

THAMYRES CARDOSO DA SILVEIRA

**ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA DO GÊNERO *Anadenanthera*
Speg. (LEGUMINOSAE - MIMOSOIDEAE) ESTIMADAS COM
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S587e
2014
Silveira, Thamyres Cardoso da, 1987-
Estrutura e diversidade genética do gênero
Anadenanthera Speg. (Leguminosae - Mimosoideae)
estimadas com marcadores microssatélites / Thamyres
Cardoso da Silveira. - Viçosa, MG, 2014.
viii, 40f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Luiz Orlando de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Anadenanthera* - taxonomia. 2. *Anadenanthera* -
genética. 3. Microssatélites. 4. Genética de populações.
5. Diversidade de plantas. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Programa de Pós-graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 633.3

THAMYRES CARDOSO DA SILVEIRA

**ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA DO GÊNERO *Anadenanthera*
Speg. LEGUMINOSAE (MIMOSOIDEAE) ESTIMADAS COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2014.

João Augusto Alves Meira Neto

Christina Cleo Vinson
(Coorientadora)

Luiz Orlando de Oliveira
(Orientador)

“O sucesso não é o final e o fracasso não é fatal, o que conta é a coragem para continuar”.

Winston Churchill

A Deus, por me permitir concluir essa etapa;

Aos meus pais, Maricélia e Gilson;

À minha tia Gilda;

À minha irmã Jaqueline.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida e por todas as graças concebidas.

A minha mãe Maricélia pelo exemplo de perseverança e força. Ao meu pai pela confiança depositada. A ambos pelo amor e por acreditarem sempre em meus sonhos e me apoiarem em todas as decisões. Amo vocês!

À minha tia Gilda por me ensinar que estudar faz toda a diferença.

Ao Johnny pela incansável ajuda durante toda a minha caminhada acadêmica, pelo carinho e companheirismo durante tantos anos.

Aos familiares que me deram apoio e afetuosamente torceram para que tudo desse certo: minha irmã Jaqueline, avós (Benícia e Mariá), Tia Jó, Tia Lili, Tia Lene, Ruth, Amanda, Patricia e Mariane, beijos e abraços sinceros.

À Universidade Federal de Viçosa e ao departamento de Biologia Vegetal/Botânica, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Luiz Orlando pela orientação, paciência, ensinamentos, apoio, confiança e disposição.

À minha co-orientadora Christina Vinson, pela paciência, amizade, dedicação e por todo conhecimento transmitido.

Aos professores Márcio Lacerda e Cláudia Fortes pela amizade e disponibilidade de ajuda mesmo distante.

As amigas de longa caminhada, Reiza, Gabriela, Larissa e Carina que mesmo distante me fazem perceber que quando a amizade é verdadeira ela permanece. Obrigada pelo carinho, atenção e companheirismo.

As irmãs Rafa e Eriquinha pela alegria, generosidade, ajuda constante e convivência maravilhosa que me proporcionam diariamente e que junto com a mãe Líbia, o pai Ismael e irmãos Gabriel e Vitorinha, fazem parte da minha família capixaba, vocês conquistaram um grande espaço em meu coração.

As amigas de república, Cláudia e Célia pela ótima convivência, ajuda e muitas gargalhadas. Ao meu companheiro Danilo pelo carinho, amizade e incentivo. Ao Rafael pela amizade e auxílio com as análises.

A família Filogeografia e agregados, Leandro, Hugo, Juliana, Flávio, Vanderson, Alexander, Alberto, Ana Paula, Valéria, Thaís, Gislaine, Eric, Amanda, Camila, Lis,

Isabella, Petiara. Fabi, Yhasmin, Cláudia e Felipe. Oxe! Oxe! Oxe! A baiana aqui fica muito agradecida pela ajuda, alegria e confraternizações do melhor lab do mundo!

Aos amigos do Biocafé e da Botânica Kátia, Dani, Karla e Dênia, Cristiele, José, Livia e Ronaldo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que a concretização dessa etapa fosse possível! O meu muito obrigada!

BIOGRAFIA

THAMYRES CARDOSO DA SILVEIRA, filha de Gilson Sampaio da Silveira e Maricélia Cardoso da Silveira, nasceu em 08 de agosto de 1987 em Ipiaú, Bahia.

Ingressou no curso de Ciências Biológicas, modalidade bacharelado em março de 2008, na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, vindo a graduar-se em fevereiro de 2012.

Em março de 2012 ingressou no Programa de Pós-graduação em Botânica, área de concentração Sistemática Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa, concluindo em fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	5
1. Estratégia de amostragem.....	5
2. Extração de DNA e análises de marcadores microsatélites.....	8
3. Análise de dados.....	10
3.1 Diversidade genética dentro de populações.....	10
3.2 Diversidade genética entre populações.....	10
3.3 Estrutura de populações.....	11
RESULTADOS.....	11
1. Transferabilidade dos marcadores microsatélites.....	11
2. Análise de diversidade genética.....	12
3. Diferenciação dos táxons de <i>Anadenanthera</i>	15
4. Diferenciação das populações de <i>Anadenanthera</i> sensu Altschul (1964).....	18
5. Diferenciação populacional dentro dos táxons de <i>Anadenanthera</i>	22
DISCUSSÃO.....	25
1. Microsatélites apoiam a divisão sensu Brenan (1953) do gênero <i>Anadenanthera</i>	25
2. Congruência parcial entre dados de SSR e de ITS.....	26
3. Comparação da diversidade genética entre espécies de <i>Anadenanthera</i>	27
4. Inferências sobre a história evolutiva de <i>Anadenanthera</i> e de florestas estacionais.....	29
CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

RESUMO

SILVEIRA, Thamyres Cardoso da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2014. **Estrutura e diversidade genética do gênero *Anadenanthera* Speg. (Leguminosae – Mimosoideae) estimadas com marcadores microssatélites.** Orientador: Luiz Orlando de Oliveira. Co-orientadora: Christina Cléo Vinson.

