1. Populações de *F. insipida* e *F. adhatodifolia* utilizadas no presente estudo, tamanho amostral (N), haplótipos observados e diversidade haplotípica e nucleotídica para os marcadores cloroplastidiais (*trnH-psbA* e *trnS-trnG*) e para a região ITS.

País	População	Lat	Long	DNAcp		ITS					
				N	Haplótipos	Div. Hap.	Div. Nuc.	N	Haplótipos	Div. Hap.	Div. Nuc.
<i>F. insipida</i>											
México	1. México	16,560	-92,780	1	H2	-	-	1	H1	-	-
Guatemala	2. Guatemala	15,687	-88,610	1	H3	-	-	-	-	-	-
Costa Rica	3. Costa Rica	9,115	-83,693	11	H3, H4	0,545	0,0028	9	H2, H3	0,222	0,0004
Panamá	3a. Panamá	9,160	-79,850	-	-	-	-	5	H2	0,000	0,0000
Equador	4. Jatun Sasha	-1,070	-77,620	5	H5, H6	0,600	0,0024	6	H2, H4	0,533	0,0012
Equador	5. Bogi	-0,700	-76,480	1	H1	-	-	1	H2	-	-
Equador	6. Yasuni	-0,661	-76,404	2	H5	-	-	2	H2	-	-
Peru	7. Yanamono	-3,449	-72,850	8	H1, H6	0,429	0,0004	7	H2, H4	0,286	0,0009
Peru	8. Madreselva	-3,620	-72,250	9	H1, H8	0,556	0,0005	6	H2	0,000	0,0000
Peru	9. Maray	-6,310	-76,660	6	H11	0,000	0,0000	7	H2, H5	0,286	0,0005
Peru	10. Urahuacha	-6,470	-76,330	6	H1, H12, H13	0,600	0,0030	6	H2, H4	0,333	0,0012
Peru	11. Jenaro Herrera	-4,900	-73,650	8	H1, H7	0,250	0,0005	6	H2	0,000	0,0000
Peru	12. San Jorge	-4,060	-73,200	6	H1	0,000	0,0000	5	H2	0,000	0,0000
Peru	13. von Humboldt	-8,829	-75,056	5	H1, H10	0,400	0,0004	5	H2	0,000	0,0000
Peru	14. Macuya	-8,873	-75,016	5	H1, H9, H10	0,700	0,0012	5	H2, H5	0,500	0,0008
Peru	15. La Genova	-11,090	-75,350	8	H1	0,000	0,0000	5	H2	0,000	0,0000
Peru	16. Santa Teresa	-11,186	-74,662	4	H1	0,000	0,0000	3	H2	0,000	0,0000
Peru	17. Cosha Cashu	-11,900	-71,365	4	H1	0,000	0,0000	4	H2	0,000	0,0000
Peru	18. Los Amigos	-12,569	-70,100	4	H1	0,000	0,0000	4	H2	0,000	0,0000

Tabela 1. Cont.

Peru	19. Qonec	-12,904	-71,373	9	H1	0,000	0,0000	6	H2, H6	0,000	0,0000
Peru	20. Tambopata	-12,841	-69,295	8	H1, H9	0,536	0,0011	3	H2	0,000	0,0000
Brasil	21. Acre	-10,599	-68,539	3	H1	0,000	0,0000	4	H2, H4	0,500	0,0012
Brasil	22. Rondônia	-8,649	-63,908	14	H1, H14	0,363	0,0004	8	H2, H4	0,250	0,0008
Brasil	23. Manaus	-3,174	-59,904	12	H1	0,000	0,0000	8	H2	0,000	0,0000
Guiana Francesa*	24. Guiana Francesa	4,657	-64,781	7	H5	0,000	0,0000	6	H2, H7	0,533	0,0008
Bolívia	25. Tahuamanu	-11,417	-69,018	4	H1	0,000	0,0000	4	H2, H4	0,500	0,0012
Bolívia	26. Abaroa	-11,159	-67,474	4	H1	0,000	0,0000	4	H2	0,000	0,0000
Bolívia	27. Maije	-14,348	-67,677	3	H1	0,000	0,0000	3	H2	0,000	0,0000
Bolívia	28. Sacta	-17,098	-64,781	7	H5, H15	0,476	0,0009	3	H2	0,000	0,0000
Bolívia	29. La Endívia	-17,680	-63,584	4	H1	0,000	0,0000	4	H2	0,000	0,0000
<i>F. adhatodifolia</i>											
Brasil	30. Bonito	-21,173	-56,447	11	H11	0,000	0,0000	5	H5	0,000	0,0000
Paraguai	31. Amabay	-22,351	-59,321	1	H11	-	-	1	H5	-	-
Brasil	32. Gália	-22,291	-49,553	1	H11	-	-	1	H5	-	-
Brasil	33. Bahia	-14,621	-39,355	6	H16, H17	0,400	0,0008	3	H5	0,000	0,0000
Brasil	34. Espírito Santo	-19,532	-40,460	3	H18	0,000	0,0000	3	H5	0,000	0,0000
Brasil	35. Barra Mansa	-22,591	-44,255	7	H19	0,000	0,0000	3	H5	0,000	0,0000
Brasil	36. Ubatuba	-23,368	-44,779	8	H18	0,000	0,0000	4	H5	0,000	0,0000
Brasil	37. Intervalos	-24,294	-48,423	10	H16, H18	0,200	0,0002	6	H2, H5, H9	0,833	0,0018
Brasil	48. Blumenau	-26,992	-49,116	11	H18	0,000	0,0000	9	H5	0,000	0,0000
Brasil	39. R. G. do Sul	-29,210	-51,287	6	H18	0,000	0,0000	3	H5	0,000	0,0000
TOTAL <i>F. insipida</i>		-	-	-	169	0,614	0,0019	144		0, 183	0,0004
TOTAL <i>F. adhatodifolia</i>		-	-	-	62	0,589	0,0032	39		0,101	0,0002

* *F. insipida* subsp. *scabra*

Figura 1. Distribuição geográfica dos haplótipos (A) e rede de haplótipos (B) baseadas nas sequências de cpDNA das populações de *F. insipida* e *F. adhatodifolia*. Na rede de haplótipos, os tamanhos dos círculos são proporcionais a frequência de cada haplótipo e cada traço nos ramos representa um passo mutacional.

Figura 2. Relações evolutivas entre os haplótipos do cpDNA de *F. insipida* e *F. adhatodifolia* da região Neotropical. Árvore filogenética feita pelo Método Bayesiano com as probabilidades posteriores (>0,5) mostradas abaixo dos ramos e a idade da separação dos dois principais clados observados para as linhagens de *F. insipida* e *F. adhatodifolia*.

A diversificação do clado que inclui as populações de *F. adhatodifolia* da Mata Atlântica ocorreu durante o Pleistoceno há cerca de 480 ± 360 ka (mil anos antes do presente). O clado que inclui os haplótipos H7, H15, H13 exclusivos de *F. insipida*, o haplótipo H5 que é compartilhado entre as duas subespécies de *F. insipida*, e o haplótipo H11 que foi compartilhado entre *F. insipida* e *F. adhatodifolia* também iniciou sua diversificação durante o Pleistoceno, há cerca de 490 ± 380 ka.

As análises AMOVA por espécie revelaram que 67,14% e 98,11% ($p < 0,0001$) da variação total ocorreram devido a diferenças entre as populações de *F. insipida* e *F. adhatodifolia*, respectivamente. As análises feitas com o programa SAMOVA com todas as populações das duas espécies revelaram que as populações de *F. adhatodifolia* da Mata Atlântica leste formaram um grupo separado quando $K = 2$ foi selecionado no SAMOVA ($F_{CT} = 0,68$; $p < 0,0001$).

As populações N° 9 e 10 de *F. insipida* na região da Amazônia Peruana e as populações N° 30, 31 e 32 de *F. adhatodifolia* (centro da América do Sul) ficaram agrupadas, quando o maior valor de F_{CT} foi atingido com $K=5$ ($F_{CT} = 0.82$; $p < 0,0001$). Considerando somente as populações de *F. insipida*, o maior valor de F_{CT} foi observado quando $K = 4$ ($F_{CT} = 0.80$; $p < 0,0001$). Os agrupamentos seguiram nesta ordem: Grupo I - populações da América Central; Grupo II - populações do Equador, da Bolívia e da Guiana Francesa; Grupo III - duas populações da Amazônia peruana; Grupo IV – demais populações de *F. insipida* (Tabela S3). Para *F. adhatodifolia* o maior F_{CT} foi para $K=2$ (0,95; $p < 0,0001$) (Tabela S3). No Grupo I, ficaram agrupadas as populações da região central da América do Sul (N° 30, 31 e 32), enquanto no grupo II ficaram as populações da Mata Atlântica leste.

De acordo com as análises realizadas no BAPS, as populações das duas espécies analisadas juntas estão separadas em sete grupos geneticamente estruturados para o cpDNA (Figura 3). Assim como observado com o SAMOVA, as populações de *F. adhatodifolia* que

ocorreram nas populações do interior América do Sul (Nº 30, 31 e 32) ficaram agrupadas com populações de *F. insipida* (Nº 9 e 10), enquanto as populações da Mata Atlântica leste ficaram isoladas em um grupo.

Quando levamos em consideração somente as populações de *F. insipida*, as análises feitas com o BAPS revelaram seis agrupamentos. Dois destes agrupamentos (Cluster 1 e 2) foram exclusivos da América Central (Figura 4). Porém, a Costa Rica também teve indivíduos agrupados no Cluster 6. Os demais agrupamentos tiveram indivíduos pertencentes a todas as populações de *F. insipida* da Amazônia, demonstrando que o fluxo gênico é intenso entre estas populações. Por sua vez, as análises feitas somente com as populações de *F. adhatodifolia* revelaram quatro grupos (Figura 5), demonstrando que também não há barreiras ao fluxo gênico entre as populações desta espécie.

- ITS

Para as análises da região ITS foram utilizados 181 indivíduos, sendo 142 indivíduos de *F. insipida* e 39 indivíduos de *F. adhatodifolia* (Tabela S1). Foram alinhados 635 pares de bases no total, nos quais foram identificados sete sítios polimórficos. Destes, cinco foram substituições nucleotídicas e dois foram *indels*. Para *F. insipida*, sequências previamente depositadas no GenBank foram adicionadas às amplificações realizadas no presente estudo (Tabela S1). Para *F. adhatodifolia* todas as sequências de ITS foram amplificadas no presente estudo.

As sequências de ITS revelaram uma baixa diversidade haplotípica e nucleotídica tanto para *F. insipida* (0,101 e 0,0002) quanto para *F. adhatodifolia* (0,183 e 0,0004) (Tabela 1). Foram observadas oito sequências no total para as duas espécies. A sequência H2 foi a mais frequente nas populações de *F. insipida* e ocorreu em 29 das 30 populações analisadas, e também foi observado na população Nº 37 de *F. adhatodifolia* (Intervales) (Figura 6).

Figura 3. Distribuição geográfica dos clusters (K=7) formados pela análise bayesiana de estruturação genética populacional com os haplótipos do cpDNA de *F. insipida* e *F. adhatodifolia*.

Figura 4. Distribuição geográfica dos clusters (K=6) formados pela análise bayesiana de estruturação genética populacional com os haplótipos do cpDNA de *F. insipida*.

Figura 5. Distribuição geográfica dos clusters ($K=4$) formados pela análise bayesiana de estruturação genética populacional com os haplótipos do cpDNA de *F. adhatodifolia*.

Dois haplótipos (H1 e H3) ficaram restritos a América Central. No entanto, diferente do DNACp cujas populações da América Central e da América do Sul ficaram isoladas, as sequências de ITS revelaram um compartilhamento de haplótipo (H2) entre as populações desta região. A sequência H7 foi exclusiva de *F. insipida* subsp. *scabra* (população N° 24). A sequência H5 foi a mais frequente nas populações de *F. adhatodifolia*, ocorrendo em todas as populações analisadas desta espécie. Assim como foi observado com o cpDNA, a população N° 9 de *F. insipida* também compartilhou sequências de ITS (H2). A população N° 14 de *F. insipida*, que fica a cerca de 400 km de distância da população N° 9, também compartilhou a sequência H5 com as populações de *F. adhatodifolia*. Das onze populações estudadas de *F. adhatodifolia* somente a de Intervalles – São Paulo (população N°37) não foi monomórfica para o H5, onde foi observado um haplótipo exclusivo (H8), e um haplótipo compartilhado (H1) com *F. insipida*, apesar da grande distância entre as populações das duas espécies (mais de 1000 km). A AMOVA por espécie não revelou valores significativo para *F. adhatodifolia* ($F_{ST} = -0,17$; $p = 0,872$) e para *F. insipida* ($F_{ST} = 0,03$; $p = 0,258$).

As análises de SAMOVA com as duas espécies juntas revelaram um maior valor de F_{CT} para $K=2$ ($F_{CT} = 0,80$ e $p < 0,0001$), com os grupos representando as populações das duas espécies. Quando as análises foram feitas com *F. insipida* e *F. adhatodifolia* separadamente, nenhum agrupamento deu resultado significativo. As análises feitas com o BAPS com as duas espécies analisadas juntas revelaram oito grupos (Figura 7). Quando foram analisadas somente as populações de *F. insipida* as espécies, sete clusters foram detectados (Figura 8). A análise feita somente com as populações de *F. adhatodifolia* apresentou baixos valores absolutos de mudança (<2.3) indicando que os indivíduos possivelmente poderiam ocorrer em qualquer um dos grupos ótimos (Kass & Raftery 1995). Portanto, apesar do número de grupos ótimo revelado pela análise ($K=3$), a localização dos indivíduos dentro dos grupos teve uma probabilidade de ocorrência muito baixa (dados não apresentados).

Figura 6. Distribuição geográfica dos haplótipos (A) e rede de haplótipos (B) baseadas nas sequências de ITS das populações de *F. insipida* e *F. adhatodifolia*. Na rede de haplótipos, os tamanhos dos círculos são proporcionais a frequência de cada haplótipo e cada traço representa um passo mutacional

Figura 7. Distribuição geográfica dos clusters (K=8) formados pela análise bayesiana de estruturação genética populacional com as sequências de ITS de *F. insipida* e *F. adhatodifolia*

Figura 8. Distribuição geográfica dos clusters (K=7) formados pela análise bayesiana de estruturação genética populacional com as sequências de ITS de *F. insipida*

Modelagem de distribuição e análises demográficas

Após analisar os pontos de ocorrência registrados na base de dados para *F. insipida* e *F. adhatodifolia*, foram selecionados 271 e 182 pontos de ocorrência, respectivamente, para a realização das modelagens. A modelagem de distribuição de *F. insipida* sugeriu que houve uma diminuição na distribuição potencial desta espécie durante o último máximo glacial, tanto na região da Amazônia quanto na América Central (Figura 9). Segundo a modelagem de distribuição atual, houve um aumento da probabilidade de ocorrência desta espécie na região central do Brasil, e uma diminuição na região do Planalto Guiano, onde ocorre atualmente a subespécie *scabra*.

Por sua vez, a modelagem de distribuição de *F. adhatodifolia* revelou uma retração das populações desta espécie durante o último máximo glacial, ficando restrita a região nordeste da Mata Atlântica, com limite de distribuição mais ao sul o Estado do Rio de Janeiro. (Figura 10). Também durante este período a espécie teve uma probabilidade de ocorrência na região central da América do Sul, que apesar de baixa, representa um provável deslocamento para a região central do Estado de Mato Grosso do Sul, e em parte do Paraguai (Figura 10B). Quando os modelos de adequabilidade ambiental do último máximo glacial de *F. adhatodifolia* e *F. insipida* foram observados juntos, uma sobreposição da distribuição das duas espécies pode ser observada na região da Bolívia e no Nordeste brasileiro (Figuras 11 e 12). No entanto, adequabilidade ambiental de *F. insipida* no Nordeste brasileiro é provavelmente um erro de sobreprevisão do modelo.

Figura 9. Modelos preditivos de distribuição de *F. insipida* nos cenários do Último Período Interglacial (A), do Último Máximo Glacial (B), e do período atual (C). Legenda indica as probabilidades de ocorrência segundo os modelos, que vão desde baixa probabilidade de ocorrência igual a 0 e alta probabilidade de ocorrência igual a 1.