O gênero *Anadenanthera* (Leguminosae–Mimosoideae) está atualmente circunscrito como duas espécies com duas variedades cada uma de acordo com Altschul 1964: *A. colubrina* (Vell.) Brenan var. *colubrina*; *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul; *A. peregrina* (L.) Speg. var. *peregrina*; e *A. peregrina* var. *falcata* (Benth.) Altschul, mas já foram consideradas como quatro espécies distintas segundo a classificação de Brenan 1955: *A. colubrina* (Vell.) Brenan, *A. macrocarpa* (Benth.) Brenan, *A. peregrina* (L.) Speg. e *A. falcata* (Benth.) Speg. Espécies de *Anadenanthera* Speg. ocorrem na maioria dos núcleos disjuntos das florestas estacionais, sendo a espécie *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul mais amplamente distribuída nessas áreas e, por isso, considerada como espécie modelo para estudo da história evolutiva dessas florestas. O objetivo desse estudo foi caracterizar a diversidade genética de espécies do gênero *Anadenanthera* Speg. Doze marcadores microssatélites foram utilizados para genotipar 283 espécimes. Os resultados de três análises (STRUCTURE, NJ e PCoA) foram concordantes e mostraram claramente quatro grupos genéticos para o gênero *Anadenanthera*. A diferenciação de *A. colubrina* foi observada com microssatélites e ITS, mostrando congruência parcial entre os resultados desses marcadores. A diversidade genética em termos de riqueza alélica e heterozigosidade mostraram valores mais elevados e similares nas espécies *A. macrocarpa*, *A. peregrina* e *A. falcata* em comparação ao valor particularmente baixo encontrado para a espécie *A. colubrina*. Análises de pares de F_{ST} e número médio de migrantes entre populações de cada espécie sensu Altschul 1964 mostraram fluxo gênico restrito entre variedades. A diversificação de *A. colubrina* foi provavelmente anterior à diversificação das demais espécies. A baixa diversidade em *A. colubrina* foi possivelmente consequência da sua distribuição mais restrita e da elevada endogamia. A miscigenação das populações de *A. falcata* refletiu um cenário de expansão recente para essa espécie. Os resultados sugerem que a circunscrição das espécies de *Anadenanthera* proposta por Brenan é a mais adequada.

ABSTRACT

SILVEIRA, Thamyres Cardoso da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Genetic structure and diversity of genus *Anadenanthera* Speg. (Leguminosae – Mimosoideae) estimated with microsatellite markers.** Adviser: Luiz Orlando de Oliveira. Co-adviser: Christina Cléo Vinson.

The *Anadenanthera* genus (Leguminosae - Mimosoideae) is currently circumscribed into two species with two varieties each according to Altschul 1964: *A. colubrina* (Vell.) Brenan var. *colubrina*; *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul; *A. peregrina* (L.) Speg. var. *peregrina*; and *A. peregrina* var. *falcata* (Benth.) Altschul. However, they were already considered as four distinct species according to the classification of Brenan 1955: *A. colubrina* (Vell.) Brenan, *A. macrocarpa* (Benth.) Brenan, *A. peregrina* (L.) Speg. e *A. falcata* (Benth.) Speg. The *Anadenanthera* Speg. species occur in most of seasonal forests disjunct nucleus. The specie *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul is more widely distributed in these areas and therefore considered as a model species for studying the evolutionary history of the seasonal forests. The aim of this study was to characterize the genetic diversity of the genus *Anadenanthera* Speg. Twelve microsatellite markers were used to genotype 283 specimens. The results of three analyzes (STRUCTURE, NJ and PCoA) were concordant and showed clearly four genetic groups in the *Anadenanthera* genus. The differentiation of *A. colubrina* was observed with microsatellites and ITS and showed partial congruence between the results of these markers. The genetic diversity under allelic richness and heterozygosity showed higher and similar values in the species *A. macrocarpa*, *A. peregrina* and *A. falcata*, compared to the lowest values found for the species *A. colubrina*. Analyzes of pairs of F_{ST} and mean number of migrants between populations of each species sensu Altschul 1964 showed restricted gene flow between varieties. The diversification of *A. colubrina* was probably before the diversification of other species. The low diversity in *A. colubrina* was possibly a consequence of its more restricted distribution and high inbreeding. The admixture of populations of *A. falcata* reflected a scenario of recent expansion of this species. The results suggest that the division of the species of *Anadenanthera* proposed by Brenan is the most suitable.

INTRODUÇÃO

Embora representada por um histórico de negligência em comparação com as mais estudadas e conhecidas florestas tropicais úmidas (HUGHES et al., 2013), as florestas estacionais tropicais são atualmente um foco crescente de atenção, porque são altamente ameaçadas e pouco conhecidas (BULLOCK et al., 1995; MILES et al., 2006; PENNINGTON et al., 2006; SANTOS et al., 2012). O entendimento de sua importância biológica em termos de flora endêmica, biogeografia do bioma e diversidade de espécies, só se tornou evidente nessa última década, a partir de investigações mais focadas para essas florestas (HUGHES et al., 2013).

Florestas estacionais tropicais são formações florestais que ocupam áreas caracterizadas pela sazonalidade climática, apresentando um período chuvoso e quente seguido por períodos de secas prolongadas e baixas temperaturas (VELOSO et al., 1991; OLIVEIRA-FILHO e FONTES, 2000). Ocorrem atualmente de forma disjunta, como núcleos espalhados por toda a região neotropical (PENNINGTON et al., 2009) e muitas vezes associadas a vários tipos vegetacionais (PENNINGTON et al., 2000; OLIVEIRA-FILHO et al., 2006; GARCIA et al., 2011).

A distribuição fragmentada das florestas estacionais tropicais tem sido explicada por duas principais hipóteses: A hipótese do “Arco Pleistocênico” de Prado e Gibbs (1993) que sugere que as atuais florestas estacionais são parte de uma grande formação que durante o Pleistoceno cobria a América do Sul e que hoje constituem verdadeiras relíquias formadas por eventos vicariantes. E uma segunda hipótese que relaciona a fragmentação como o resultado da migração e dispersão á longa distância (GENTRY, 1982; MAYLE, 2004).

De acordo com Prado e Gibbs (1993) espécies de ampla distribuição em florestas estacionais tais como *Anadenanthera colubrina* var *cebil*, podem ser usadas como modelo para afirmar a distribuição contínua dessas florestas, a hipótese do “Arco Pleistocênico”.

Anadenanthera Speg. sensu Altschul (1964) é um gênero arbóreo, representante da família Leguminosae, subfamília Mimosoideae e tribo Mimoseae (LUCKOW et al., 2003). Esse gênero pode ser reconhecido pela combinação de flores diplostêmones, folhas com nectário peciolar, inflorescência em glomérulo, fruto do tipo folículo e sementes comprimidas com ala estreita e marginal (QUEIROZ, 2009). Apresenta uma

distribuição neotropical, estando presente nas Grandes Antilhas e por todo o Norte da América do Sul, no Peru, Bolívia, Paraguai e Argentina (LEWIS et al., 2005). No Brasil, tem ocorrência predominante em Florestas Estacionais distribuídas em todas as regiões brasileiras, nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (LORENZI, 2002; QUEIROZ, 2009; MORIM, 2014). Suas espécies apresentam um potencial de uso muito diversificado, desde extração de tanino, indústria moveleira, reflorestamento, paisagismo e até mesmo uso na medicina popular (ALTSCHUL, 1964; FERRAZ et al., 2006; PAES et al., 2006)

De acordo com a classificação de Brenan (1955), o gênero *Anadenanthera* é representado por quatro espécies distintas: *A. colubrina* (Vell.) Brenan, *A. macrocarpa* (Benth.) Brenan, *A. peregrina* (L.) Speg. e *A. falcata* (Benth.) Speg. Altschul (1964), considera o gênero *Anadenanthera* composto apenas por duas espécies com duas variedades cada, sendo elas: *A. colubrina* (Vell.) Brenan var. *colubrina*, *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul, *A. peregrina* (L.) Speg. var. *peregrina* e *A. peregrina* var. *falcata* (Benth.) Altschul. (Tabela 1).

Tabela 1. Conceitos adotados por Brenan (1955) e Altschul (1964).

Brenan (1955)	Altschul (1964)
<i>A. colubrina</i>	<i>A. colubrina</i> var. <i>colubrina</i>
<i>A. macrocarpa</i>	<i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i>
<i>A. peregrina</i>	<i>A. peregrina</i> var. <i>peregrina</i>
<i>A. falcata</i>	<i>A. peregrina</i> var. <i>falcata</i>

As quatro espécies do gênero *Anadenanthera* sensu Brenan (1955) são diferenciadas morfológicamente pela presença ou ausência de glândula na antera, sexualidade e coloração da flor e comprimento de foliólulos (TAMASHIRO, 1989)

Altschul (1964), por sua vez, diferencia as duas espécies de *Anadenanthera* também por meio de caracteres morfológicos, como textura do fruto associada com a presença ou ausência de uma pequena glândula na ponta da antera e posição da bráctea involucrel.

Espécies são consideradas entidades da natureza que surgem através de eventos de especiação (MAYDEN, 2002). Entretanto, reconhecer espécies tem se tornado difícil principalmente porque mais de trinta conceitos de espécies são conhecidos hoje

(HOHENEGGER, 2014). Do ponto de vista biológico, espécie é definida como grupos de populações naturais inter cruzantes que são reprodutivamente isolados de outros grupos (MAYR, 1942). Variedade, táxon infraespecífico, é um grupo de indivíduos dentro de uma espécie com uma ou mais características distintas, mas capazes de se reproduzir livremente com todos os outros membros da espécie (DARWIN, 1859).

Silva (2010) explorou as relações filogenéticas e filogeográficas do gênero *Anadenanthera* utilizando sequências da região completa dos espaçadores internos transcritos (ITS) dos genes nucleares de RNA ribossomal 18S-26S. Os resultados confirmaram apenas a monofilia de *A. colubrina* var. *colubrina*, revelando ausência de congruência entre as linhagens genealógicas identificadas com ITS e os grupos taxonômicos reconhecidos para o gênero *Anadenanthera*. Além disso, um possível agrupamento relacionado com o tempo de diversificação dos espécimes avaliados foi sugerido (Figura 1).

Microsatélites ou Short tandem repeats (STRs) ou Simple sequence repeats (SSRs) são pequenas sequências de um a seis pares de bases repetidas em tandem que tem ocorrência frequente em todos os genomas de procariotos e eucariotos. Esses marcadores moleculares tem se destacado em estudos genéticos de plantas devido aos seus vários atributos desejáveis, incluindo hipervariabilidade, natureza multialélica, herança codominante, reprodutibilidade, abundância relativa e cobertura extensiva do genoma (KALIA et al., 2010). Microsatélites são amplamente utilizados em diversas áreas como diversidade genética, taxonomia, filogenia, filogeografia, mapeamento genético, genômica funcional, seleção assistida, testes de paternidade e genética forense.

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética de espécies do gênero *Anadenanthera* Speg., bem como realizar inferências filogeográficas. Os objetivos específicos foram responder as seguintes questões: (1) Qual a relação da estrutura genética obtida por marcadores microsatélites com as divisões *sensu* Alschul (1964) e *sensu* Brenan (1955) do gênero *Anadenanthera*? (2) A estrutura genética obtida por meio de marcadores SSR corresponde com a gerada por ITS para o gênero *Anadenanthera*? (3) Como a diversidade genética está particionada dentro de espécies do gênero *Anadenanthera*? (4) Qual a contribuição da estrutura genética de populações de *Anadenanthera* para a história evolutiva das florestas estacionais?

Os resultados desse trabalho apresentam contribuição para a taxonomia de *Anadenanthera*. Além disso, eles ajudam a compreender a atual distribuição das florestas estacionais através da estrutura genética encontrada nas espécies de *Anadenanthera* nos núcelos dessas florestas.