Figura 10. Modelos preditivos de distribuição de *F. adhatodifolia* nos cenários do Último Período Interglacial (A), do Último Máximo Glacial (B), e do período atual (C). Legenda indica as probabilidades de ocorrência segundo os modelos, que vão desde baixa probabilidade de ocorrência igual a 0 e alta probabilidade de ocorrência igual a 1.

Figura 11. Área com adequabilidade ambiental durante o último máximo glacial, sugerindo uma possível zona de contato entre *Ficus adhatodifolia* (em verde) e *Ficus insipida* (em vermelho) na região da Bolívia e do Nordeste Brasileiro.

Figura 12. Área com adequabilidade ambiental durante o período interglacial, sugerindo uma possível zona de contato entre *Ficus insipida* (em verde) e *Ficus adhatodifolia* (em azul) na região da Bolívia.

As sequências de cpDNA revelaram padrões demográficos diferentes para as duas espécies. Para *F. insipida* o índice F_s de F_u não foi significativo ($F_s = -3.921$; $R = 0,09$; $p > 0,05$), enquanto o índice D de Tajima apresentou resultado significativo para expansão populacional ($D = -1,405$; $p < 0,05$). Esta hipótese também foi indicada pela distribuição unimodal dos dados revelada pela distribuição *mismatch* (Figura 13A), e pelos valores significativos de SSD (soma dos desvios dos quadrados) ($0,455$; $p < 0,05$). Os testes de neutralidade realizados com todas as populações de *F. adhatodifolia* não revelaram resultados significativos para o índice F_s de F_u ($F_s = 4.663$; $p > 0,05$) e para o índice D de Tajima ($D = 0,421$; $p > 0,05$). Além disso, o gráfico com a distribuição *mismatch* demonstrou um padrão bimodal (Figura 13B), assim como os valores SSD ($SSD = 0,07$; $p > 0,05$). O padrão bimodal pode estar relacionado com o compartilhamento de haplótipo com *F. insipida*.

Para as análises feitas com o marcador ITS, o índice D de Tajima não foi significativo para as populações de *F. insipida* ($D = -1,653$; $p > 0,05$). A distribuição *mismatch* apresentou distribuição unimodal (Figura 14A), porém os valores de SSD não foram significativos ($SSD = 0,407$; $p > 0,05$). Corroborando a hipótese de expansão observada pelo gráfico, o índice F_s de F_u apresentou valores significativos ($F_s = -5,931$; $p < 0,02$). Para *F. adhatodifolia*, quando todas as populações foram analisadas, os índices D de Tajima e F_s de F_u não foram significativos ($D = -1,489$; $F_s = -2,695$; $p > 0,05$). Apesar da distribuição *mismatch* ter mostrado um padrão unimodal (Figura 13B), o valor de SSD também não foi significativo ($SSD = 0,0001$; $p > 0,05$).

As reconstruções demográficas (*Bayesian Skyline Plot*) feitas tanto com o cpDNA quanto com o ITS não foi possível observar variações nos tamanhos populacionais tanto nas populações de *F. insipida* quanto as populações de *F. adhatodifolia*, que segundo estas estimativas se mantiveram estáveis (gráficos não apresentados).

Figura 13. Mismatch distribution das populações de *F. insipida* e *F. adhatodifolia*. A – *F. insipida*; B – *F. adhatodifolia*; C – *F. adhatodifolia* somente as populações da Mata Atlântica

Figura 14. *Mismatch distribution* das populações de *F. insipida* e *F. adhatodifolia*. A – *F. insipida*; B – *F. adhatodifolia*; C – *F. adhatodifolia* somente as populações da Mata Atlântica

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que *F. insipida* e *F. adhatodifolia* divergiram em alopatria nas duas principais formações florestais da América do Sul (Floresta Amazônica e Mata Atlântica), e as mudanças climáticas do Pleistoceno influenciaram tanto a distribuição da diversidade genética nas populações das duas espécies, quanto suas relações filogenéticas. A história demográfica das duas espécies influenciou a diversificação das populações de *F. adhatodifolia* na região de contato entre as duas principais formações florestais da América do Sul, e o compartilhamento de haplótipos entre as duas espécies em uma zona de contato histórico, sugerindo a ocorrência de hibridação entre as duas espécies. Como atualmente não há sobreposição na distribuição das duas espécies, e nenhum indivíduo intermediário foi observado, a hibridização atual entre elas parece improvável. Estes resultados demonstram que o estudo da dinâmica populacional com espécies arbóreas e amplamente distribuídas são importantes refletem a história evolutiva complexa das formações florestais da região Neotropical.

Padrões de diversidade genética e modelagens paleoclimáticas

Para ambas as espécies, as regiões cloroplastidiais e nuclear apresentaram algumas diferenças quanto ao padrão de variabilidade genética. As diversidades haplotípica e nucleotídica de *F. insipida* e *F. adhatodifolia* observadas nos marcadores cloroplastidiais foram muito maiores do que no marcador nuclear de sequência ITS. A baixa variação genética observada no ITS para ambas as espécies sugere um intenso fluxo gênico via pólen, o que é apoiado pelo modo de polinização desse grupo de plantas. De fato, vespas polinizadoras de figueiras podem percorrer dezenas de quilômetros para realizar a polinização (Ahmed *et al.*, 2009), indicando que o sucesso da polinização cruzada pode ocorrer mesmo entre indivíduos muito distantes espacialmente. Assim como foi observado

no presente estudo, o fluxo gênico via semente parece ser mais restrito em espécies de figueiras (Yu *et al.*, 2010; Yu & Nason, 2012), apesar da grande quantidade de frutos com sementes pequenas, que são consumidos por uma grande diversidade de vertebrados frugívoros, principalmente morcegos e aves (Shanahan *et al.*, 2001).

Os resultados da modelagem de distribuição potencial de *F. insipida* revelaram uma retração na região Amazônica durante o último período glacial, onde houve um aumento da sua adequabilidade na região dos rios Amazonas e Negro e no Peru, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname e Guiana Francesa (Figura 9). Durante este período, o clima na floresta ombrófila Amazônica se tornou mais seco, o que levou a ocorrência de manchas de floresta úmidas cercadas por uma vegetação menos densa composta por espécies tolerantes aos climas mais secos (Haffer & Prance, 2001; Behling, 1998). Portanto, a retração da ocorrência de *F. insipida*, uma espécie cuja distribuição está estritamente relacionada a corpos d'água, corroboram a hipótese de retração da floresta ombrófila Amazônica durante este período. Ainda segundo a modelagem, atualmente esta espécie teve uma expansão de sua distribuição, revelando um padrão mais similar ao período interglacial. A retração seguida de expansão corrobora os padrões a topologia “star-like” das redes de haplótipos construídas, na qual há um haplótipo central mais ancestral do qual os outros haplótipos se originaram (ver Avise 2000). A distribuição unimodal revelada no cpDNA, e os resultados significativos de pelo menos um dos índices de neutralidade também reforçam a hipótese de expansão. Além disso, as populações da Amazônia peruana apresentaram altos índices de diversidade para o cpDNA e para o ITS, fato que deve estar associado a presença de refúgios nesta região durante o último período glacial.

Por sua vez, a modelagem de distribuição de *F. adhatodifolia* revelou uma distribuição disjunta durante o último máximo glacial, com a permanência de uma região com maior probabilidade de ocorrência no Estado do Mato Grosso do Sul e parte do Paraguai

e outra que vai desde o Estado do Rio de Janeiro até o Estado do Pernambuco, na região Nordeste do Brasil. Neste cenário, as populações de *F. adhatodifolia* observadas atualmente no sudeste e em parte do centro-oeste do Brasil deixaram de ocorrer nestas regiões (ver Figura 11). Estudos palinológicos revelaram uma expansão de campos subtropicais na porção central e sul da América do Sul (Behling, 1998; Ledru *et al.*, 2006), que corresponde a região na qual foi observada a diminuição da probabilidade de ocorrência de *F. adhatodifolia* durante o último máximo glacial. Assim como *F. insipida*, *F. adhatodifolia* ocorre em ambientes mais úmidos, como matas ciliares e em remanescentes de matas estacionais semidecíduais da porção central da América do Sul, e esta característica está relacionada com a diminuição da probabilidade de ocorrência desta espécie nesta região.

Ainda segundo a modelagem de distribuição de *F. adhatodifolia* no cenário do último período glacial, as populações localizadas atualmente na região sul da Mata Atlântica também tiveram uma baixa probabilidade de ocorrência durante o último máximo glacial, ficando restritas a região norte da Mata Atlântica. Semelhante aos padrões observados na modelagem de distribuição de *F. adhatodifolia*, simulações paleoclimáticas revelaram a permanência de uma área de floresta na região norte da Mata Atlântica, entre o rio São Francisco, no nordeste brasileiro, e o rio Doce, no Espírito Santo durante o Pleistoceno (Carnaval & Moritz, 2008). Além das simulações, uma alta diversidade genética e a presença de alelos exclusivos caracterizaram a presença de um refúgio nesta região para diversas espécies de animais e plantas (Carnaval & Moritz, 2008; Palma-Silva *et al.*, 2009; Turchetto-Zolet *et al.*, 2012a). Apesar de apresentar padrões similares na modelagem de distribuição, os padrões genéticos observados nas populações de *F. adhatodifolia* não corroboram a hipótese de retração na Mata Atlântica, pois não foram observados haplótipos exclusivos das populações norte da Mata Atlântica (Nº 34 - Espírito Santo e Nº 33 - Bahia). Além disso, ao invés de uma alta diversidade na região norte, pode-se observar uma baixa diversidade

genética ao longo de toda a distribuição da espécie, onde cinco das sete populações foram monomórficas, apesar da grande distância entre as populações (mais de 2000 km entre a população da Bahia e do Rio Grande do Sul). A baixa diversidade genética pode estar relacionada com efeitos de gargalo de garrafa, que podem refletir mudanças drásticas na distribuição da espécie ao longo de toda a distribuição na Mata Atlântica leste. Além disso, a diversificação das linhagens de *F. adhatodifolia* da Mata Atlântica leste foi recente (~480 ka), fato que também pode estar relacionado com a baixa diversidade genética.

Mudanças paleoclimáticas e as relações entre as espécies

O compartilhamento de haplótipos entre populações muito distantes pode refletir uma variabilidade genética anterior ao tempo de divergência entre estas populações, chamada retenção de polimorfismos ancestrais (Pamilo & Nei 1988). Um exemplo disto é o compartilhamento do haplótipo H5 do cpDNA nas populações de *F. insipida* da Guiana Francesa, (N°24), da Bolívia (N°28) e do Equador (N°4), que estão há mais de 2000 km de distância. No entanto, considerando que a diversificação das linhagens de *F. insipida* datam do início do Pleistoceno, o isolamento entre estas populações e as demais pode ter levado a fixação deste haplótipo, nos períodos de expansão e retração da vegetação. Este isolamento fica evidente principalmente na população da Guiana Francesa (N°24), onde ocorre a subespécie *scabra*, cuja presença de uma sequência exclusiva de ITS (H7) e de um único haplótipo do cpDNA (H5), aliados a sutis diferenças morfológicas da subespécie *insipida* (em *scabra* a lâmina foliar é pilosa ou áspera) que reforçam a hipótese de fixação destes haplótipos por deriva genética durante as expansões/retrações do Pleistoceno.

Expansões populacionais em espécies amplamente distribuídas também podem levar ao contato entre espécies que divergiram em alopatria e, em casos de divergência recente, a hibridação seguida de introgressão (Cronn & Wendel, 2004). Se os períodos de expansão e sobreposição são seguidos de um período de retração populacional, estas populações ficam

isoladas e, por deriva genética, se diferenciam das demais, podendo manter os traços genéticos da introgressão. A sobreposição das populações mais periféricas de *F. adhatodifolia* e *F. insipida* na região central da América do Sul pode ter favorecido a ocorrência de eventos de introgressão. Em acordo com esta hipótese, a modelagem de distribuição revelou uma provável zona de contato entre *F. insipida* e *F. adhatodifolia* na região da Bolívia apesar da baixa sobreposição na distribuição. Esta sobreposição, aliada a separação das linhagens de *F. adhatodifolia* entre a Mata Atlântica costeira e a região central da América do Sul, podem estar relacionadas com uma retração populacional nesta região, que fixou os haplótipos de *F. insipida* por deriva genética nas populações do Paraguai, Mato Grosso do Sul e Peru.

Apesar de compartilharem haplótipos tanto no marcador cloroplastidial quanto no nuclear, este compartilhamento foi baixo e localizado somente em uma provável região de contato entre *F. insipida* e *F. adhatodifolia*. Estes resultados fornecem informações que corroboram a classificação proposta por Berg & Villavicencio (2004), na qual *F. adhatodifolia* é considerada uma espécie (e não subespécie) filogeneticamente próxima a *F. insipida*. Em um estudo realizado com *F. insipida* subespécie *insipida* esta espécie também foi considerada não monofilética (Honorio *et al.*, 2014). Neste trabalho foi utilizado somente um marcador de cpDNA nas análises filogenéticas, e a não monofilia da espécie foi revelada com a inclusão de outras espécies de *Ficus* da seção *Pharmacosycea* (*F. maxima*, *F. tonduzii* e *F. yoponensis*) nas análises de coalescência. A ausência de monofilia recíproca em *F. insipida* foi atribuída ao arranjo incompleto de linhagens comum em espécies amplamente distribuídas. No entanto, a presença de hibridização, com captura do cloroplasto não foi excluída, fato que corrobora os resultados aqui observados. A parafilia observada nos estudos com espécies da seção *Pharmacosycea*, que pode estar associada tanto a eventos de hibridação quanto a retenção de polimorfismos ancestrais, pode estar relacionada às

incertezas observadas na diversificação deste grupo dentro da filogenia do gênero *Ficus* (Cruaud *et al.*, 2012).

A ocorrência de hibridização já foi observada em espécies de *Ficus* da seção *Galoglychia* que ocorre na África (Renoult *et al.* 2012), do subgênero *Sycomorus* na Papua Nova Guiné (Moe & Weiblen 2012), e em um estudo feito com três espécies do complexo *Ficus auriculata–oligodon–hainanensis* do sul da China (Wei *et al.*, 2014). Entretanto, a alta diferenciação genética entre as linhagens parentais indica que os processos de especiação em figueiras estão mais associados ao isolamento ecológico e/ou geográfico do que com mecanismos pré-zigóticos que evitem a hibridização (Wei *et al.*, 2014). Portanto, assim como nas demais espécies do gênero *Ficus*, a hibridação parece ter influenciado a distribuição da diversidade genética em *F. insipida* e *F. adhatodifolia*, mas os principais processos que geraram os padrões observados parecem ter sido as alterações climáticas do Pleistoceno que afetaram as grandes formações florestais as quais estas espécies estão associadas.

A formação de dois clados principais nos marcadores cloroplastidiais, um com os haplótipos observados em *F. adhatodifolia* na Mata Atlântica, e outro que agrupou os haplótipos de ambas as subespécies de *F. insipida* aos haplótipos de *F. adhatodifolia* da região central da América do Sul reforçam a hipótese de hibridização ancestral das duas espécies. Especialmente na região onde populações de *F. adhatodifolia* compartilharam haplótipos de cpDNA de *F. insipida*, pode ter havido contato ancestral entre a Amazônia e a Mata Atlântica. A hipótese de contato é provável devido à expansão das duas formações florestais da América do Sul durante períodos climáticos mais favoráveis do que o atual (Behling *et al.*, 2002). Segundo estudo realizado com aves, há duas regiões principais de contatos históricos entre os dois biomas, um compreende a região sul do Cerrado, no centro-oeste brasileiro onde ocorre o Pantanal e o Chaco, e outro onde ocorre atualmente a Caatinga,

no nordeste brasileiro (Batalha-Filho *et al.*, 2013). Em outro estudo com pequenos mamíferos que ocorrem na Amazônia e na Mata Atlântica foi possível observar linhagens de ambas as localidades também no Cerrado brasileiro, e em alguns casos as populações do Norte da Mata Atlântica foram mais próximas das populações da Amazônia do que das populações do sul da Mata Atlântica (Costa 2003). Por (1992) também sugere a presença de uma mancha de floresta que conectou a Amazônia e a Mata Atlântica através de uma rota ao longo da bacia do Rio Paraná.