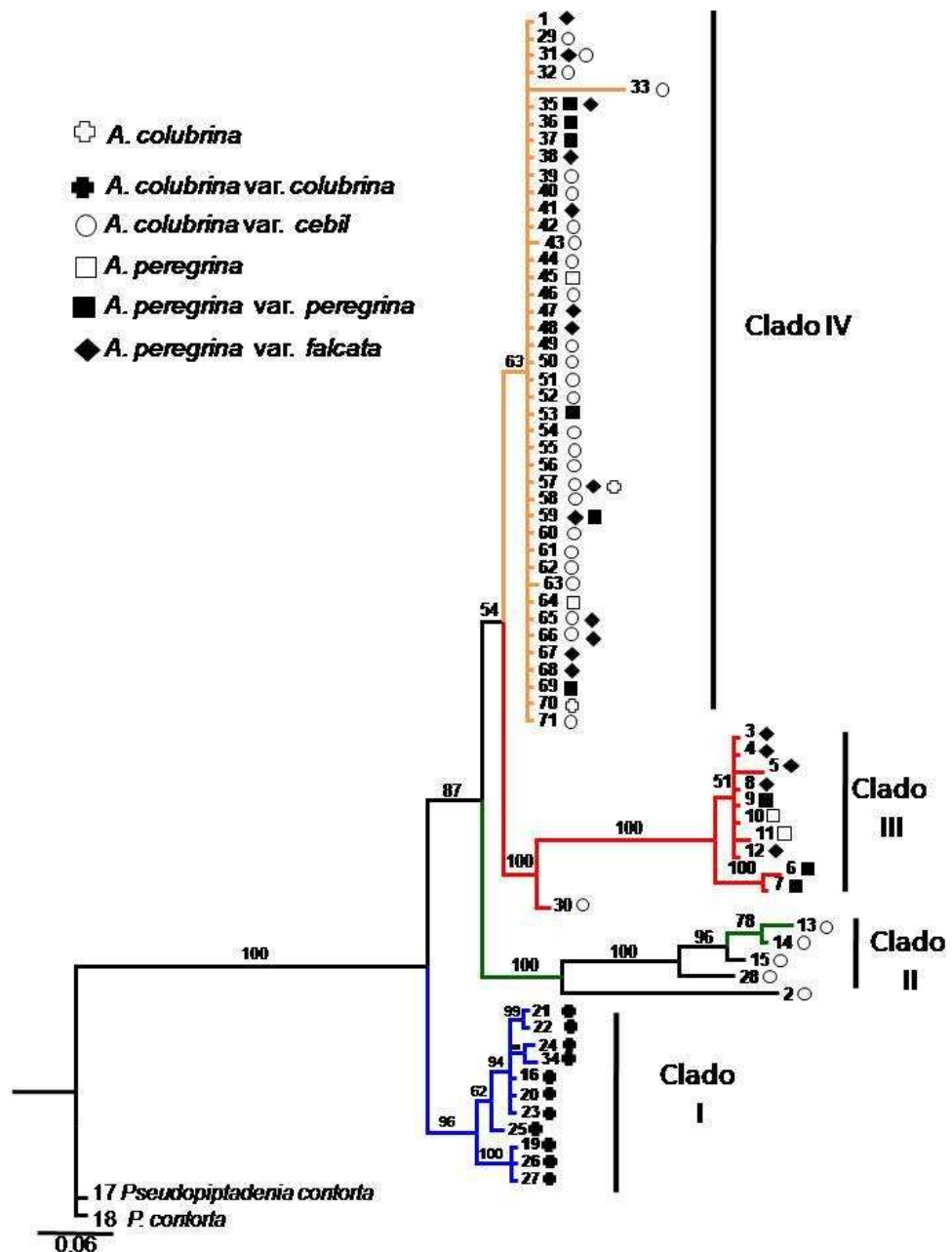


Figura 1. Filogenia Bayesiana (árvore consenso) do conjunto de dados de ITS de seqüências de *Anadenanthera* Speg. e *Pseudopiptadenia contorta* (DC) G.P. Lewis & M.P. Lima como grupo externo (adaptada de Silva, 2009).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Estratégia de amostragem

Foram utilizados 283 indivíduos do gênero *Anadenanthera* Speg. Segundo a classificação sensu Brenan (1955), 101 indivíduos da espécie *A. macrocarpa* (táxon CCE), 57 da espécie *A. colubrina* (táxon CCO), 62 da espécie *A. peregrina* (táxon PPE) e 63 da espécie *A. falcata* (táxon PFA). Na classificação sensu Altschul (1964), 158 indivíduos da espécie *A. colubrina* e 125 da espécie *A. peregrina*. Esses indivíduos representaram uma grande área de distribuição geográfica no Brasil (24 populações) bem como uma população amostrada no leste da Bolívia (Figura 1).

As populações amostradas foram separadas em quatro espécies de acordo com a classificação de *Anadenanthera* sensu Brenan (1955). Indivíduos de uma mesma espécie com distância superior a 50 km foram agrupados em diferentes populações. O tamanho amostral por população variou de quatro a 19, com média de 11,32 indivíduos por população. A amostragem abrangeu seis ecorregiões Neotropicais (OLSON et al., 2001) (Figura 2; Tabela 2).