CONCLUSÕES

Com dados ecológicos e genéticos, o presente estudo reforçou a classificação morfológica feita anteriormente, na qual *F. insipida* e *F. adhatodifolia* foram consideradas espécies diferentes, apesar da grande similaridade entre elas. O estudo filogeográfico destas espécies demonstrou que mudanças paleoclimáticas que afetaram a distribuição das principais formações florestais da América do Sul também influenciaram os padrões de distribuição da diversidade genética nas populações de *F. insipida* e *F. adhatodifolia*, que ocorrem em áreas mais úmidas e com vegetação densa. Além disso, a comparação dos padrões encontrados com os marcadores cloroplastidiais e nucleares sugerem hibridação seguida de isolamento entre linhagens de *F. insipida* e *F. adhatodifolia* e reforçam as mudanças na distribuição de ambas as espécies ao longo do tempo com provável zona de contato entre a Amazônia e a Mata Atlântica na região centro-sul da América do Sul. Com estes resultados, podemos concluir que esta região pode favorecer o contato secundário entre espécies que diversificaram na Amazônia e na Mata Atlântica, e estudos como este com outros grupos de organismos podem melhorar nosso entendimento sobre a influência complexa das mudanças paleoclimáticas nos processos de diversificação de espécies na América do Sul.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, S., Compton, S.G., Butlin, R.K. & Gilmartin, P.M. (2009) Wind-borne insects mediate directional pollen transfer between desert fig trees 160 kilometers apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 20342-20347
- Alfaro, J.W.L., Boubli, J.P., Olson, L.E. Di Fiore, A., Wilson, B., Gutiérrez-Espeleta, G.A., Chiou K.L., Schulte, M., Neitzel, S., Ross, V., Schwochow, D., Nguyen, M.T.T, Farias I, Janson, C.H., Michael, E. (2012) Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. *Journal of Biogeography*, **39**, 272–288.
- Arbogast, B.S., Kenagy, G.J. (2001) Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*, **28**, 819-825.
- Avice, J.C. (2000) Phylogeography - the history and formation of species. Harvard 1 fig trees 160 kilometers apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 20342-20347.
- Banack, S.A., Horn, M.H., Gawlicka, A., (2002) Disperser- vs. establishment-limited distribution of a riparian fig tree (*Ficus insipida*) in a Costa Rican tropical rain forest. *Biotropica*, **34**, 232–243.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.
- Batalha-Filho, H, Fjeldså, J., Fabre, P-H., Miyaki, C.Y. (2013) Connections between the Atlantic and the Amazonian forest avifaunas represent distinct historical events. *Journal of Ornithology*, **154**, 41-50.
- Behling, H., Lichte, M., (1998). Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical Southeastern Brazil. *Quaternary Research*, **48**, 348-358
- Behling, H, Hooghiemstra, H. (2001) Neotropical savanna environments in space and time: late Quaternary interhemispheric comparisons. *Interhemispheric Clim Linkages* (ed. by V. Markgraf), pp. 307–323. Academic Press, New York, NY.
- Behling, H. (2002). South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **177**, 19 – 27.
- Berg, C.C. (1989) Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia*, **45**, 605-611.
- Berg, C.C. (2001) Moreae, Artocarpeae, and Dorstenia (Moraceae), with introductions to the family and *Ficus* and with additions and corrections to Flora Neotropica Monograph 7. *Flora Neotropica*, **83**, 1–346.

- Berg, C.C. & Villavicencio, X. (2004) Taxonomic studies on *Ficus* (Moraceae) in the West Indies, extra-Amazonian Brazil and Bolivia. *Illicifolia*, **5**, 1-132.
- Berg, C.C. (2012) Moraceae. *Flora Mesoamericana* (ed. by G. Davidse, M. Sousa, S. Knapp and F. Chiang), pp 1-9. Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF.
- Burnham, R.J., Graham, A., (1999) The history of Neotropical vegetation: new developments and status. *Annals of Missouri Botanical Garden*, **86**, 546–589.
- Brown, J.L. (2014) SDMTtoolbox: a python based GIS toolkit for landscape genetic, biogeographic and species distribution model analysis. *Methods in Ecology and Evolution*, **5**, 694-700.
- Carnaval, A.C, Moritz, C. (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, **35**, 1187–1201
- Clark, P.U., Dyke, A.S., Shakun, J.D. *et al.* (2009) The last glacial maximum. *Science*, **325**, 710–714
- Coates, A.G. & Obando, J.A. (1996) The geologic evolution of the Central American Isthmus. *Evolution and environment in tropical America* (ed. by J.B.C Jackson, A.F. Budd and A.G. Coates), pp. 21-56. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Coelho, L.F.M, Ribeiro, M.C. & Pereira, R.A.S. (2014) Water availability determines the richness and density of fig trees within Brazilian semideciduous forest landscapes. *Acta Oecologica*, **57**, 109 – 116.
- Costa, L.P. (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*, **30**, 71–86.
- Collevatti, R.G., Lima-Ribeiro, M.S., Souza-Neto, A.C., Franco, A.A. & Terribile, L.V. (2012a) Recovering the demographical history of a Brazilian Cerrado tree species *Caryocar brasiliense*: coupling ecological niche modeling and coalescent analyses. *Natureza & Conservação*, **10**, 169–176
- Corander, J., Siren, J., Arjas, E., (2008) Bayesian spatial modeling of genetic population structure. *Computation Stat.* **23**, 111–129.
- Cronn, R., & Wendel, J.F. (2004) Cryptic trysts, genomic mergers, and plant speciation. *New Phytologist*, **161**, 133–142.
- Cruaud, A. *et al.* (2012) An Extreme Case of Plant-Insect Codiversification: Figs and Fig-pollinating Wasps. *Systematic Biology*, **61**, 1029-1047.
- De Oliveira, P.E., Barreto, A.M.F. & Sugiro, K. (1999) Late Pleistocene/Holocene climatic and vegetational history of the Brazilian Caatinga: the fossil dunes of the middle São

- Francisco River. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **152**, 319–337.
- Dick, C.W., Kobinah, A-S., Bermingham, E. (2003) Molecular Sysyematic Analysis reveals cryptic tertiary diversification os a widespread tropical rain forest tree. *The American Naturalist*, **162**, 1–13.
- Dick, C.W. & Heuertz, M. (2008) The complex biogeographic history of a widespread tropical tree species. *Evolution*, **62**, 2760–2774.
- Doyle, J.L., 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**, 13–15.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B. & Pybus, O.G. (2005) Bayesian coalescent inference of last population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 1185–1192
- Dupanloup, I., Schneider, S. & Excoffier, L., (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2571–2581
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47–50.
- Excoffier, L., Foll, M. & Petit, R.J. (2009) Genetic Consequences of Range Expansions. *Annual Reviews*, **40**, 481 – 501.
- Fiaschi, P. & Pirani, J. (2009) Review of plant biogeographic studies in Brazil. *Journal of Systematics and Evolution*, **47**, 477-496.
- Fu, Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915–925.
- Guisan, A. & Zimmermann, N.E. (2000) Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modelling*, **135**, 147-186.
- Lorenz-Lemke, A.P., Togni, P.D., Mader, G., Kriedt, R.A., Stehmann, J.R., Salzano, F. M. & Bonatto, S.L. (2010) Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South American highlands: a phylogeography perspective on native *Petunia* (Solanaceae). *Molecular Ecology*, **19**, 5240 – 5251.
- Giannini, T.C., Siqueira, M. F., Acosta, A. L., Barreto, F. C. C., Saraiva, A. M., Alves dos Santos, I. (2012) Desafios atuais da modelagem preditiva de distribuição de espécies. *Rodriguésia*, **63**, n. 3.
- Gregory-Wodzicki, K.M. (2000) Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Geological Society of America Bulletin*, **112**, 1091-1105.
- Haffer, J. (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, **165**, 131–137.

- Haffer, J. & Prance, G.T. (2001) Climatic forcing of evolution in Amazonia during Cenozoic: On the refuge theory of biotic differentiation. *Amazoniana*, **16**, 579 – 608.
- Hardesty, B.D., Dick, C.W., Hamrick, J.L., Degen, B., Hubbell, S.P. & Bermingham, E. (2010) Geographic influence on genetic structure in the widespread Neotropical tree *Simarouba amara* (Simaroubaceae). *Tropical Plant Biology*, **3**, 28–39.
- Harrison, R.D. & Rasplus, J.-Y. (2006) Dispersal of fig pollinators in Asian tropical rain forests. *Journal of tropical Ecology*, **22**, 631–639
- Hamilton, M.B. (1999) Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, **8**, 513–525.
- Hewitt, G.M. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.
- Honorio Coronado, E.N., Dexter, N.G., Poelchau, M., Hollingsworth, P.M., Phillips, O.L. & Pennington, T.R. (2014) *Ficus insipida* subsp. *insipida* (Moraceae) reveals the role of ecology in the phylogeography of widespread Neotropical rain forest tree species. *Journal of Biogeography*, **41**, 1697 – 1709
- Hooghiemstra, H. & Van Der Hammen, T. (1998) "Neogene and Quaternary development of the Neotropical rain forest: the forest refugia hypothesis and a literature overview". *Earth Science Reviews*, **44**, 147–83
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A. & Stevens, P.F. (1999) *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Kay, K.M, Whittall, J.B. & Hodges, S.A. (2006) A survey of nuclear ribosomal internal transcribed spacer substitution rates across angiosperms: an approximate molecular clock with life history effects. *BMC Evolutionary Biology*, **6**, 36.
- Kelchner, S.A. (2000) The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Annals of Missouri Botanical Garden*, **87**, 499 – 527.
- Kim, K.-J., & Lee, H.-L., (2004) Complete chloroplast genome sequences from Korean ginseng (*Panax schinseng* Nees) and comparative analysis of sequence evolution among 17 vascular plants. *DNA Research*, **11**, 247–261.
- Kuhner, M.K. (2006) LAMARC 2.0: Maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics*, **22**, 768–770.
- Kjellberg F., Jouselin, E., Hossaert-McKey, M. & Rasplus, J.-Y. (2005) Biology, Ecology and Evolution of Fig-pollinating Wasps (Chalcidoidea, Agaonidae). *Biology, ecology and evolution of gall-inducing arthropods* (ed. by A. Raman, C.W. Schaefer, and T.M. Withers), pp. 539–571. New Hampshire, Science.
- Ledru, M.P., Ceccantini, G. & Gouveia, S.E.M. (2006) Millennial scale climatic and vegetation changes in a northern Cerrado (Northeast, Brazil) since the last glacial maximum. *Quaternary Science Reviews*, **25**, 1110–1126.

- Lemes, M.R., Dick, C.W., Navarro, C., Lowe, A.J., Cavers, S. & Gribel, R. (2010) Chloroplast DNA microsatellites reveal contrasting phylogeographic structure in mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) from Amazonia and Central America. *Tropical Plant Biology*, **3**, 40–49.
- Li, H.-Q, Chen, J.-Y., Wang, S. & Xiong, S.-Z. (2012) Evaluation of six candidate DNA barcoding loci in *Ficus* (Moraceae) of China. *Molecular Ecology*, **12**, 783–790.
- Librado, P. & Rozas, J., (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451–1452.
- Maddison, W.P. (1997) Gene trees in species trees. *Systematic Biology*, **46**, 523–536.
- Moe, A.M., Weiblen, G.D. (2012) Pollinator-mediated reproductive isolation among dioecious fig species (*Ficus*, Moraceae). *Evolution*, **66**, 3710–3721.
- Nei, M. (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press: New York.
- Oliveira-Filho, A.T. & Ratter, J.A. (1995) A study of the origin of Central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edinburg Journal of Botany*, **52**, 141–194.
- Palma-Silva, C., Lexer, C., Paggi, G.M., Barbará, 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*, **103**, 503–512.
- Pamilo, P, Nei, M. (1988) Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, **5**, 568–583.
- Parra, M., Mora, A., Sobel, E. R., Strecker, M.R., González, R. (2009). Episodic orogenic front migration in the northern Andes: Constraints from low-temperature thermochronology in the Eastern Cordillera, Colombia. *Tectonics*, **28**, 1 – 27.
- Pearson, R.G. (2007) *Species' Distributions Modeling for Conservation Educators and Practitioners*. National Science Foundation.
- Phillips, S.J. & Dudík, M. (2008) Modeling of species distributions with maxent: New extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*, **31**, 161–175.
- Poelchau, M.F. & Hamrick, J.L. (2011) Comparative phylogeography of three common Neotropical trees. *Journal of Biogeography*, **40**, 618–631.
- Por, F.D. (1992) *Sooretama: the Atlantic rain forest of Brazil*. SPB Academic Publishing, The Hague.
- Posada, D. & Crandall, K.A. (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 37–45.

- Posada, D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253–1256.
- Prado D.E. & Gibbs P.E., (1993) Patterns of species distributions in the dry seasonal forest South America. *Annals of Missouri Botanical Garden*, **80**, 902–927.
- Puerto, G., Salomao, M.G., Theakston, R.D.G., Thorpe, R.S., Warrell, D.A. & Wuster, W. (2001) Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic Forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Journal of Evolutionary Biology*, **14**, 527–538
- Renoult J.P, Kjellberg, F., Grout, C., Santoni & S., Khadari, B. (2012) Cyto-nuclear discordance in the phylogeny of *Ficus* section *Galoglychia* and host shifts in plant-pollinator associations. *BMC Evolutionary Biology*, **9**, 248.
- Rogers, A.R & Harpending, H. (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* **9**: 552-569
- Sang, T., Crawford, D.J. & Stuessy, T.F. (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, **84**, 1120–1136.
- Shanahan, M., So S., Compton, S.G. & Corlett, R. (2001) Fig-eating by vertebrates frugivores: a global review. *Biological Reviews*, **76**, 529-572.
- Stewart, J.R., Lister, A.M., Barnes, I. & Dalén, L. (2010) Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, **277**, 661–671.
- Tajima F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585–595.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. **24**, 1596–1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) Clustal-w - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673–4680.
- Turchetto-Zolet, A.C., Pinheiro F., Salgueiro F. & Palma-Silva C. (2012a) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, **22**, 1193-1213.
- Turchetto-Zolet, A.C., Cruz, F., Vendramin, G.G., Simon, M.F., Salgueiro, F., Margis-Pinheiro, M. & Margis, R. (2012b) Large-scale phylogeography of the disjunct

- Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae– Caesalpinioideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **65**, 174–182
- Vieira, F.A., Novaes, R.M.L., Fajardo, C.G., Santos, R.M., Almeida, H.S., Carvalho, D. & Lovato, M.B. (2015) Holocene southward expansion in seasonally dry tropical forests in South America: phylogeography of *Ficus bonijesulapensis* (Moraceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **155**, 189–201.
- Yu, H., Nason, J.D., Xuejun, G.E. & Zeng, J. (2010) Slatikin's Paradox: when direct observation and realized gene flow disagree. A case study in *Ficus*. *Molecular Ecology*, **19**, 4441–4453.
- Yu, H. & Nason, J.D. (2013) Nuclear and chloroplast DNA phylogeography of *Ficus hirta*: obligate pollination mutualism and constraints on range expansion in response to climate change. *New Phytologist*, **197**, 276–289.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* (ed. by M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Shinsky and T.J. White), pp. 315–322. Academic Press, San Diego, CA.
- Wolfe, K.H., Li, W.H. & Sharp, P.M. (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **84**, 9054–9058.
- Wei, Z.-D., Kobmoo, N., Cruaud, A., Kjellberg, A. (2014). Genetic structure and hybridization in the species group of *Ficus auriculata*: can closely related sympatric *Ficus* species retain their genetic identity while sharing pollinators? *Molecular Ecology*, **23**, 3538–3550.

CAPÍTULO 2

Filogeografia de *Ficus citrifolia*, uma figueira hemiepífita Neotropical

RESUMO

Ficus citrifolia é uma figueira hemiepífita amplamente distribuída nos Neotrópicos ocorrendo em ambientes heterogêneos, tais como áreas antropizadas. O objetivo deste estudo foi investigar como as flutuações climáticas do Pleistoceno influenciaram a distribuição da diversidade genética de *F. citrifolia*, e os mais prováveis centros de origem e dispersão por meio de análises filogeográficas. Para responder estas questões, marcadores cloroplastidiais (*trnH-psbA*, *trnS-trnG*) foram utilizados. A estruturação genética foi avaliada com uma análise espacial de variância molecular, uma análise bayesiana da estruturação populacional e rede de haplótipos. Modelagens de distribuição espacial foram utilizadas para estimar as mudanças na distribuição de *F. citrifolia* durante o último período glacial, e a presença de expansões/retrações populacionais foram avaliadas usando testes de neutralidade, análises de coalescência e a topologia da rede de haplótipos e da árvore. O tempo de divergência das linhagens foi estimado por uma abordagem coalescente bayesiana. Foram observados 15 haplótipos nas 14 populações estudadas. A presença de haplótipos fixados demonstraram que as populações de *F. citrifolia* estiveram sob forte efeito de deriva genética. A divergência recente das linhagens, aliada a uma alta diferenciação populacional sem estruturação geográfica podem estar associados a eventos de dispersão a longas distâncias, seguidos de efeitos do fundador. Além disso, a ausência de monofilia recíproca intraespecífica em *F. citrifolia* foi evidenciada pelo arranjo incompleto das linhagens. A ausência de estruturação geográfica da diversidade genética nas populações de *F. citrifolia* reforça a hipótese de expansão das formações vegetais mais abertas na América do Sul durante o Pleistoceno, que consequentemente favoreceram a expansão de espécies adaptadas a estes ambientes. Por outro lado, o padrão agregado de distribuição de *F. citrifolia* aliado ao baixo tamanho populacional observado levou a uma alta diferenciação entre as populações, apesar da presença de características biológicas que favoreceram a ocorrência de eventos frequentes de colonização durante o Pleistoceno.

ABSTRACT

F. citrifolia is a hemi-epiphyte fig tree widely distributed in the Neotropics that occurs in heterogeneous environments, such as disturbed areas. The aim of this study was to investigate how Pleistocene climatic fluctuations influenced the distribution of genetic diversity of *F. citrifolia*, and the more probable centers of origin and dispersal through phylogeography analysis. To answer these questions, chloroplast markers (trnH-psbA, trnS-trnG) was used. The genetic structuration was assessed using a spatial analysis of molecular variance, a bayesian analysis of population structure and networks. Spatial distributions models were used to characterize the distributions changes of *F. citrifolia* during the last glacial maximum, and the occurrence of expansion/retraction was assessed by neutrality tests, coalescence analysis and the topology of the networks and the tree. The divergence time of the lineages was estimated by a bayesian coalescent approach. Fifteen haplotypes was observed in the 14 populations. The presence of fixed haplotypes demonstrated that populations of *F. citrifolia* were under strong genetic drift. The recent lineage divergence coupled to a high populational differentiation without geographic structuration may be associated to long distance dispersal events, followed by founder effects. Also, the intraespecific non-monophyly in *F. citrifolia* was related to incomplete lineage sorting. The lack of geographic structure of genetic diversity in the populations of *F. citrifolia* supports the expansions hypothesis of more open plant formations in South America during the Pleistocene, which in turn favored the occurrence of species adapted to these environments. On the other hand, the aggregate pattern of distribution coupled to the low effective population size may be related to the high differentiation between populations, in spite of the biological traits of *F. citrifolia* that favored the frequent colonization events during the Pleistocene.

INTRODUÇÃO

As figueiras (*Ficus*, Moraceae) constituem um dos maiores gêneros pantropicais de angiospermas (Frodin, 2004), com quase 800 espécies que podem ser arbóreas, arbustivas, hemiepífitas e trepadeiras. O gênero possui como sinapomorfia a inflorescência do tipo sicônio ou figo, que apresenta receptáculo em forma de urna, onde se encerram as flores. As figueiras têm uma interação mutualística e obrigatória com vespas polinizadoras da família Agaonidae (Weiblen, 2002). Segundo dados moleculares, esta associação surgiu há cerca de 70 milhões de anos (Ronsted *et al.* 2005; Cruaud *et al.*, 2011). As vespas polinizadoras das figueiras são responsáveis pelo transporte de pólen por longas distâncias (~80 km; Ahmed *et al.*, 2009), fazendo com que o fluxo gênico via pólen seja intenso na maioria das espécies de figueiras. O intenso fluxo gênico via pólen entre populações de *Ficus hirta* Vahl foi revelado por marcadores microssatélites em dois estudos com esta espécie realizados na China, mesmo com uma ampla extensão da área de estudo (2800 km) (Yu *et al.*, 2010, Yu & Nason, 2012). Por sua vez, o fluxo gênico via semente revelado por marcadores de sequência cloroplastidiais foi extremamente baixo nestes estudos, dada a alta diferenciação das sequências observadas entre as populações. Estes resultados sugerem que o fluxo gênico via semente parece ser mais restrito, apesar da alta produção de frutos com sementes pequenas (ca. 10-30 mm), que são consumidos por uma grande diversidade de vertebrados frugívoros, principalmente morcegos e aves (Shanahan *et al.*, 2001).

Cerca de 120 espécies de figueiras ocorrem nas Américas (Berg, 1989). No Brasil, as espécies do subgênero *Spherozuke* seção *Americana* são conhecidas popularmente como figueiras-mata-pau devido ao seu hábito hemiepífítico (Berg & Villavicencio, 2004). *Ficus citrifolia* Mill pertence a este subgênero e é amplamente distribuída em diferentes formações vegetacionais dos Neotrópicos (Figura S1; Berg & Villavicencio, 2004). Sua distribuição inclui desde o sul da Flórida (EUA), o México, as Ilhas do Caribe, a América Central,

passando por toda a América do Sul até a Argentina. No Brasil ocorre principalmente na região centro-oeste e sudeste do Brasil, sendo pouco abundante em Goiás, assim como na região norte onde se localiza a floresta Amazônica. Os principais dispersores de *F. citrifolia* são morcegos e aves. Em um estudo realizado com aves consumidoras de *Ficus* em fragmentos de mata do Estado de São Paulo foi observado que o consumo de figos de *F. citrifolia* por morcegos foi visivelmente maior do que o consumo por aves, apesar de somente o consumo por aves ter sido quantificado (Lapate, 2009). Devido ao seu hábito hemiepífítico, *F. citrifolia* pode se estabelecer em cima de outras árvores, em fendas de rochas e até mesmo edificações, se desenvolvendo com facilidade em áreas perturbadas (Pereira *et al.*, 2007, Coelho *et al.*, 2014). Em estudo realizado em fragmentos de mata do Estado de São Paulo, *F. citrifolia* teve a distribuição da sua densidade relacionada a ambientes heterogêneos, evidenciando seu caráter generalista (Coelho *et al.*, 2014).

As flutuações da temperatura e umidade durante o Pleistoceno alteraram de forma significativa a paisagem da região Neotropical, onde eras interglaciais úmidas e quentes foram intercaladas por longas eras glaciais frias e secas. O aumento da sazonalidade durante os períodos glaciais pode ter restringido a distribuição da floresta Amazônica a manchas de vegetação densa nas proximidades de rios e montanhas da região, os chamados refúgios pleistocênicos (Haffer & Prance, 2001). Assim como as florestas úmidas, as savanas Neotropicais (como o Cerrado) e as Florestas Sazonalmente Secas (como a Caatinga e o Chaco) sofreram mudanças complexas em sua distribuição. Mas ao contrário das florestas úmidas, na porção norte da América do Sul estas formações se expandiram durante os períodos glaciais (Mayle *et al.*, 2004; Pennington *et al.*, 2009), ao passo que na porção central e sul houve expansão dos campos subtropicais (Behling, 2002, Ledru *et al.*, 2006). Como resultado destas mudanças, a distribuição da variabilidade genética intraespecífica e os padrões de fluxo

gênico interpopulacionais na região Neotropical foram afetados (Turchetto-Zolet *et al.*, 2012a).

Os processos evolutivos que influenciaram a diversidade genética de espécies arbóreas de ampla distribuição na região Neotropical estão associados à grande extensão geográfica desta área e sua alta variedade de climas e formações vegetais (Turchetto-Zolet *et al.*, 2012a). Padrões observados em diversas espécies arbóreas que ocorrem nas formações florestais da América Central e da floresta Amazônica revelaram uma quebra filogeográfica entre as populações das florestas da América Central (*cis*) e as populações da floresta Amazônica (*trans*), resultando em uma separação de clados *cis* e *trans* Andinos (Dick *et al.*, 2003; Dick & Heuertz, 2008; Hardesty *et al.*, 2010; Lemes *et al.*, 2010, Turchetto-Zolet *et al.* 2012b, Honório *et al.* 2014). Esta quebra filogeográfica está relacionada com o soerguimento mais recente dos Andes (~3,5 Ma) (Gregory-Wodzicki, 2000).

Já na América do Sul, o estudo filogeográfico realizado com a leguminosa *Plathymenia reticulata* Benth. (Mimosoideae), que ocorre no Cerrado e na Mata Atlântica, encontrou padrões de retração populacional e da presença de um refúgio na porção norte do Cerrado durante as eras glaciais (Novaes *et al.*, 2010). Por sua vez, múltiplos refúgios foram detectados ao longo da distribuição da espécie típica do Cerrado, *Caryocar brasiliense* Cambess. (Caryocaraceae; Colevatti *et al.*, 2012a), e da palmeira de áreas alagadas do Cerrado (veredas), *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae; Lima *et al.*, 2014). Diferentemente, padrões de expansão populacional durante os períodos glaciais foram observados para as espécies de Cerrado *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl. (Bignoniaceae; Collevatti *et al.*, 2012b) e para *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae), cuja distribuição disjunta atual é um remanescente de uma ampla população ancestral (Colevatti *et al.*, 2012c).

Estudos filogeográficos de espécies arbóreas da região Neotropical são importantes para compreender como suas populações foram influenciadas pelos eventos paleoclimáticos

Terciário/Quaternário. Neste estudo nós verificamos se as populações de *F. citrifolia* foram afetadas por estas mudanças climáticas, com análises filogeográficas baseadas em regiões não codificadoras do DNA cloroplastidial. Tendo em vista este objetivo, as hipóteses levantadas são de que (1) o início da diversificação das linhagens observadas ocorreu durante o Pleistoceno e (2) o caráter generalista da espécie influenciou a distribuição da diversidade genética foi durante as variações climáticas deste período.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécie estudada

Ficus citrifolia

São árvores de porte médio, frequentemente com 4 a 8 metros de altura. Esta espécie apresenta uma ampla distribuição geográfica na região Neotropical (Berg & Villavicencio, 2004) (Figura S1). É uma espécie tolerante a ambientes alterados, e ocorre frequentemente em bordas e clareiras de mata e ambientes antropizados. É ativamente polinizada por vespas do gênero *Pegoscapus* (Hymenoptera: Agaonidae, Rasplus & Soldati, 2006). *Ficus citrifolia* é uma espécie amplamente distribuída, que apresenta algumas variações morfológicas confinadas a determinadas regiões ao longo de sua distribuição. Estas variações foram distinguidas da seguinte maneira: folhas e figos pequenos - forma *amazonica* (Guianas), forma *brittonii* (Curaçao, nordeste da Colômbia e noroeste da Venezuela); folhas e figos grandes - forma *citrifolia* (América Central e costa do Pacífico da América do Sul), forma *guaranitica* (América do Sul e Guianas); figos obovoides - forma *dugandii* (nordeste da América do Sul, Panamá e Costa Rica); figos grandes com pedúnculos curtos - forma *subandina* (região montanhosa Andina). Apesar das variações morfológicas, não há uma descontinuidade morfológica evidente que permita elevar essas formas a categorias taxonômicas infraespecíficas (Berg & Villavicencio, 2004; Berg *et al.*, 2007). Neste estudo foram

amostradas populações de *F. citrifolia* da América Central, da Amazônia brasileira e do planalto central brasileiro, que correspondem as formas com figos e folhas grandes e com ampla distribuição nos Neotrópicos.

Coleta de dados, extração, amplificação e alinhamento do DNA

Neste estudo foram analisados 102 indivíduos coletados de 14 populações de *F. citrifolia* (Tabela 1). Folhas jovens e sadias foram coletadas e desidratadas em sílica-gel. Para cada população amostrada foi confeccionada uma exsicata que foi depositada no herbário SPFR, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

O DNA foi extraído seguindo o protocolo CTAB modificado (adaptado Doyle & Doyle, 1987) ou com o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1%, corado com GelRed™ (Uniscience). A concentração foi estimada em espectrofotômetro *Nanodrop2000*.

Foram utilizadas as regiões não codificadoras de cpDNA *trnH-psbA* (Sang *et al.* 1997) e *trnS-trnG* (Hamilton 1999). Estes marcadores foram escolhidos devido ao maior sucesso de amplificação e maior variabilidade dentre outros marcadores testados previamente em estudos com *Ficus* (Li *et al.*, 2012; Yu & Nason, 2012; Yu *et al.*, 2010; Honório *et al.* 2014). Os dois marcadores foram amplificados em reações de 25 µl contendo 0,2 µM de cada primer, 1 U de Taq DNA Polimerase (Promega), 1X de Tampão, 1,5 - 2,0 mM de MgCl₂ e 5 - 20 ng de DNA molde. A desnaturação inicial foi de 95°C seguida de 30 ciclos de 95°C por 2 min, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min. Os produtos do PCR, foram purificados com PEG 20% (polietilenoglicol) e enviados para sequenciamento em equipamento *ABI Prism 3100 automated DNA sequencer Applied Biosystems*.

Diversidade genética e estruturação populacional

Os cromatogramas foram analisados no programa Chromas ver. 2.0 (disponível em <http://technelysium.com.au>), e as sequências alinhadas usando o algoritmo Clustal LW (Thompson *et al.*, 1994) implementado no programa MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2007). Regiões poli-A/T e microinversões, por apresentarem caráter homoplásico (Kim & Lee 2005; Kelchner, 2004) não foram consideradas nas análises. *Indels* com mais de 1 pb foram codificados para representarem um evento mutacional. As duas regiões do cpDNA foram concatenadas para as análises.

Medidas de diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (h) (Nei 1987), bem como a análise de variância molecular (AMOVA) foram utilizadas para avaliar a estruturação e a variação genética dentro e entre as populações. Essas análises foram realizadas utilizando os programas Arlequin ver. 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005) e DNAsp (Librado & Rozas, 2009).

Para identificar possíveis barreiras ao fluxo gênico foi realizada uma análise espacial de variância molecular (SAMOVA) usando o programa Samova 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002). Cem simulações foram feitas para otimizar o número de grupos formados a partir das populações amostradas, considerando um número crescente de grupos K, até que todas as populações fossem alocadas em um número ótimo de grupos. O número de grupos ótimo foi selecionado para os K que apresentavam o maior F_{CT} (diferenciação entre grupos). Além disso, foi realizada uma análise de estruturação genética populacional pelo Método bayesiano com o programa BAPS versão 5.3 (*Bayesian Analysis of Population Structure*) (Corander *et al.*, 2008). Este método utiliza a simulação de Monte Carlo via cadeias de Markov para formar agrupamentos biológicos por meio de estimativas das frequências alélicas em todas as populações.

Para testar a hipótese de isolamento por distância foi feita uma análise de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas através da realização do teste de Mantel (Mantel,

1967) e de Autocorrelação Espacial. Ambas as análises foram feitas no programa Alleles in Space (AIS) 1.0 (Miller, 2005) usando 1000 permutações.

Modelagem de distribuição e história demográfica

Os registros de ocorrência das espécies ao longo do Neotrópico foram adquiridos no banco de dados Species Link (<http://splink.cria.org.br/>), no banco de dados de pesquisa do professor Rodrigo A. S. Pereira, e em coletas de campo. Todos os registros foram avaliados para evitar prováveis erros de localização e identificação. Foi utilizada uma matriz com 852 pontos (Figura S1).

Para a modelagem de distribuição nos cenários presente e no passado (140.000 e 21.000 anos atrás) foi utilizada a resolução espacial de 25 Km² e sete das 19 variáveis bioclimáticas, além de variável representando a altitude, todas disponíveis na base dados WorldClim (disponível em: <http://www.worldclim.org/>) (Tabela S1). Inicialmente os modelos foram gerados com todas as camadas. Posteriormente novos modelos foram gerados com a exclusão da camada que apresentou menor contribuição, que foi selecionada por meio da técnica de Jackknife (Giannini *et al.*, 2012).