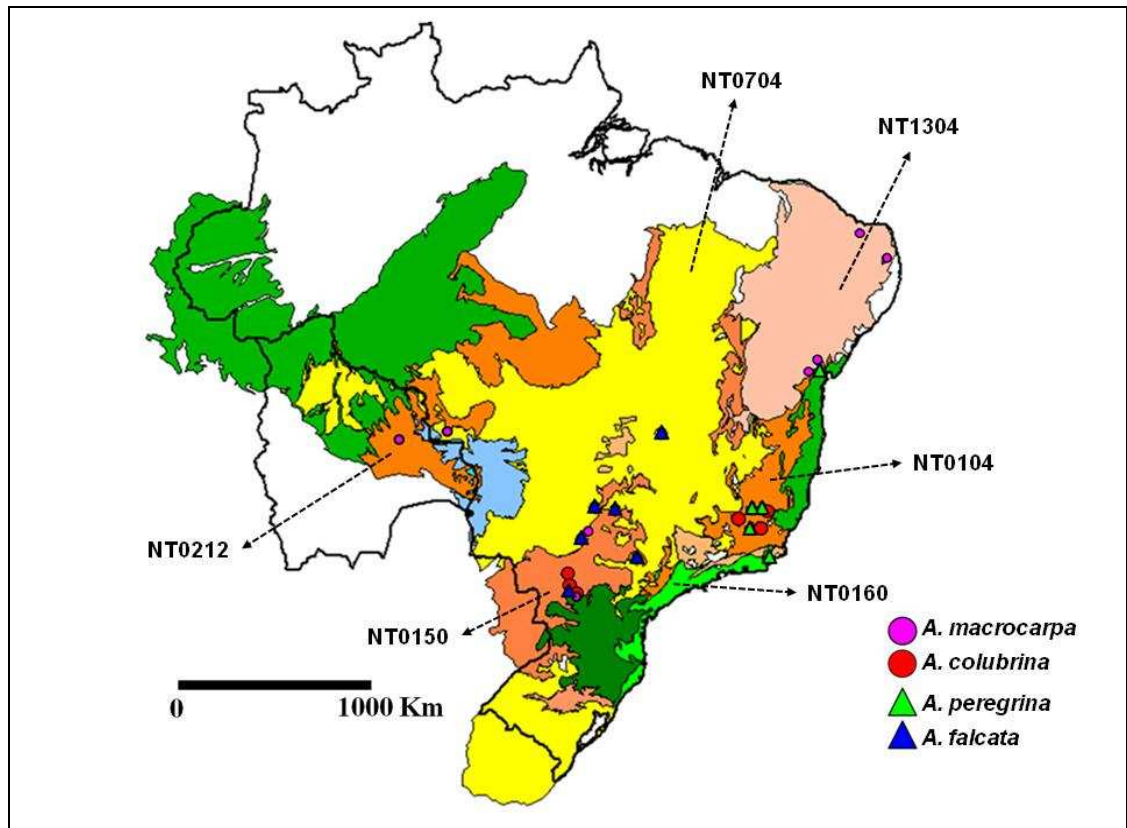


Figura 2. Distribuição geográfica das 25 populações de *Anadenanthera* Speg. (círculos e triângulos). Cada cor representa uma espécie de *Anadenanthera* sensu (BRENAN, 1955), *A. macrocarpa* (rosa), *A. colubrina* (vermelho), *A. peregrina* (verde) e *A. falcata* (azul). As ecorregiões terrestres de OLSON et al. (2001) incluem: NT0104, Bahia interior forests; NT0150, Paraná-Paraíba interior forests; NT0160, Serra do Mar coastal forests; NT0212, Chiquitano dry forests; NT0704, Cerrado; NT1304, Caatinga.

Tabela 2. Populações de espécies de *Anadenanthera* Speg. sensu Brenan (1955) amostradas, com suas respectivas ecorregiões, códigos, tamanho amostral e coordenadas geográficas.

Ecorregião	População (código)	Tamanho amostral	Latitude	Longitude
A. macrocarpa				
NT0212	INPA-Concepción/Bolívia (BOL)	11	-16 12' 30,20"	-61 42' 39,83"
NT1304 (ecótono)	Bonfim de Feira/BA (BFE)	13	-12 09' 42,00"	-39 11' 02,00"
NT1304 (ecótono)	Itatim – Morro das Tocas/BA (ITA)	15	-12 43' 00,00"	-39 42' 00,00"
NT1304	Floresta nacional de Açu - Açu/RN (AÇU)	16	-05 34' 53,10"	-36 56' 38,20"
NT1304	Serra da Jurema, Guarabira/PB (SJU)	4	-06 51' 19,86"	-35 29' 24,45"
NT0212 (ecótono)	Estância V. Cardoso, Porto Esperidião/MT (EVC)	16	-15 47' 09,00"	-59 11' 26,00"
NT0150 (ecótono)	Castilho – Margem do Rio Parana/SP (CAS)	18	-20 54' 24,70"	-51 36' 56,60"
NT0150 (ecótono)	Paranaíba/MS (PAR)	8	-19 41' 15,40"	-51 16' 11,00"
A. colubrina				
NT0104	Floresta Estadual Uaimii - Ouro Preto/MG (FEU)	16	-20 14' 57,41"	-43 34' 16,76"
NT0104	Parque E. S. do Brigadeiro Fervedouro/MG (PSB)	17	-20 41' 01,00"	-42 26' 41,00"
NT0104	Estação B. de Caratinga - Caratinga/MG (EBC)	5	-19 47' 24,00"	-42 08' 20,00"
NT0150	Cianorte/PR (CIA)	4	-23 40' 19,61"	-52 36' 05,76"
NT0150	Amaporã/PR (AMA)	4	-23 05' 29,14"	-52 47' 00,72"
NT0150 (ecótono)	Parque E. Lago Azul - Campo Mourão/PR (PLA)	11	-24 06' 25,80"	-52 18' 47,40"
A. peregrina				
NT0104	UFV - Viçosa/MG (VIC)	15	-20 46' 39,60"	-42 51' 45,26"
NT0160 (ecótono)	Macaé/RJ (MAC)	8	-22 21' 12,50"	-41 53' 03,94"
NT0104 (ecótono)	Cruz das Almas/BA (CDA)	10	-12 40' 19,00"	-39 06' 22,00"
NT0104	Parque E. do Rio Doce - Marliéria/MG (PRD)	14	-19 42' 48,05"	-42 43' 55,30"
NT0104	Estação B. de Caratinga - Caratinga/MG (EBC2)	15	-19 47' 24,00"	-42 08' 20,00"
A. falcata				
NT0150 (ecótono)	Campo Mourão/PR (CMO)	10	-24 03' 06,00"	-52 22' 38,00"
NT0704 (ecótono)	Iturama/MG (ITU)	19	-19 46' 18,10"	-50 06' 51,50"
NT0704 (ecótono)	Jardim B. M. de Baurú – Baurú/SP (JBB)	12	-22 20' 52,90"	-49 00' 40,30"
NT0704 (ecótono)	Paranaíba/MS (PAR2)	6	-19 40' 57,30"	-51 15' 34,70"
NT0704 (ecótono)	RPPN Cisalpina - Cisalpina/MS (CIS)	8	-21 18' 80,90"	-51 55' 40,20"
NT0704	Reserva do IBGE – Brasília/DF (BRA)	8	-15 50' 16,00"	-47 42' 48,00"
TOTAL		283		

2. Extração de DNA e análise de marcadores microssatélites

Amostras de folhas foram secas em sílica gel dentro de sacos plásticos zip-lock. O DNA total foi extraído segundo o protocolo de Cota-Sánchez et al. (2006) com as modificações de Riahi et al. (2010). Algumas amostras extraídas anteriormente por Silva (2010) também foram utilizadas nesse estudo.

A genotipagem das populações amostradas foi feita usando doze marcadores microssatélites. Dez marcadores desenvolvidos por Feres et al. (2012) para *A. colubrina* (Acol01, Acol05, Acol11, Acol12, Acol13, Acol14, Acol15, Acol16, Acol17 e Acol18) e dois marcadores (Ac34.3 e Ac162.1) desenvolvidos por Barrandeguy et al. (2012) para *A. colubrina* var. *cebil* (Tabela 2). A porcentagem média de dados perdidos para todos os doze primers foi de 10,01%, variando de 5,30% (Acol01 e Ac34.3) a 15,55% (Acol18).

As reações de polimerase em cadeia (PCR) foram conduzidas em sistema multiplex (multiplex Acol05-Acol12-Acol14; duplex Acol11-Acol13; duplex Acol15-Acol16; e duplex Ac34.3-Ac162.1) e pseudomultiplex (Acol01; Acol17, e Acol18) com volume final de 12 μ L, contendo 10 ng de DNA, 1X tampão (10 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 1% Triton X-100), 0,2 μ M de cada primer (forward e reverse), 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,25 mg/mL de BSA (Bovine Serum Albumin, Invitrogen), 0,2 mM de dNTPs e 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Phonectria Biotecnologia). O programa utilizado no termociclador Vapo Protect Eppendorf Thermal Cyclor consistiu de 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de acordo com o primer utilizado, variando de 52°C a 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e, para extensão final, 72°C por 20 minutos.