Os modelos foram gerados no programa Maxent 3.3.3k (Disponível em <http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent/>). A calibração do modelo foi realizada por *bootstrap*, com 10 reamostragens de seleção aleatória dos pontos dividindo-se 70% dos pontos para treino do modelo e 30% para teste. O modelo final utilizado foi calculado pelos valores médios das reamostragens. O desempenho do modelo foi avaliado estatisticamente pelo AUC (*Area Under the Curve*), no qual o melhor desempenho do modelo é observado pelo valor mais próximo de 1 (Phillips & Dudík, 2008). Além disso, foram usadas a taxa de omissão e proporção binomial para entender o quanto o modelo foi omisso em prever a ocorrência dos pontos de teste e o quanto ele é significativo estatisticamente (Pearson, 2007). A ferramenta SDMToolbox foi utilizada em um programa SIG para criar uma grade de densidade Gaussiana

dando um peso maior para os pontos mais isolados na paisagem geográfica (e.g., maior probabilidade de amostragem em locais de acesso mais fácil ou em áreas melhor estudadas). Esta ferramenta diminui o viés na amostragem envolvendo áreas extensas e foi incluída como uma camada no processo de modelagem (Brown, 2014).

Para acessar a história demográfica de *F. citrifolia* foram realizados dois testes de neutralidade, D de Tajima (1989) e F_S de Fu (1997), com 10000 simulações. Também foi calculada a distribuição do número de diferenças entre haplótipos comparados par a par (*mismatch distribution*). Nesta análise, espécies com tamanho populacional relativamente estável ao longo do tempo apresentam uma distribuição multimodal; por outro lado, eventos do tipo gargalo-de-garrafa seguidos de expansão populacional recente geralmente apresentam uma distribuição unimodal (Rogers & Harpending, 1992). Os testes de neutralidade e a *mismatch distribution* foram estimados no programa Arlequin ver. 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005).

Análises baseadas em modelos de coalescência foram realizadas no programa Lamarc 2.1.8 (Kuhner, 2006). Este programa estima parâmetros tais como tamanho efetivo populacional, taxa de crescimento e taxas de migração usando dados moleculares amostrados aleatoriamente de indivíduos de uma ou mais populações. Por exemplo, em uma população com grande tamanho efetivo ao longo de muito tempo, a maioria dos indivíduos estará distantemente relacionada, ao passo que em uma população com tamanho pequeno a maioria dos indivíduos será altamente relacionada (Beerly & Felsenstein, 1999). Estes parâmetros afetam a genealogia das populações e são estimados utilizando a abordagem de busca MCMC (*Metropolis-Hastings Markov chain Monte Carlo sampling*). Dentre estes parâmetros, o parâmetro theta (θ), que leva em consideração o tamanho efetivo populacional (N_e) e a taxa de mutação (μ) multiplicado por 2 ($2\mu N_e$) foi estimado no presente estudo. O segundo parâmetro estimado foi o g (taxa de crescimento exponencial), que revela o quanto o tamanho populacional variou ao longo do tempo, e leva em consideração a unidade de tempo média

necessária para cada sítio sofrer uma mutação. O terceiro parâmetro estimado foi a taxa de migração M ($M = 2Nem/\theta$) de uma população em cada uma das outras populações observadas. As análises foram realizadas com 20 cadeias iniciais com 4.000 passos e três cadeias finais com 50.000 passos.

A análise *Bayesian Skyline Plot* (BSP) implementada no programa BEAST 1.7.2 (Drummond *et al.* 2005) foi utilizada para estimar os tamanhos efetivos populacionais ao longo do tempo (em número de gerações) sem informações *a priori*. O modelo de substituição nucleotídica HKY+G, foi identificado usando Akaike Information Criterion implementado no JModelTest 2.1.4 (Posada, 2008). A reconstrução filogenética foi realizada utilizando a opção do relógio molecular relaxado (*uncorrelated lognormal relaxed molecular clock*). A *tree prior* utilizada foi o *Speciation - Yule Process* usando a taxa evolutiva universal do DNA de cloroplasto ($1,1 \times 10^{-9} - 2,9 \times 10^{-9}$ substituições/sítio/ano; Wolfe *et al.*, 1987). As árvores foram geradas com 5×10^6 cadeias, amostradas a cada 5000 gerações. O software Tracer 1.6 (disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) foi utilizado para checar a convergência das Cadeias de Monte Carlo (MCMC) e o tamanho amostral efetivo adequado (>200).

Divergência das linhagens

As relações filogenéticas entre os haplótipos obtidos foram estimadas por redes de haplótipos construídas pelo método de *median-joining network* (Bandelt *et al.*, 1999), no programa NETWORK 4.5.0.0 (disponível no sítio <http://www.fluxus-engineering.com>). As redes de haplótipos são representações gráficas usadas para descrever múltiplas bifurcações de árvores de genes, das quais um único haplótipo pode ter dado origem a muitos outros (Posada & Crandall, 2001). Inferências bayesianas foram realizadas no programa BEAST 1.8.2 (Drummond *et al.*, 2005) usando os mesmos parâmetros anteriormente descritos para as análises BSP. Foram utilizados os táxons *Ficus adhatodifolia* e *F. insipida* (subgênero *Pharmacosycea*) como grupo externo. Depois disso, 10% das árvores geradas inicialmente

foram deletadas como *burn-in*. O suporte estatístico dos dados foi determinado pela avaliação da probabilidade posterior bayesiana.

Um método de reconstrução ancestral de estados discretos, que utiliza a abordagem bayesiana para testar hipóteses evolutivas também foi implementado no programa BEAST 1.8.2 (Drummond *et al.*, 2005). Com este método proposto por Lemey e colaboradores (2009) é possível inferir o processo de difusão filogeográfica, ou dispersão das linhagens utilizando um modelo RRW (*relaxed random walk*) e, simultaneamente reconstruir a história evolutiva ao longo do tempo. Os estados discretos incorporados à análise foram as localidades (K = 14). Para a realização desta análise foram utilizados os haplótipos presentes em cada uma das populações, o método de coalescente de difusão espacial discreto (*discretized spatial diffusion model*) e o BSSVS (*Bayesian Stochastic Search Variable Selection*), que confere eficiência estatística no programa BEAST 1.8.2. Os demais parâmetros como o modelo de substituição nucleotídica e a taxa evolutiva foram os mesmos utilizados nas inferências bayesianas descritas anteriormente. A corrida foi realizada com 50 milhões de gerações e a convergência e estabilização das análises foi checada no programa Tracer 1.6 (Rambaudt *et al.*, 2013).

RESULTADOS

Diversidade genética e estruturação populacional

As sequências dos marcadores *trnH-psbA* e *trnS-trnG* geraram alinhamentos de 404 e 684 pares de bases, respectivamente. Os polimorfismos totalizaram oito substituições nucleotídicas e dois *indels* para o marcador *trnH-psbA*, e seis substituições para o marcador *trnS-trnG*. O alinhamento com os dois marcadores concatenados totalizou 1028 pares de bases e determinou 15 haplótipos em *F. citrifolia*.

Tabela 1. Populações de *F. citrifolia* analisadas neste estudo. Tamanho amostral (N), haplótipos observados e diversidade haplotípica e nucleotídica para os marcadores cloroplastidiais (*trnH-psbA* e *trnS-trnG*).

No.	País	Localidade	Lat	Long	N	Haplótipos	Div. Hap.	Div. Nuc.
1	El Salvador	El Salvador*	13,698	-89,277	1	H1	-	-
2	Costa Rica	Costa Rica	9,115	-83,693	8	H1, H2	0,429 (0,169)	0,0004 (0,0004)
3	Brasil	Manaus	-3,174	-59,904	13	H3, H4, H5, H6, H7	0,821 (0,066)	0,0044 (0,0026)
4	Brasil	Rondônia	-8,649	-63,908	13	H8	0,000 (0,000)	0,0000 (0,0000)
5	Brasil	Acre	-9,948	-67,826	2	H8	0,000 (0,000)	0,0000 (0,0000)
6	Brasil	Poconé	-16,508	-56,412	10	H9	0,000 (0,000)	0,0000 (0,0000)
7	Brasil	Cuiabá	-16,505	-56,401	8	H10, H11, H12, H13	0,900 (0,161)	0,0012 (0,0013)
8	Brasil	Pantanal	-19,002	-57,646	4	H9, H14	0,667 (0,204)	0,0025 (0,0020)
9	Brasil	Bonito	-21,173	-56,447	13	H9	0,000 (0,000)	0,0000 (0,0000)
10	Brasil	Campo Grande	-20,504	-54,609	6	H10	0,000 (0,000)	0,0000 (0,0000)
11	Brasil	Minas Gerais	-18,210	-49,795	1	H10	-	-
12	Brasil	Teodoro Sampaio	-22,579	-52,215	2	H10	0,000 (0,000)	0,0000 (0,0000)
13	Brasil	Assis	-22,659	-50,4264	10	H12	0,000 (0,000)	0,0000 (0,0000)
14	Brasil	Ribeirão Preto	-21,167	-47,852	11	H15	0,000 (0,000)	0,0000 (0,0000)
Todas pops					102		0,882 (0,016)	0,005 (0,003)

*Material enviado pelo Missouri Botanical Garden (nº acesso = nº de herbário 3893039).

A diversidade haplotípica nas populações variou de 0 a 0,900, enquanto a diversidade nucleotídica variou de 0 a 0,0044 (Tabela 1). A diversidade haplotípica e nucleotídica total foram 0,882 e 0,0047, respectivamente (Tabela 1). Dez das quinze populações amostradas não apresentaram polimorfismos, mesmo aquelas com maior número de indivíduos analisados (>10). Os maiores índices de diversidade haplotípica e nucleotídica foram observados nas populações de Cuiabá N°7 (0,900 e 0,0044, respectivamente) e de Manaus N°3 (0,821 e 0,0044, respectivamente). Uma menor diversidade haplotípica foi observada nos extremos da distribuição das populações da região amazônica (N°4 e 5) e da região central do Brasil (N°6, 9, 10, 11, 12, 13, 14), que tiveram índices de diversidade haplotípica e nucleotídica igual a zero.

Entre os 15 haplótipos observados, dois ficaram restritos a América Central e seis à região Amazônica (Figura 1A). Com exceção da população de Ribeirão Preto (N° 14), que teve um haplótipo exclusivo (H15), as demais da região central do Brasil compartilharam pelo menos um haplótipo entre elas. Os haplótipos H9, H10 e H12 ocorreram em duas, quatro e três populações respectivamente, e foram os mais amplamente distribuídos na região central do Brasil (Figura 1A).

A AMOVA revelou uma alta diferenciação, na qual 82,5% ($p < 0,0001$) da variação encontrada entre as sequências correspondem a variação entre populações, enquanto 17,5% são relativos à variação intrapopulacional. As análises feitas com o programa SAMOVA para detectar barreiras ao fluxo gênico entre as populações amostradas revelaram o maior valor de F_{CT} para $K=5$ ($F_{CT} = 0.72$, $p < 0,0001$). As populações foram agrupadas da seguinte forma: Grupo I – populações N° 1 e 2 da América Central; Grupo II - populações N°4 e 5 da região amazônica; Grupo III – populações N°6, 8 e 9 da região do Pantanal e de Bonito; Grupo IV – as populações N°3, 7, 10, 11, 12, 13; Grupo V – população N°14, isolada das demais na região sudeste do Brasil.

Figura 1. Distribuição das populações de *F. citrifolia* e os respectivos haplótipos de cpDNA encontrados (A); *median-joining network* (B). Os tamanhos dos círculos são proporcionais a frequência de cada haplótipo. Cada traço nos ramos da rede de haplótipos representa um passo mutacional. mv = vetor médio.

Figura 2. Distribuição geográfica dos clusters (K=7) formados a partir da análise bayesiana de estruturação genética populacional de *F. citrifolia*.

As análises realizadas no BAPS indicaram que as populações de *F. citrifolia* são compostas por sete clusters (Figura 2). No Cluster 1 haplótipos amplamente distribuídos na América Central, Amazônia e Pantanal; Cluster 2 e 3 haplótipos da região da Amazônia e do Pantanal; Cluster 4 e 7 – haplótipos restritos a região central do Brasil; Cluster 5 – haplótipos exclusivos da região sudeste do Brasil; Cluster 6 – haplótipos restritos a Amazônia. Apesar dos diferentes resultados revelados pelas duas análises, podemos observar que não há barreiras ao fluxo gênico entre as populações de *F. citrifolia* nas diferentes regiões amostradas.

O teste de Mantel revelou que há correlação significativa ($r = 0,37$; $p < 0,005$) entre as distâncias genéticas e geográficas para as populações de *F. citrifolia*. Este resultado também pode ser observado pelo teste de autocorrelação espacial ($r = 0,88$; $p < 0,005$).

História demográfica

As análises demográficas não revelaram mudanças drásticas no tamanho populacional. Os índices D de Tajima e F_S de Fu estimados para os dados completos não foram significativos ($D = 0,981$; $F_S = 0,601$, respectivamente; $p > 0,05$). O índice Harpending Raggedness também não foi significativo para expansão ($R = 0,076$; $p = 0,9$). A análise *mismatch distribution* revelou padrões multimodais, que corroboram a hipótese de estabilidade demográfica em *F. citrifolia* (resultado não apresentado).

Quando as populações foram analisadas juntas, as análises de coalescência apresentaram baixo valor de theta ($\theta = 0,0038$; IC 95% 0,0045 – 0,0018), indicando baixas taxas de substituição ou tamanho efetivo pequeno (Tabela 3). O valor positivo de g sugere a ocorrência de expansão demográfica ($g = 163.23$; ICs 95% = -779.88; ICs 95% = 584.22) (Tabela 2). Porém, como o intervalo de confiança inclui valores de zero, é pouco provável que de fato esteja ocorrendo expansão. Os resultados foram similares nas análises por população (Tabela 2). A população da Costa Rica e as populações da Amazônia apresentaram números

de migrantes menor do que 0,1, enquanto as populações da região central e sudeste do Brasil apresentaram alguns valores ligeiramente maiores (Tabela 3). A análise da demografia histórica representada no *Bayesian Skyline Plot* demonstrou que as populações de *F. citrifolia* se mantiveram estáveis até recentemente (cerca de 35.000 anos atrás) e iniciaram um declínio populacional a partir deste período (Figura 4).

Modelagens de distribuição

A modelagem de distribuição de *F. citrifolia* revelou que houve um aumento na distribuição potencial desta espécie durante o último máximo glacial na região da Amazônia (Figura 3). Na região central, que inclui as regiões centro-oeste e sudeste do Brasil, as populações se mantiveram com maior probabilidade de ocorrência no Mato Grosso do Sul e em Goiás, enquanto a região sudeste do Brasil apresentou uma baixa probabilidade de ocorrência durante este período (Figura 3B). Por sua vez, a probabilidade de distribuição de *F. citrifolia* na América Central manteve-se similar tanto no Último Máximo Glacial quanto atualmente (Figura 3B e 3C). A região sudeste do Brasil apresentou uma baixa probabilidade de ocorrência durante este período (Figura 3B).

Ficus citrifolia apresentou maior probabilidade de ocorrência em grande amplitude de temperatura mínima no mês mais frio (aproximadamente 10 a 25°C), e em locais mais secos, com precipitação do mês mais úmido entre 200 e 400 mm. Estes resultados corroboram a característica generalista da espécie.

Figura 3. Modelos preditivos de distribuição de *F. citrifolia* nos cenários do Último Período Interglacial (A), do Último Glacial Máximo (B), e do período atual (C). Legenda indica as probabilidades de ocorrência segundo os modelos, que vão desde baixa probabilidade de ocorrência igual a 0 e alta probabilidade de ocorrência igual a 1.

Tabela 2. Análises de crescimento populacional (g), e de tamanho efetivo populacional (Θ) realizadas no programa Lamarc para 11 populações de *F. citrifolia* baseados em coalescência.