Todos os primers forwards foram marcados com fluorescências 6-FAM, HEX (MWG-Biotech) ou NED (Applied Biosystems) (Tabela 3). Os fragmentos foram mensurados no sequenciador 96 capilares ABI PRISM 3130x1 DNA Analyser (Applied Biosystems) utilizando o tamanho padrão Rox 500 (Applied Biosystems). Os fragmentos foram analisados no software GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems).

Tabela 3. Informações sobre os 12 primers microssatélites utilizados: fonte, nome do primer, sequências dos primers, repetição do motif de microssatélites, fluorescência utilizada na marcação dos primers forward, o número total de alelos por loco (N_A) e a amplitude alélica em pares de base (pb).

Fonte	Primer	Sequência do primer (5'-3')	Temperatura de anelamento (C°)	Repetição	Fluorescência	N_A	Amplitude alélica (pb)
Feres, 2012	Acol01	F: GGTGAGATAGCTGAAGTTCG R: GAATTTCAACTCCCCATG	54	(AT) ₆	6-FAM	18	159-193
	Acol05	F: TGGACTTTTGCCTGGACACR: R: CCCACCCACCTAGAACTGTC	58	(GA) ₂ A(GA) ₇	NED	13	212-252
	Acol11	F: GGAAATGCAAGATCAGAGGCTC R: GTTTGGTTGATTGAGGATGTCCT	60	(CA) ₉	NED	13	160-204
	Acol12	F: CCCCACATTTAGAACAGGAG R: CCACCTGGATGATGTTTC	58	(TA) ₉	HEX	14	103-131
	Acol13	F: CTTATTGCCTACTCCCTAACC R: GCATGGGGTCTTGATCC	60	(AG) ₁₅	HEX	21	104-156
	Acol14	F: GCGATACCCCTTGATG R: GGCGAATGACCATCTTATC	58	(GA) ₁₁	6-FAM	14	172-202
	Acol15	F: CATATGTCCAATCAGGTTAGAC R: CTCATTTGGTGACTGTAAGC	58	(GA) ₁₀	HEX	19	114-150
	Acol16	F: AAGGTCCAAGGGTTATGC R: GGACGTTCTCTTGTCATGC	58	(TC) ₁₁ (CA) ₅ AA(CA) ₅	NED	25	193-245
	Acol17	F: ACTCTCGACAACAAGTAATTC AAC R: CAACAGCCAATGACAATGATG	58	(AG) ₉	6-FAM	15	171-201
	Acol18	F: GTCAGGTATTCAATCTTCTACGT R: CACCATACCTCCACCTCATC	58	(TG) ₁₀	6-FAM	18	149-185
Barrandeguy, 2012	Ac34.3	F: CCATTCTACAACACGCAAGTG R: CCTCCAATTCCTCCA ACTCC	58	(CT) ₂₁ (GT) ₃	NED	17	163-199
	Ac162.1	F: TGTATGTGTGAATATGGAAGTTGC R: GCAGTGCATGTGACCACCTT	58	(GA) ₂₄	HEX	25	93-147

3. Análise de dados

3.1. Diversidade genética dentro de populações

O software MICROCHECKER v. 2.2.3 Oosterhout et al. (2004) foi utilizado para estimar a frequência de alelos nulos com o algoritmo Oosterhout. Desequilíbrio de ligação entre todos os pares de locos e desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) em cada loco para cada população foram testados usando o software FSTAT version 2.9.3.2 Goudet (1995). O software GDA Lewis e Zaykin (2001) foi utilizado para calcular em cada população, o número médio de alelos por loco (A/loco), alelos privados (A_{PRIV}), heterozigosidade esperada (H_E), heterozigosidade observada (H_O) e coeficiente de endogamia (F_{IS}).

3.2. Diversidade genética entre populações

Estimativas de parâmetros de Weir e Cockerham (1984) como índices de fixação dentro das populações (F_{IS}), índice de fixação total (F_{IT}) e diferenciação genética entre populações (F_{ST}), juntamente com outros dois estimadores de divergência populacional o G_{ST} e R_{ST} (SLATKIN, 1995; GOODMAN, 1997) foram calculadas utilizando o software FSTAT version 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). Essas estimativas foram geradas para as duas espécies de *Anadenanthera* sensu Altschul (1964) e também para as quatro espécies sensu Brenan (1955) Com a finalidade de testar a significância de cada estimativa, foi utilizado 1000 permutações com 95% de intervalo de confiança. Os índices G_{ST} e F_{ST} assumem um modelo de alelo infinito (IAM) e são análogos, enquanto R_{ST} é baseado no tamanho do alelo (stepwise mutation model, SMM). Se o modelo de mutação stepwise para microssatélite contribuir para diferenciação alélica entre populações, valores de R_{ST} serão maiores que o de F_{ST} .

Os pares de F_{ST} (WEIR e HILL, 2002) e o número absoluto de migrantes ($M=2Nm$) entre populações de cada espécie do sensu Altschul (1964) e de cada espécie do sensu Brenan (1955), foram calculados com o software ARLEQUIN version 3.1 (EXCOFFIER et al., 2005). Também foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA) com dados particionados nos dois grupos de espécies. A significancia da

AMOVA foi testada por 1000 permutações usando o ARLEQUIN version 3.1 (EXCOFFIER et al., 2005).

A relação genética entre populações foi estimada pela construção da árvore de neighbor-joining (NJ), baseada na distância genética D_A (NEI et al., 1983), usando o software POPULATIONS version 2.1.30 (LANGELLA, 1999). A significância da melhor topologia foi estimada com 1000 permutações.

3.3. Estrutura de populações

O programa STRUCTURE version 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000; HUBISZ et al., 2009), implementado com o modelo de agrupamento Bayesiano, inferiu o número de grupos genéticos de *Anadenanthera* usando Markov chain Monte Carlo (MCMC). Realizamos 20 iterações com um período de burnin de 250.000 passos, seguidos de 750.000 passos. O número de K variou entre 1 a 28 segundo recomendações de EVANNO et al. (2005). O melhor valor de K encontrado, usando o método ΔK de EVANNO et al. (2005) foi identificado a partir do arquivo de saída do STRUCTURE implementado no STRUCTURE HARVEST (EARL e VONHOLDT, 2012).

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) realizada usando o software GENALEX 6 (PEAKALL e SMOUSE, 2006) foi empregada para avaliar a distinção genética dos indivíduos do gênero *Anadenanthera*. As três principais coordenadas foram plotadas em gráfico 3D no programa SigmaPlot v. 12.0.

RESULTADOS

1. Transferabilidade dos locos microssatélites

Transferabilidade integral dos locos de microssatélites obtidos a partir de Feres et al. (2012) e de Barrandeguy et al. (2012) foi observada entre espécies do gênero *Anadenanthera*. Apenas um loco (Acol14) não apresentou amplificação para uma população (FEU) do táxon CCO, entretanto houve sucesso de amplificação para todas as outras 24 populações. Esse elevado número de locos SSR transferíveis foi possível devido à proximidade taxonômica das espécies desse gênero.

Na análise dos 12 locos microssatélites no gênero *Anadenanthera* foram identificados 212 alelos variando de 13 alelos/loco (Acol05 e Acol11) a 25 alelos/loco (Acol16 e Ac162.1), com uma média de 17,66 alelos/loco (Tabela 3). Desses 12 locos testados, nenhum loco exibiu alta frequência de alelo nulo para todas as populações amostradas. Nenhum dos locos diferiu significativamente do equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações de pares entre locos não indicaram desequilíbrio de ligação para comparações múltiplas. Portanto, nenhum loco foi excluído das análises de diversidade e estrutura genética.

2. Análise da diversidade genética

Setenta alelos privados, que correspondem a 33% do número total de alelos, foram encontrados nos quatro táxons: CCE, CCO, PPE e PFA. A maior ocorrência de alelos privados foi no táxon CCE (32) seguida pelos táxons CCO (18), PPE (11) e PFA (nove). Os locos Ac.162.3 e Acol17 apresentaram o maior número de alelos privados (11) e os locos Acol12 e Ac.34.1 apresentaram o menor valor (3) (Tabela 4).

A Tabela 5 mostra as análises de diversidade genética das 25 populações dos quatro táxons estudados. Os táxons CCE, PPE e PFA apresentaram valores médios similares de número de alelos por locos (5,25; 4,83 e 4,54, respectivamente) e heterozigosidade esperada média similar (0,64; 0,62 e 0,66, respectivamente). Entretanto, o táxon CCO apresentou um menor número médio de alelos (2,71) e menor heterozigosidade esperada média (0,40). Além disso, a heterozigosidade observada média foi similar nos táxons CCE ($H_o=0,55$), PPE ($H_o=0,52$) e PFA ($H_o=0,57$), enquanto o táxon CCO exibiu um baixo valor de heterozigosidade observada ($H_o=0,31$). Esta relação entre heterozigosidade observada e esperada resultou em coeficientes de endogamia (f) positivos para todos os quatro táxons, com destaque para o táxon CCO que apresentou populações com maior coeficiente de endogamia médio ($F_{IS}=0,26$), indicando maior ocorrência de homozigotos do que a esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) (Tabela 5).

Tabela 4. Número de alelos privados de marcadores microssatélites nos táxons de *Anadenanthera*: alelo privado encontrado em cada táxon; número de alelo por loco e a frequência do alelo privado comparado com frequência total de alelos.

Loco	Táxon	Alelo privado/ táxon	Alelo/ loco	Frequência de alelo privado	Loco	Táxon	Alelo privado/ táxon	Alelo/ loco	Frequência de alelo privado
Acol1	CCE	1	18	0,22	Acol15	CCE	3	19	0,21
	CCO	1				CCO	0		
	PPE	0				PPE	1		
	PFA	2				PFA	0		
Acol5	CCE	2	13	0,54	Acol16	CCE	0	25	0,24
	CCO	2				CCO	5		
	PPE	3				PPE	1		
	PFA	0				PFA	0		
Acol11	CCE	1	13	0,23	Acol17	CCE	10	15	0,73
	CCO	1				CCO	1		
	PPE	0				PPE	0		
	PFA	1				PFA	0		
Acol12	CCE	1	14	0,21	Acol18	CCE	3	18	0,22
	CCO	1				CCO	0		
	PPE	0				PPE	0		
	PFA	1				PFA	1		
Acol13	CCE	4	21	0,43	Ac34.1	CCE	2	17	0,18
	CCO	1				CCO	0		
	PPE	4				PPE	0		
	PFA	0				PFA	1		
Acol14	CCE	1	14	0,36	Ac162.3	CCE	4	25	0,44
	CCO	0				CCO	6		
	PPE	2				PPE	0		
	PFA	2				PFA	1		

Tabela 5. Características das 25 populações amostradas, para 12 locos polimórficos de microssatélite: tamanho médio da amostra sobre todos os locos (n); número médio de alelos por locos (A/loco); número de alelos privados (A_{PRIV}); heterozigosidade esperada (H_E); heterozigosidade observada (H_O); e coeficiente de endogamia (F_{IS}). Os códigos das populações estão identificados na Tabela 2.

População	n	A/loco	A_{PRIV}	H_E	H_O	F_{IS}
Anadenanthera macrocraipa (CCE)						
BOL	9,92	6,25	1	0,76	0,67	0,13
BFE	12,08	5,33	1	0,62	0,50	0,20
ITA	14,17	6,00	4	0,68	0,55	0,19
AÇU	12,7	4,25	0	0,59	0,44	0,26
SJU	3,33	2,83	0	0,57	0,51	0,14
EVC	14,92	6,50	1	0,66	0,60	0,10
CAS	16,7	5,75	2	0,61	0,57	0,07
PAR	8,00	5,08	2	0,67	0,57	0,15
Média	11,48	5,25	(11)*	0,64	0,55	0,15
Anadenanthera colubrina (CCO)						
FEU	14,8	3,82	4	0,49	0,51	0,00
PSB	14,58	3,83	3	0,41	0,24	0,41
EBC	4,45	2,27	1	0,36	0,25	0,34
CIA	3,33	1,92	0	0,40	0,25	0,53
AMA	3,27	2,00	0	0,40	0,38	0,06
PLA	8,50	2,42	4	0,32	0,23	0,28
Média	8,15	2,71	(12)*	0,40	0,31	0,26
Anadenanthera peregrina (PPE)						
VIC	13,33	5,25	2	0,65	0,48	0,26
MAC	7,42	4,25	2	0,62	0,49	0,23
CDA	9,33	3,92	0	0,62	0,51	0,11
PRD	12,92	5,25	1	0,61	0,61	0,00
EBC2	14,08	5,50	0	0,59	0,49	0,18
Média	11,41	4,83	(5)*	0,62	0,52	0,15
Anadenanthera falcata (PFA)						
CMO	9,08	5,33	1	0,64	0,53	0,18
ITU	18,08	6,75	1	0,68	0,53	0,22
JBB	11,58	5,75	1	0,67	0,63	0,05
PAR2	5,83	5,25	1	0,72	0,63	0,13
CIS	7,58	4,25	1	0,61	0,53	0,15
BRA	6,58	3,83	0	0,62	0,59	0,05
Média	9,79	5,19	(5)*	0,66	0,57	0,13
MÉDIA	10,20	4,50	33	0,58	0,48	0,17