População	Theta (Θ)	95% IC	g	95% IC
Costa Rica	0,00026	0,00025 - 0,00127	873,58	-102,81 - 1339,68
Manaus	0,00146	0,00111 - 0,00304	506,61	-467,93 - 975,19
Acre	0,00002	0,00001 - 0,00670	822,00	-154,69 - 1294,05
Rondônia	0,00002	0,00001 - 0,00021	609,63	-366,22 - 1081,44
Poconé	0,00002	0,00001 - 0,00045	628,42	-347,48 - 1096,67
Cuiabá	0,00123	0,00815 - 0,00083	886,75	-100,73 - 1331,65
Pantanal	0,00051	0,00543 - 0,00049	788,99	-189,93 - 1250,49
Campo Grande	0,00003	0,00082 - 0,00002	859,48	-114,03 - 1328,83
Bonito	0,00002	0,00038 - 0,00001	730,37	-245,38 - 1197,38
Ribeirão	0,00002	0,00043 - 0,00001	308,21	-661,76 - 779,10
Teodoro	0,00003	0,06604 - 0,00002	876,03	-108,03 - 1344,70
Assis	0,00001	0,00038 - 0,00001	324,02	-649,37 - 792,43
Total	0,00378	0,00449 - 0,00187	163,23	-779,38 - 584,22

Divergência das linhagens

A relação entre os haplótipos observada na *network* revelou um padrão espacial de ocorrência dos haplótipos com a maioria dos haplótipos sendo restritos a uma das três regiões principais (América Central, Amazônia e Brasil Central). Os haplótipos H3 e H7, que ocorrem somente na população de Manaus, são mais próximos dos haplótipos da América Central do que dos demais haplótipos observados na mesma população (Figura 1A). Esta relação demonstra que não há uma formação de clados geográficos específicos na *network* gerada com os haplótipos de *F. citrifolia*.

A árvore filogenética bayesiana gerada com os haplótipos de *F. citrifolia* é congruente com a topologia da *network* (Figura 5). Na árvore, pode-se observar dois clados principais separados (Probabilidade Posterior = 1). No clado I estão agrupados os haplótipos que foram observados nas populações da Amazônia e do Brasil central, ao passo que no clado II estão as populações da América Central, Amazônia e do Brasil central. O tempo divergência médio estimado entre estes clados foi de 1,1 Ma (+/- 0,4). Já os clados I e II iniciaram sua diversificação durante o Pleistoceno (~650 ka +/- 400; ~750 ka, +/- 490 ka, respectivamente).

Tabela 3. Número de migrantes por geração para 12 populações de *F. citrifolia* baseado em coalescência. A migração ocorre na direção das populações fonte (coluna) para as populações receptoras (linha).

		Receptora											
	Populações	Costa Rica	Manaus	Acre	Rondonia	Poconé	Cuiabá	Pantanal	Campo Grande	Bonito	Ribeirão	Teodoro Sampaio	Assis
Fonte	Costa Rica	0	0,0050	0,0052	0,0155	0,0023	0,0023	0,0023	0,0169	0,0042	0,0013	0,0231	0,0055
	Manaus	0,0369	0	0,0924	0,0891	0,1330	0,0135	0,0895	0,0118	0,1189	0,0118	0,0445	0,0809
	Acre	0,0002	0,0013	0	0,0016	0,0007	0,0015	0,0009	0,0016	0,0016	0,0011	0,0009	0,0016
	Rondônia	0,0014	0,0022	0,0023	0	0,0003	0,0022	0,0016	0,0022	0,0022	0,0022	0,0022	0,0019
	Poconé	0,0002	0,0017	0,0014	0,0003	0	0,0001	0,0017	0,0017	0,0016	0,0006	0,0008	0,0015
	Cuiabá	0,0104	0,0217	0,0701	0,1077	0,0130	0	0,0672	0,1141	0,1006	0,0923	0,1087	0,1135
	Pantanal	0,0220	0,0471	0,0170	0,0313	0,0471	0,0134	0	0,0274	0,0467	0,0155	0,0235	0,0144
	Campo Grande	0,0007	0,0024	0,0026	0,0028	0,0011	0,0027	0,0026	0	0,0023	0,0019	0,0028	0,0028
	Bonito	0,0007	0,0015	0,0013	0,0008	0,0015	0,0010	0,0015	0,0014	0	0,0011	0,0012	0,0006
	Ribeirão	0,0006	0,0002	0,0021	0,0016	0,0003	0,0002	0,0002	0,0019	0,0011	0	0,0015	0,0002
	Teodoro	0,0004	0,0003	0,0022	0,0029	0,0011	0,0029	0,0009	0,0029	0,0003	0,0025	0	0,0023
	Assis	0,0002	0,0002	0,0008	0,0003	0,0004	0,0014	0,0008	0,0010	0,0011	0,0006	0,0011	0

Figura 4. *Bayesian Skyline Plot* de todas as populações de *F. citrifolia* mostrando as flutuações do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo. Os intervalos de confiança da mediana são mostrados em azul, com 95% de confiança.

Figura 5. Relações filogenéticas entre os haplótipos de *F. citrifolia* baseadas no cpDNA da região Neotropical. Árvore filogenética feita pelo Método Bayesiano com as probabilidades posteriores ($>0,6$) localizadas abaixo dos ramos. Tempo para o ancestral comum (apenas para nós com probabilidade posterior $> 0,9$): Clado I – 650 ka $\pm$ 400; Clado II - 750 ka $\pm$ 495. As barras em azul correspondem ao intervalo de confiança (95%)

A análise de difusão filogeográfica revelou que a localização mais provável da origem das linhagens de *F. citrifolia* foi a população N° 3, na região central da Amazônia e ocorreu há cerca de 670 ka (Figura 6). Esta população compartilha a maioria da massa de probabilidade posterior do ramo do qual se originaram os demais estados (localidades). A árvore gerada por esta análise também apresentou dois clados principais similares aos da análise de coalescência dos haplótipos. A partir desta população partiram quatro rotas de dispersão. A primeira foi em direção a população N°14 (~500 ka), porém esta não apresentou uma alta probabilidade posterior ($<0,7$). A segunda rota de dispersão ocorreu em direção a população N°2 na América Central, a terceira em direção a população N°7 (~400 ka), e a quarta foi em direção a população N°8 (~360 ka). A partir de ~350 ka uma rota de dispersão pode ser observada a partir da população N°7 em direção as demais populações da região central do Brasil, com exceção das populações do Pantanal (N°6 e 8) e de Bonito (N°9), que mais recentemente apresentaram rotas de dispersão entre elas (~100 ka). É possível notar também a ausência de rotas de dispersão entre as populações que ocorrem no Estado de São Paulo (N°12, 13 e 14).

Figura 6. Árvore de difusão espacial com as relações dos haplótipos das 14 populações de *F. citrifolia*, baseada na análise de coalescência, usando seleção de busca variável estocástica bayesiana (BSSVS). As cores dos ramos indicam a reconstrução ancestral com as maiores probabilidades posteriores. O gráfico central representa a probabilidade posterior da raiz da árvore. No mapa estão as populações utilizadas, com as cores correspondentes aos ramos da árvore.

DISCUSSÃO

Diversidade genética e estruturação populacional

Os resultados deste estudo mostraram que mudanças climáticas influenciaram regionalmente a distribuição da diversidade genética das populações de *F. citrifolia*. A baixa diversidade observada em muitas populações, onde 10 das 14 populações foram monomórficas, demonstra que a maioria das populações amostradas estiveram sob efeito do fundador, no qual populações com baixos tamanhos efetivos populacionais estão sujeitas a deriva genética, e alelos raros podem ser perdidos. Apesar da baixa diversidade populacional, a diversidade haplotípica total observada aqui (0,882) foi maior do que foi observada em outros estudos com figueiras que utilizaram cpDNA, como por exemplo, *F. insipida* e *F. adhatodifolia* (0,614; 0,589, respectivamente; capítulo 1) e *F. bonijesulapensis* (0,848; Vieira *et al.*, 2015). A alta diversidade genética total observada reforça a hipótese de que muitas populações de *F. citrifolia* estão sob efeito do fundador. A população de N° 3 (Manaus) se diferenciou das demais por apresentar uma alta diversidade genética, com haplótipos exclusivos da região. Por isso, esta região pode ser considerada um centro de diversificação de *F. citrifolia* na região norte da América do Sul. Assim como no presente estudo, Manaus também foi inferida como um centro de diversificação na região central da Amazônia para as espécies arbóreas *Jacaranda copaia* (Bignoniaceae; Scotti-Saintagne *et al.*, 2013a) e *Schyzolobium parahyba* (Fabaceae; Turchetto-Zolet *et al.*, 2012b).

As populações do sudeste brasileiro (N° 12, 13, 14) foram todas monomórficas. Estas populações estão localizadas no limite da distribuição do Cerrado, em uma zona de transição com a Mata Atlântica, que provavelmente foi afetada diferentemente pelas oscilações do período Quaternário. Registros fósseis revelaram que a paisagem de savana desta região foi substituída por vegetações rasteiras no final do Quaternário, e a paisagem atual só se estabeleceu no início do Holoceno (Behling, 2002).

A população de Cuiabá também apresentou alta diversidade haplotípica ($h = 0,900$), e pode ser considerada um segundo refúgio para *F. citrifolia*, localizado na região central da América do Sul. Em alguns estudos realizados com espécies de plantas do Cerrado, tais como *Lychnophora ericoides* (Asteraceae; Collevatti *et al.*, 2009), *Plathymenia reticulata* (Fabaceae; Novaes *et al.*, 2010) e *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae; Ramos *et al.*, 2007), também foram observadas subdivisões populacionais longitudinais, que indicam expansão recente das populações localizadas na parte sudeste do Cerrado. A ocorrência de haplótipos que ocorrem em Cuiabá em populações monomórficas do centro-oeste e sudeste do Brasil, reforça a hipótese de retração populacional nesta região durante períodos menos favoráveis, seguida de colonização das demais regiões a partir deste refúgio.

Os testes de barreiras não revelaram restrição ao fluxo gênico entre a América Central e a Amazônia. A ausência de barreiras entre estas regiões está relacionada à capacidade de espécies arbóreas da região Neotropical em se estabelecer em ambientes sazonais, como provavelmente ocorreu com *F. citrifolia*. As duas principais barreiras ao fluxo gênico entre espécies arbóreas que ocorrem na América do Sul e na América Central são os Andes e as áreas sazonalmente secas do norte da América do Sul, que incluem os Llanos localizados da Colômbia e na Venezuela e as florestas secas ao longo da costa do Caribe (Pennington *et al.*, 2006; Dick *et al.*, 2007). No entanto, a presença destas regiões não serviu como barreira ao fluxo gênico em espécies arbóreas pioneiras tolerantes a estações secas, tais como *Ceiba pentandra* (Malvaceae; Dick *et al.*, 2007), *Cordia alliodora* (Boraginaceae; Rymer *et al.*, 2013), *Jacaranda copaia* (Bignoniaceae; Scotti-Saintagne *et al.*, 2013a) e *Trema micranta* (Cannabaceae; Dick *et al.*, 2013), que apresentaram uma fraca estruturação espacial da diversidade genética entre as duas regiões. Diferentemente, a espécie *F. insipida* que ocorre em ambientes mais úmidos, próximos a corpos d'água, apresentou uma alta diferenciação entre populações da Amazônia e da América Central (Honorio *et al.*, 2015, Capítulo 1).

Portanto, as barreiras ao fluxo gênico entre as populações da América Central e da América do Sul dependem das características biológicas das espécies, como o modo de dispersão e a capacidade de se estabelecer em ambientes menos favoráveis.

A ausência de diferenciação entre as populações da Amazônia e da região central da América do Sul também pode estar relacionada à capacidade de *F. citrifolia* de ocorrer em diferentes formações vegetacionais, incluindo áreas sazonalmente secas. Durante os períodos glaciais do Pleistoceno houve uma expansão das formações florestais sazonalmente secas na região central da América do Sul e em algumas regiões da Amazônia durante o Pleistoceno (Mayle *et al.*, 2004; Pennington *et al.*, 2004). Estas mudanças podem ter favorecido a expansão populacional de *F. citrifolia*, que é uma espécie pioneira hemiepífita, que consegue se estabelecer em áreas abertas, como bordas e remanescentes florestais (Pereira *et al.*, 2007).

Modelagem de distribuição e padrões demográficos

Os modelos de distribuição revelaram um aumento da probabilidade de ocorrência de *F. citrifolia* na Amazônia durante o último glacial máximo e na região norte em direção a América Central. As populações da porção central da América do Sul também expandiram sua distribuição pelo centro-oeste brasileiro, porém houve uma diminuição drástica da probabilidade de ocorrência da espécie na região sudeste do Brasil. Estes resultados parecem refletir os padrões de distribuição da diversidade genética nas populações de *F. citrifolia*, nas quais um padrão de baixa diversidade pode ser observado nos extremos das distribuições nestas regiões. Por exemplo, na região amazônica, a população N° 3 apresentou uma alta diversidade haplotípica, ao passo que as populações N° 4 e 5 foram monomórficas. Um padrão semelhante ocorreu nas populações da região central do Brasil, onde a população N° 7 teve uma alta diversidade haplotípica em relação as outras populações, que foram em sua maioria monomórficas. Ambos os deslocamentos no sentido norte corroboram a hipótese da expansão das formações florestais sazonalmente secas na região central da América do Sul e em

algumas regiões da Amazônia durante o Pleistoceno (Mayle *et al.*, 2004; Pennington *et al.*, 2004). Os modelos de distribuição também revelaram uma alta probabilidade de ocorrência de *F. citrifolia* ao longo da Mata Atlântica costeira, porém a ocorrência desta espécie na região nordeste do Brasil é rara.

A modelagem de distribuição sugeriu mudanças ao longo do tempo para *F. citrifolia*, porém as análises do cpDNA não revelaram alterações demográficas significativas. Os resultados dos testes de neutralidade não foram significativos. Estes testes de neutralidade são influenciados pelo número de migrantes nas populações, e podem detectar expansões ou desvios da neutralidade seletiva quando há um grande número de migrantes entre populações (Excoffier *et al.*, 2009). De fato, a migração estimada para o presente estudo foi baixa (todas as populações com $M < 0,2$), fato que pode estar relacionado com os resultados não significativos dos testes de neutralidade realizados neste estudo. As baixas taxas de migração também influenciam os eventos de coalescência em populações que expandiram recentemente, fazendo com que as linhagens de uma mesma população coalesçam mais frequentemente do que linhagens de populações diferentes (Excoffier *et al.* 2009). Apesar das baixas taxas de migração observadas nas populações de *F. citrifolia*, haplótipos mais filogeneticamente relacionados ocorreram entre populações muito distantes. Por exemplo, o haplótipo H9 que ocorreu na população N°9 de Bonito foi mais filogeneticamente próximo dos haplótipos H3 e H7 que ocorrem na população N°3 da Amazônia (cerca de 2000 km entre elas) do que do haplótipo H10 que foi observado na população N°10 de Campo Grande (cerca de 400 km entre elas). Por sua vez, o resultado do *Skyline plot* gerado pelo método bayesiano demonstrou um declínio populacional durante o Último Período Glacial (cerca de 35000 anos atrás) até os dias atuais. Heller e colaboradores (2013) demonstraram que esta análise pode revelar falsos sinais de declínio populacional relacionados com a alta estruturação genética

populacional. No presente estudo, houve uma forte estruturação genética ($F_{ST} > 0,8$), fato que pode ter influenciado o resultado das análises demográficas pelo método Bayesiano.

Cenário de diversificação das linhagens e os modelos paleoclimáticos

As análises das relações filogenéticas entre as linhagens de *F. citrifolia* revelaram a formação de dois clados principais, que se diversificaram no início do Pleistoceno. Padrões de diversificação durante o final do Plioceno e o Pleistoceno foram encontrados em algumas espécies do Cerrado, como *Tabebuia impetiginosa* (~2,0 Ma) (Bignoniaceae; Colevatti *et al.*, 2012a) e *Caryocar brasiliense* (~3,3 Ma) (Bombacaceae; Collevatti *et al.*, 2012b). A diversificação de linhagens durante este período pode estar relacionada com mudanças na paisagem que influenciaram a distribuição das populações nesta região e, de fato, levaram as populações de *F. citrifolia* ao isolamento em dois refúgios principais: um na região central da Amazônia, e outro na região central do Brasil.

A presença de haplótipos da Amazônia e do Brasil central no Clado I e haplótipos da América Central, Amazônia e Brasil central no Clado II demonstram que não há estruturação geográfica das linhagens de *F. citrifolia*. A alta diferenciação observada aliada a esta ausência de resolução geográfica na distribuição da diversidade genética de *F. citrifolia* podem estar associados a eventos de dispersão a longas distâncias, seguidos de fortes efeitos do fundador. Com exceção dos refúgios na região Amazônica (população N°3) e na região do Brasil central (população N°4), as demais populações foram monomórficas evidenciando a fixação destes haplótipos por deriva genética. Por exemplo, a formação do Clado II pode estar relacionada com períodos de expansão das populações da região amazônica, que colonizaram as áreas onde ocorrem as populações N° 6, 8, 9 (Pantanal e Bonito). A baixa diversidade haplotípica observada nestas populações revelam um efeito gargalo de garrafa, que levou a fixação por deriva genética de haplótipos mais similares aos da Amazônia. De fato, a modelagem de distribuição de *F. citrifolia* mostrou alterações no nível de conectividade entre as populações

da Amazônia e do Brasil central, com maior isolamento durante o último período interglacial quando houve a expansão das formações florestais ombrófilas.

A formação de dois clados separando as populações de *F. citrifolia* não está relacionada com a presença de diferenças fenotípicas entre os indivíduos utilizados no presente estudo. Por exemplo, não houve agrupamentos exclusivos entre linhagens da América Central e América do Sul, que poderiam confirmar a caracterização morfológica e geográfica observada na distinção das diferentes formas de *F. citrifolia*. Em estudos com espécies amplamente distribuídas que apresentaram profundas diferenças genéticas foram caracterizadas como espécies crípticas ainda não descritas, mesmo com pouca variação fenotípica (Scotti-Saintagne *et al.*, 2013b; Cavers *et al.*, 2013). No entanto, não há divergência genética suficiente que caracterize a ocorrência de espécies crípticas no presente estudo. A ausência de monofilia recíproca intraespecífica em *F. citrifolia* aliada a ausência de estruturação geográfica das linhagens pode estar relacionada com a retenção de polimorfismos ancestrais, que ocorre quando a diversidade genética observada pode ser anterior ao tempo de divergência das linhagens (Pamilo & Nei, 1988). O isolamento entre as populações geograficamente mais distantes, observado pela formação dos Clados I e II, aliado a separação recente destas linhagens provavelmente levou a fixação de haplótipos similares nestas populações.

Os resultados da difusão filogeográfica revelaram que o início da diversificação das linhagens de *F. citrifolia* ocorreu durante o Pleistoceno na região Amazônica (população N°3). A partir desta população duas rotas de dispersão seguiram para a América Central e para a região central do Brasil. Assim como foi revelado pelas análises das relações filogenéticas entre as linhagens, a análise de difusão separou as populações de *F. citrifolia* em dois clados principais sem evidente estruturação geográfica, com eventos de dispersão a longas distâncias que se originaram na região Amazônica. Mais recentemente (~300 ka), a análise revelou rotas

de dispersão entre as populações da região central do Brasil. As rotas de dispersão a longas distâncias durante o Pleistoceno reforçam a hipótese do aumento da sazonalidade na região Neotropical, que levou a um aumento dos tipos de vegetação mais abertas, como as savanas (Pennington *et al.*, 2004), o que possivelmente facilitou a dispersão de *F. citrifolia* que é uma árvore de porte relativamente pequeno, que se distribui de forma agregada em áreas de borda (Coelho *et al.*, 2014). A presença de haplótipos fixados, de alta diferenciação e baixo tamanho efetivo populacional aliadas às características biológicas da espécie reforçam a hipótese de colonização recente na maioria das populações de *F. citrifolia*.

CONCLUSÕES

A distribuição da diversidade genética nas populações de *Ficus citrifolia* indica uma forte influência do caráter generalista desta espécie, amplamente distribuída em ambientes abertos da região neotropical. A ausência de estruturação geográfica no relacionamento filogenético das linhagens sugere retenção de polimorfismos ancestrais dada a origem recente para os Clados I e II (com tempo de diversificação estimado entre 650 e 750 ka) e reforça a hipótese de que havia maior conectividade entre as formações vegetais mais abertas da América do Sul durante os períodos glaciais do Pleistoceno. Apesar da ausência de linhagens exclusivas de determinadas regiões geográficas, foi encontrada uma alta diferenciação interpopulacional no cpDNA. Este padrão deve estar relacionado ao padrão agregado de ocorrência dos indivíduos de *F. citrifolia* aliado ao baixo tamanho populacional observado. Além da alta diferenciação populacional e da ausência de congruência geográfica no relacionamento filogenético das linhagens de *F. citrifolia*, não foram observadas grandes diferenças entre as linhagens que ocorrem em diferentes formações vegetais na região Neotropical, demonstrando que espécies generalistas como *F. citrifolia* aparentemente tem trânsito livre nas grandes áreas abertas desta região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, S., Compton, S.G., Butlin, R.K. & Gilmartin P.M. (2009) Wind-borne insects mediate directional pollen transfer between desert fig trees 160 kilometers apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 20342-20347.
- Avice, J.C. (2000) *Phylogeography - the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.
- Behling, H. (2002). South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **177**, 19 – 27.
- Beerli, P., Felsenstein, J. (1999) Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics*, **152**, 763 – 773.
- Berg, C.C. (1989) Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia*, **45**, 605 – 611.
- Berg, C.C. & Villavicencio, X. (2004) Taxonomic studies on *Ficus* (Moraceae) in the West Indies, extra-Amazonian Brazil and Bolivia. *Illicifolia*, **5**, 1 – 132.
- Berg, C.C. (2007) Proposals for treating four species complexes in *Ficus* subgenus *Urostigma* section *Americanae* (Moraceae). *Blumea*, **52**, 295 – 312.
- Brown, J.L. (2014) SDMToolbox: a python based GIS toolkit for landscape genetic, biogeographic and species distribution model analysis. *Methods in Ecology and Evolution*, **5**, 694 – 700.
- Coelho, L.F.M, Ribeiro, M.C. & Pereira, R.A.S. (2014) Water availability determines the richness and density of fig trees within Brazilian semideciduous forest landscapes. *Acta Oecologica*, **57**, 109 – 116.
- Collevatti, R.G., Rabelo, S.G. & Vieira, R.F. (2009) Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. *Annals of Botany*, **104**, 655 – 664.
- Collevatti, R.G., Lima-Ribeiro, M.S., Souza-Neto, A.C., Franco, A.A. & Terribile, L.V. (2012a) Recovering the demographical history of a Brazilian Cerrado tree species *Caryocar brasiliense*: coupling ecological niche modeling and coalescent analyses. *Natureza & Conservação*, **10**, 169–176.
- Collevatti, R.G., Terribile, L.V., Lima-Ribeiro, M.S., Nabout, J.C., Oliveira, G., Rangel, T.F., Rabelo, S.G. & Diniz-Filho, J.A.F. (2012b) A coupled phylogeographic and species distribution modeling approach recovers the demographic history of a Neotropical seasonally dry forest tree species. *Molecular Ecology*, **21**, 5845–5863.

- Collevatti, R.G., Castro, T.G., Lima, J.S. & Telles, M.P.C. (2012a) 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*, **2**, 1024–1035.
- Corander, J., Siren, J., Arjas, E., (2008) Bayesian spatial modeling of genetic population structure. *Computation Stat.* **23**, 111–129.
- Cruaud, A. *et al.* (2012) An Extreme Case of Plant-Insect Codiversification: Figs and Fig-pollinating Wasps. *Systematic Biology*, **61**, 1029–1047.
- Dick, C.W., Kobinah, A-S. & Bermingham, E. (2003) Molecular Systematic Analysis reveals cryptic tertiary diversification of a widespread tropical rain forest tree. *The American Naturalist*, **162**, 1 – 13.
- Dick, C.W., Bermingham, E., Lemes, M.R. & Gribel, R. (2007) Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. *Molecular Ecology*, **16**, 3039– 3049
- Dick, C.W. & Heuertz, M. (2008) The complex biogeographic history of a widespread tropical tree species. *Evolution*, **62**, 2760–2774.
- Dick, C.W., Lewis, S.L., Maslin, M. & Bermingham, E. (2013) Neogene origins and implied warmth tolerance of Amazon tree species. *Ecology and Evolution*, **3**, 162–169.
- Doyle J.J. & Doyle, J.L. (1987). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**, 13–15.
- Dupanloup, I., Schneider, S. & Excoffier, L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2571–2581.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B. & Pybus O. G. (2005) Bayesian coalescent inference of last population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 1185–1192.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47–50.
- Excoffier, L., Foll, M., Petit, R.J. (2009) Genetic Consequences of Range Expansions. *Annual Reviews*, **40**, 481 – 501.
- Fu, Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915–925.
- Frodin, D.G. (2004) History and concepts of big plant genera. *Taxon*, **53**, 753–776.
- Giannini, T.C., Siqueira, M. F., Acosta, A. L., Barreto, F. C. C., Saraiva, A. M. & Alves dos Santos, I. (2012) Desafios atuais da modelagem preditiva de distribuição de espécies. *Rodriguésia*, **63**, nº 3.

- Gregory-Wodzicki, K.M. (2000) Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Geological Society of America Bulletin*, **112**, 1091-1105.
- Haffer, J. & Prance, G.T. (2001) Climatic forcing of evolution in Amazonia during Cenozoic: On the refuge theory of biotic differentiation. *Amazoniana*, **16**, 579 – 608.
- Hamilton, M.B. (1999) Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, **8**, 513 – 525
- Hardesty, B.D., Dick, C.W., Hamrick, J.L., Degen, B., Hubbell, S.P. & Bermingham, E. (2010) Geographic influence on genetic structure in the widespread Neotropical tree *Simarouba amara* (Simaroubaceae). *Tropical Plant Biology*, **3**, 28–39.
- Heller, R., Chikhi, L. & Siegmund H.R. (2009) The Confounding Effect of Population Structure on Bayesian Skyline Plot Inferences of Demographic History. *PLoS ONE*, **8**, e62992.
- Honorio, E.N.C., Dexter, K.G., Poelchau, M.F., Hollingsworth, P.M., Phillips, O.L. & Pennington, R.T. (2014) *Ficus insipida* subsp. *insipida* (Moraceae) reveals the role of ecology in the phylogeography of widespread Neotropical rain forest tree species. *Journal of Biogeography*, **41**, 1697-1709.
- Kelchner, S.A. (2000) The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Annals of Missouri Botanical Garden*, **87**, 499 – 527.
- Kim, K.-J. & Lee, H.-L. (2004) Complete chloroplast genome sequences from Korean ginseng (*Panax schinseng* Nees) and comparative analysis of sequence evolution among 17 vascular plants. *DNA Research*, **11**, 247–261.
- Kuhner, M.K (2006) LAMARC 2.0: Maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics*, **22**, 768–770.
- Lapate, M.E. (2009) Frugivoria de *Ficus* (Moraceae) por aves em paisagens com diferentes níveis de fragmentação florestal no Estado de São Paulo. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Ledru, M.P., Ceccantini, G., Gouveia, S.E.M. (2006) Millenial scale climatic and vegetation changes in a northern Cerrado (Northeast, Brazil) since the last glacial maximum. *Quaternary Science Reviews*, **25**, 1110–1126.
- Lemes, M.R., Dick, C.W., Navarro, C., Lowe, A.J., Cavers, S. & Gribel, R. (2010) Chloroplast DNA microsatellites reveal contrasting phylogeographic structure in mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) from Amazonia and Central America. *Tropical Plant Biology*, **3**, 40–49.
- Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A.J. & Suchard, M.A. (2009) Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Computational Biology*, **5**, e1000520.

- Li, H.-Q, Chen, J.-Y., Wang, S., Xiong, S.-Z. (2012) Evaluation of six candidate DNA barcoding loci in *Ficus* (Moraceae) of China. *Molecular Ecology*, **12**, 783 – 790.
- Librado, P., Rozas, J., (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451–1452.
- Lima, N.E., Lima-Ribeiro, M.S., Tinoco, C.F., Terribile, L.C. & Colevatti, R.G. (2014) Phylogeography and ecological niche modelling, coupled with the fossil pollen record, unravel the demographic history of a Neotropical swamp palm through the Quaternary. *Journal of Biogeography*, **41**, 673 – 686.
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.*; **27**, 209–220.
- Mayle, F.E., Beerling, D.J., Gosling, W.D. & Bush, M.B. (2004) Responses of Amazonian ecosystems to climatic and atmospheric carbon dioxide changes since the last glacial maximum. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **359**, 499–514.
- Miller, M.P. (2005) Alleles In Space (AIS): Computer Software for the Joint Analysis of Interindividual Spatial and Genetic Information, *Journal of Heredity*, **96**, 722 – 724.
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press: New York.
- Novaes R. M. L., Filho J. P. L., Ribeiro R. A. R. & Lovato M. B. (2010) Phylogeography of *Plathymenia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrado in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology*, **19**, 985 – 998.
- Pamilo, P, Nei M (1988) Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, **5**, 568–583.
- Pearson, R.G. (2007) *Specie's Distributions Modeling for Conservation Educators and Practitioners*. National Science Foundation.
- Pennington, R.T., Lavin, M, Prado DE, et al (2004) Historical climate change and speciation: neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both tertiary and quaternary diversification. *Philosophical Transactions Royal Society B*, **359**, 515–537.
- Pennington, R.T., Ratter, J.A. & Lewis, G.P. (2006) An overview of the plant diversity, biogeography and conservation of Neotropical savannas and seasonally dry forests. *Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant biodiversity, biogeography and conservation* (ed. by R.T. Pennington, G.P. Lewis and J.A. Ratter), pp. 1–29. The Systematics Association special volume, No. 69.
- Pennington, R.T., Lavin, M., Oliveira-Filho, A. (2009) Woody plant diversity, evolution, and ecology in the Tropics: perspectives from Seasonally Dry Forests. *Annual Reviews*, **40**, 437 – 457.

- Pereira, R.A.S., Rodrigues, E. & Menezes Jr., A.O. (2007) Phenological patterns of *F. citrifolia* (Moraceae) in a seasonal humid-subtropical region in Southern Brazil. *Plant Ecology*, **188**, 265 – 267.
- Phillips, S.J. & Dudík, M. (2008) Modeling of species distributions with maxent: New extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*, **31**, 161-175.
- Posada, D. & Crandall, K.A. (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 37 – 45.
- Posada, D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253–1256.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, W., Drummond, A. J. (2013) Tracer v1. 6. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Ramos, A.C.S., Lemos-Filho, J.P., Ribeiro, R.A., Santos, F.R., Lovato, M.B. (2007) Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. *Annals of Botany*, **100**, 1219–1228.
- Rasplus, J.Y. & Soldati, L. (2006) Familia Agaonidae. *Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical* (ed. by F. Fernández and M.J. Sharkey), pp. 683-698. Sociedad Colombiana de Entomología & Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C.
- Ribeiro, R.A., Lemos-Filho, J.P., Ramos, A.C. & Lovato, M.B. (2010). Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, **106**, 46–57.
- Rogers, A.R. & Harpending, H. (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552–569.
- Rønsted, N., Weiblen, G.D., Cook, J.M., Salamin, N., Machado, C.A. & Savolainen P. (2005) 60 million years of co-divergence in the fig-wasp symbiosis. *Proceeding of the Royal Society Biological Sciences. Ser. B*, **272**, 2593–2599.
- Rymer, P.D., Dick, C.W., Vendramin, G.G., Buonamici, A. & Boshier, D. (2013) Recent phylogeographic structure in a widespread ‘weedy’ Neotropical tree species, *Cordia alliodora* (Boraginaceae). *Journal of Biogeography*, **40**, 693–706.
- Sang, T., Crawford, D.J. & Stuessy, T.F. (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, **84**, 1120–1136.
- Scotti-Saintagne, C., Dick, C. W., Caron, H., Vendramin, G. G., Troispoux, V., Sire, P., Casalis, M., Buonamici, A., Valencia, R., Lemes, M.R., Gribel, R. & Scotti, I. (2013a) Amazon diversification and cross-Andean dispersal of the widespread Neotropical tree species *Jacaranda copaia* (Bignoniaceae). *Journal of Biogeography*, **40**, 707–719.

- Scotti-Saintagne, C., Dick, C.W., Caron, H., Vendramin, G.G., Guichoux, E., Buonamici, A., Duret, C., Sire, P., Valencia, R., Lemes, M. R., Gribel, R. & Scotti, I. (2013b) Phylogeography of a species complex of lowland Neotropical rain forest trees (*Carapa*, Meliaceae). *Journal of Biogeography*, **40**, 676–692.
- Shanahan, M., So, S., Compton, S.G. & Corlett, R. (2001) Fig-eating by vertebrates frugivores: a global review. *Biological Reviews* **76**, 529–572.
- Tajima F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585–595.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596–1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) Clustal-w - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680.
- Turchetto-Zolet, A.C., Pinheiro, F., Salgueiro, F. & Palma-Silva, C. (2012a) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, **22**, 1193–1213.
- Turchetto-Zolet, A.C., Cruz, F., Vendramin, G.G., Simon, M.F., Salgueiro, F., Margis-Pinheiro, M. & Margis, R. (2012b) Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae–Caesalpinioideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **65**, 174–182.
- Vieira, F.A., Novaes, R.M.L., Fajardo, C.G., Santos, R.M., Almeida, H.S., Carvalho, D., Lovato, M.B. (2015) Holocene southward expansion in seasonally dry tropical forests in South America: phylogeography of *Ficus bonijesulapensis* (Moraceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **155**, 189 – 201.
- Yu, H., Nason, J.D., Xuejun, G.E. & Zeng, J. (2010) Slatikin's Paradox: when direct observation and realized gene flow disagree. A case study in *Ficus*. *Molecular Ecology*, **19**, 4441–4453.
- Yu, H. & Nason, J.D. (2013) Nuclear and chloroplast DNA phylogeography of *Ficus hirta*: obligate pollination mutualism and constraints on range expansion in response to climate change. *New Phytologist*, **197**, 276–289.
- Weiblen, G.D. (2002) How to be a fig wasp. *Annual Review of Entomology*, **47**, 299–330.
- Wolfe, K.H., Li, W.H. & Sharp, P.M. (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **84**, 9054–9058.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo caracterizou a diversidade genética de três espécies de figueiras amplamente distribuídas nas diversas fitofisionomias da região Neotropical. Os padrões intraespecíficos de distribuição da diversidade genética foram fortemente influenciados pelas características biológicas das espécies. *Ficus insipida* e *F. adhatodifolia* são espécies que ocorrem em baixas altitudes e próximas a corpos d'água ficando restritas as formações florestais de cobertura mais fechada da região Neotropical. Esta restrição pode explicar as características genéticas encontradas que alterações demográficas nas duas espécies. Durante as oscilações paleoclimáticas do Quaternário, períodos mais secos e frios foram intercalados com períodos úmidos e quentes. Nos períodos mais secos, espécies de plantas adaptadas a ambientes mais úmidos podem ter diminuído a sua distribuição, como *F. insipida* e *F. adhatodifolia*. Por outro lado, o aumento de períodos secos parece ter levado a expansão de arbóreas tolerantes a seca que ocorrem em formações abertas como *F. citrifolia*, que é uma espécie frequente em bordas e clareiras de mata.

Por meio das análises filogeográficas realizadas no presente estudo também foi possível inferir os processos de diversificação nas espécies de figueiras Neotropicais. As análises bayesianas estimaram eventos de diversificação inter e intraespecíficos durante o Pleistoceno. A separação recente entre *F. insipida* e *F. adhatodifolia*, aliada a sobreposição na distribuição das duas espécies na região central da América do Sul, onde provavelmente houve uma região de contato entre a Amazônia e a Mata Atlântica durante os períodos interglaciais, favoreceu a ocorrência de hibridação seguida de introgressão. Evidências de retração populacional nas populações de *F. adhatodifolia* reveladas pela modelagem, podem ter levado as populações da região central da América do Sul ao isolamento e, por deriva genética, os traços genéticos da introgressão foram mantidos.

Tanto em *F. insipida* como em *F. citrifolia*, indivíduos de populações muito distantes geograficamente compartilharam haplótipos, mesmo sem nenhuma evidência que indicasse hibridação recente ou passada. Estes padrões genéticos foram associados a retenção de polimorfismo ancestral devido a diversificação recente das espécies analisadas.

Os resultados do presente estudo também forneceram informações sobre o status taxonômico das espécies aqui estudadas. O padrão de compartilhamento de haplótipos entre *F. insipida* e *F. adhatodifolia*, tanto do cpDNA como do nrDNA sugerem hibridação restrita a uma região de contato. Entretanto, a separação de linhagens típicas de *F. adhatodifolia* em ambos os marcadores corroboram a classificação proposta por Berg & Villavicencio (2004), na qual *F. adhatodifolia* é considerada uma espécie (e não subespécie) filogeneticamente próxima a *F. insipida*. Por outro lado, a alta diferenciação genética entre as populações de *F. citrifolia* aliada a ampla distribuição da espécie, poderia estar relacionada a ocorrência de espécies crípticas. No entanto, não há diferenças genéticas (há dois clados, porém a divergência entre eles é baixa) e morfológicas suficientes que caracterizem a ocorrência de espécies crípticas. A alta diferenciação interpopulacional aliada a ausência de resolução geográfica na distribuição da diversidade genética do cpDNA de *F. citrifolia* podem estar associadas a eventos de dispersão a longas distâncias seguidos de fortes efeitos do fundador.

Estudos com espécies amplamente distribuídas podem revelar como as populações foram capazes de manter a diversidade genética e colonizar novas áreas durante e após eventos glaciais. O estudo comparado dos padrões de distribuição da diversidade genética podem contribuir para o entendimento da complexa influência das mudanças paleoclimáticas nos processos de diversificação de espécies na região Neotropical.

ANEXOS

Anexo I – Material Suplementar do capítulo I

Tabela S1. Lista de vouchers depositados em seus respectivos herbários no presente estudo. Lista das sequências utilizadas do GenBank, com seus respectivos códigos de acesso e vouchers. Amostras cuja amplificação foi feita a partir de material herborizado estão marcadas com asterisco.

Código da população	País	Lat	Long	Voucher (Código do Herbário)	Número de acesso no GenBank (marcador)	Sequência a serem depositadas (N)
1	México	19,17	-104,17	4580180 (MOBOT)	-	<i>trnH-psbA</i> (1); <i>trnS-trnG</i> (1)
1	México	16,56	-92,78	1666497 (F)	KJ734477 (ITS)	-
2	Guatemala	15,69	-88,61	3871304* (MOBOT)	-	<i>trnH-psbA</i> (1); <i>trnS-trnG</i> (1); ITS (1)
3	Costa Rica	9,12	-83,69	PCCosta19 (SPFR)	-	<i>trnH-psbA</i> (11); <i>trnS-trnG</i> (11); ITS (9)
3a	Panamá	9,16	-79,85	-	KJ34479 - KJ34483 (ITS)	-
4	Equador	-1,07	-77,62	EH654, 702, 710–717 (HOXA)	KJ734296, KJ734300-KJ734303 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734485-KJ734490 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (5)
5	Equador	-0,70	-76,48	AM19374, AM19649 (HOXA)	KJ344305 (<i>trnH-psbA</i>); KJ34491-KJ34492 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (1)
6	Equador	-0,66	-76,40	AM19650, AM19563 (HOXA)	KJ734307-KJ734308 (<i>trnH-psbA</i>)	<i>trnS-trnG</i> (2); ITS (1)
7	Peru	-3,45	-72,85	EH977–986 (MOL), Sandra Patiño s.n	KJ734309, KJ734311-KJ734318 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734493-KJ734497 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (5); ITS (2)
8	Peru	-3,62	-72,25	EH988–992, 1025, 1042, 1054–1056, KD9 (MOL)	KJ734320-KJ734322, KJ734327-KJ734330 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734498-KJ734502 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (8);
9	Peru	-6,31	-76,66	EH1164, 1169, 1170, 1172–1178 (MOL)	KJ734346, KJ734348, KJ734350- KJ734353 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734513- KJ734516 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (6); ITS (3)
10	Peru	-6,47	-76,33	EH1127, 1132, 1135, 1138, 1139, 1142–1144, 1149, 1151 (MOL)	KJ734357- KJ734359, KJ734361- KJ734363 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734517- KJ734521 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (6); ITS (1)

Tabela S1. Cont.

11	Peru	-4,90	-73,65	EH948, 954–960, 975 (MOL)	KJ734337- KJ734339, KJ734341- KJ734345 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734509- KJ734512 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (8)
12	Peru	-4,06	-73,20	EH913–918 (MOL)	KJ734331- KJ734336 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734503- KJ734507 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (6)
13	Peru	-8,83	-75,06	EH1219–1221, 1223–1226, 1233, 1235, 1236 (MOL)	KJ734367, KJ734367, KJ734370, KJ734373, KJ734375 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734522-KJ734526 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (5)
14	Peru	-8,87	-75,02	EH1238–1241, 1248–1251, 1254, 1256 (MOL)	KJ734376, KJ734378, KJ734379, KJ734384, KJ734385 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734527-KJ734530 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (5)
15	Peru	-11,09	-75,35	EH505–508, 547–552 (MOL)	KJ734386-KJ734390, KJ734392-KJ734395 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734531-KJ734533 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (9); ITS (2)
16	Peru	-11,19	-74,66	EH553, 556–565 (MOL)	KJ734398, KJ734404-KJ734406 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734534-KJ734538 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (4)
17	Peru	-11,90	-71,37	KD167–170 (MOL)	KJ734407-KJ734410 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734539- KJ734542 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (4)
18	Peru	-12,57	-70,10	KD45, 224, 259, 260 (MOL)	KJ734430- KJ734433 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734550- KJ734553 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (4)
19	Peru	-12,90	-71,37	EH1294,1318–1325, 1335, 1341 (MOL)	KJ734411-KJ734416, KJ734419-KJ734421 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734543- KJ734446 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (9); ITS (2)
20	Peru	-12,84	-69,29	EH1641–1645, KD3554–3556 (MOL)	KJ734423-KJ734427, KJ734429 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734548, KJ734549 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (6); ITS (2)
21	Brasil	-10,60	-68,54	-	-	<i>trnH-psbA</i> (3); <i>trnS-trnG</i> (2); ITS (4)
22	Brasil	-8,65	-63,91	PCCosta56, 58 (SPFR)	-	<i>trnH-psbA</i> (14); <i>trnS-trnG</i> (14); ITS (8)
23	Brasil	-3,17	-59,90	PCCosta6, 14 (SPFR)	-	<i>trnH-psbA</i> (12); <i>trnS-trnG</i> (12); ITS (8)

Tabela S1. Cont.

24	Guiana Francesa	4,66	-64,78	-	-	<i>trnH-psbA</i> (7); <i>trnS-trnG</i> (7); ITS (6)
25	Bolívia	-11,42	-69,09	EH1382, 1406–1410 (Herbario de Referencia Amazônica)	KJ734435, KJ734436, KJ734439, KJ734440 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734555	<i>trnS-trnG</i> (4); ITS (3)
26	Bolívia	-11,16	-67,47	EH1415, 1439, 1443–1446 (Herbario de Referencia Amazônica)	KJ734441- KJ734444 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734556 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (4); ITS (2)
27	Bolívia	-14,35	-67,68	EH1494–1503 (USZ)	KJ734452- KJ734454 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734557 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (3); ITS (2)
28	Bolívia	-17,09	-64,78	EH1559, 1560, 1562–1568, 1570 (USZ)	KJ734458, KJ734460-KJ734465 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734558, KJ734559 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (7); ITS (1)
29	Bolívia	-17,68	-63,58	EH1573, 1574, 1611,1612,1617–1622 (USZ)	KJ734469, KJ734471, KJ734472, KJ734474 (<i>trnH-psbA</i>); KJ734560, KJ734561 (ITS)	<i>trnS-trnG</i> (4); ITS (2)
30	Brasil	-21,17	-56,45	PCCosta4, 5 (SPFR)	-	<i>trnH-psbA</i> (11); <i>trnS-trnG</i> (11); ITS (5)
31	Brasil	-22,35	-59,32	4788762* (MOBOT)	-	<i>trnH-psbA</i> (1); <i>trnS-trnG</i> (1); ITS (1)
32	Brasil	-22,29	-49,55	RASPereira161 (SPFR)	-	<i>trnH-psbA</i> (1); <i>trnS-trnG</i> (1); ITS (1)
33	Brasil	-14,62	-39,36	PCCosta67, 69, 70, 73, 74 (SPFR)	-	<i>trnH-psbA</i> (6); <i>trnS-trnG</i> (6); ITS (3)
34	Brasil	-19,53	-40,46	PCCosta41 (SPFR)	-	<i>trnH-psbA</i> (3); <i>trnS-trnG</i> (3); ITS (3)
35	Brasil	-22,591	-44,26	-	-	<i>trnH-psbA</i> (7); <i>trnS-trnG</i> (7); ITS (3)
36	Brasil	-23,37	-44,78	RASPereira108, 109, 116 (SPFR)	-	<i>trnH-psbA</i> (8); <i>trnS-trnG</i> (8); ITS (4)

Tabela S1. Cont.

37	Brasil	-24,29	-48,42	RASPereira134	-	<i>trnH-psbA</i> (10); <i>trnS-trnG</i> (10); ITS (6)
38	Brasil	-26,99	-49,12	-	-	<i>trnH-psbA</i> (11); <i>trnS-trnG</i> (11); ITS (9)
39	Brasil	-29,21	-51,29	PCCosta66	-	<i>trnH-psbA</i> (6); <i>trnS-trnG</i> (6); ITS (3)

Tabela S2. Camadas bioclimáticas da base de dados WorldClim utilizadas para a geração dos modelos de distribuição das espécies estudadas

Camadas	Descrição
Bio1	Temperatura média anual
Bio2	Amplitude diária média (média mensal da Temp. max – Temp. min)
Bio5	Temperatura máxima do mês mais quente
Bio6	Temperatura mínima do mês mais frio
Bio12	Precipitação anual
Bio13	Precipitação do mês mais úmido
Bio14	Precipitação do mês mais seco

Tabela S3. Resultados da Análise Espacial de Variância Molecular (SAMOVA) para o cpDNA nas populações de *F. insipida* e *F. adhatodifolia*. Todos os testes foram significativos. Em negrito o valor de grupos K com maior F_{CT}

	K	F _{SC}	F _{ST}	F _{CT}	Composição dos grupos
Duas espécies					
	2	0,74	0,91	0,68	(33 a 41) - (demais populações)
	3	0,58	0,90	0,78	(33 a 41) - (6, 9, 10, 24, 30, 31, 32) - (demais populações)
	4	0,48	0,89	0,80	(33 a 41) - (1, 2, 3) - (6, 9, 10, 24, 28, 30, 31, 32) - (demais populações)
	5	0,45	0,90	0,82	(33 a 41) - (1, 2, 3) - (28) - (4, 6, 24) - (9, 10, 30, 31, 32) - (demais populações)
	6	0,42	0,90	0,82	(33 a 41) - (9, 10, 30, 31, 32) - (4, 6, 24) - (10) - (28) - (demais populações)
<i>F. insipida</i>					
	2	0,46	0,83	0,68	(6, 9, 10, 24, 28) - (demais populações)
	3	0,39	0,83	0,73	(6, 24, 28) - (9, 10) - (demais populações)
	4	0,35	0,83	0,75	(1, 2) - (6, 24, 28) - (9, 10) - (demais populações)
	5	0,19	0,80	0,75	(1, 2) - (3) - (4, 6, 24, 28) - (9, 10) - (demais populações)
<i>F. adhatodifolia</i>					
	2	0,82	0,99	0,94	(30, 31, 32) - (demais populações)
	3	0,69	0,98	0,94	(30, 31, 32) - (33) - (demais populações)

Figura S1. Modelagem da distribuição atual de *F. insipida* (azul) e *F. adhatodifolia* (verde) e a distribuição das populações utilizadas no presente estudo. Círculos representam as populações de *F. insipida* e triângulos representam as populações de *F. adhatodifolia* utilizadas nas análises moleculares.

Anexo II – Material Suplementar do capítulo II

Tabela S1. Camadas bioclimáticas da base de dados WorlClim utilizadas na geração dos modelos nos cenários atual, glacial (21.000 anos) e interglacial (140.000 anos).

Camadas	Descrição
Bio1	Temperatura média anual
Bio2	Amplitude diária média (média mensal da Temp. max – Temp. min)
Bio5	Temperatura máxima do mês mais quente
Bio6	Temperatura mínima do mês mais frio
Bio12	Precipitação anual
Bio13	Precipitação do mês mais úmido
Bio14	Precipitação do mês mais seco

Figura S1. Mapa de registros de ocorrência de *F. citrifolia* utilizados para a modelagem de distribuição da espécie.