Legenda: (*) Refere-se à soma dos alelos privados para cada táxon

3. Diferenciação dos táxons de *Anadenanthera*

O agrupamento Bayesiano gerado pelo STRUCTURE é mostrado na Figura 3. Os 283 indivíduos foram divididos em quatro grupos genéticos ($K=4$) de acordo com Evanno et al. (2005), nomeados CCE (rosa), CCO (vermelho), PPE (verde) e PFA (azul), correspondendo com as espécies do gênero *Anadenanthera* sensu Brenan (1955). O grupo que apresentou menor nível de mistura genética foi PPE, com 62 indivíduos sendo atribuídos em 96,7% dentro do grupo Bayesiano PPE. Por outro lado, a maior mistura genética dentro de grupo foi observada em PFA, com os 63 indivíduos desse táxon atribuídos em 89% dentro do grupo Bayesiano PFA (Figura 3).

Utilizando a análise Neighbor-joining (NJ), o resultado obtido foi consistente com a análise geral do STRUCTURE, mostrando claramente quatro ramos principais na árvore. A cor de cada ramo está associada a um táxon distinto (CCE-rosa, CCO-vermelho, PPE-verde e PFA-azul). Moderados valores de bootstrap suportam a separação desses quatro táxons, com CCE representando o táxon mais consistente na árvore agrupando suas populações com 80% de bootstrap, entretanto, populações de PPE foram agrupadas com apenas 56% de suporte, o menor observado entre os quatro táxons (Figura 4).

Os quatro grupos formados pela PCoA concordam com o obtido pelas análises de STRUCTURE e NJ, correspondente com os quatro táxons (CCE-rosa, CCO-vermelho, PPE-verde e PFA-azul). As três dimensões plotadas com a PCoA são mostradas na Figura 5 e juntas foram responsáveis por explicar mais de 70% da variação total observada. A primeira coordenada principal explicou 30,98% da variação total e separou os indivíduos que pertencem ao táxon CCE e uma grande maioria dos indivíduos do táxon CCO, segregando de maneira geral as espécies *A. colubrina* e *A. peregrina* sensu Altschul (1964). A segunda coordenada principal, que explicou 27,39% da variação total, separou o táxon CCO dos demais táxons. E a terceira coordenada principal explicou 12,84% da variação total e separou a maioria dos indivíduos do táxon PFA e uma parte dos indivíduos do táxon CCO dos demais.

Os locos mais informativos para a diferenciação dos táxons suportados pelas três análises (STRUCTURE, NJ e PCoA) são mostrados na Tabela 4. A ocorrência de 10 alelos privados para o táxon CCE no loco Acol17 permitiu a seleção desse loco como o mais eficiente para distinguir esse táxon. Igualmente, os locos Ac162.1 e Acol16 com

seis e cinco alelos privados, respectivamente, para o táxon CCO, foram os melhores para a discriminação desse táxon. O loco Acol13 registrou maior quantidade de alelo privado para o táxon PPE com quatro alelos privados. Para o táxon PFA, os melhores locos que o diferenciaram dos demais foram Acol1 e Acol14, com dois alelos privados (Tabela 4).

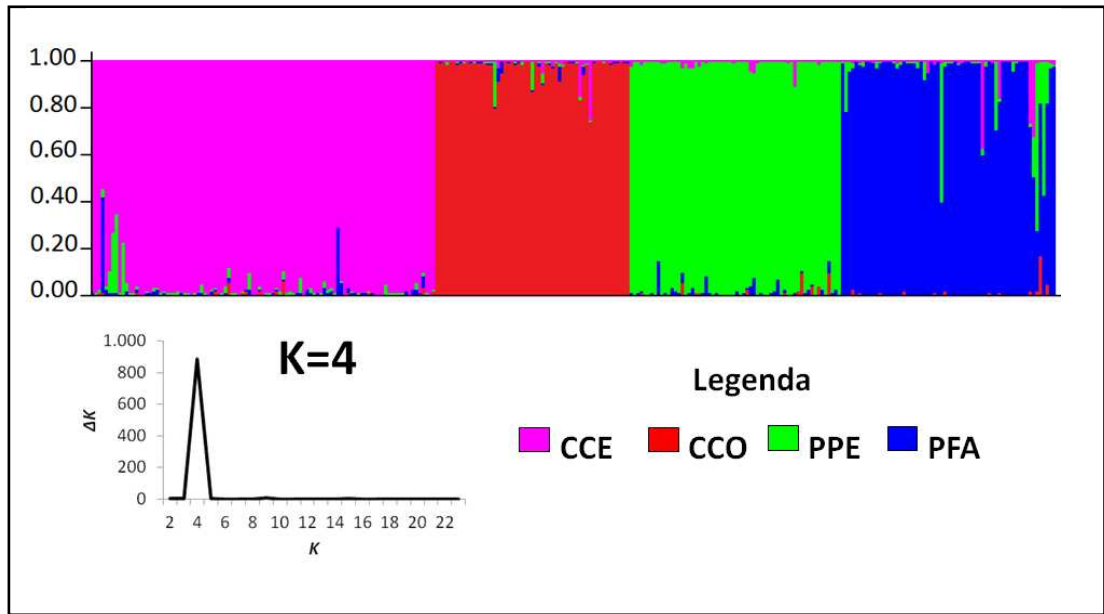


Figura 3. Gráfico obtido pela análise STRUSTRUCTURE e gráfico de ΔK Evanno et al. (2005) indicando o melhor número de grupos ($K=4$). Cada grupo é representado por uma cor e está separado pelos táxons, cada indivíduo é representado por uma barra vertical.

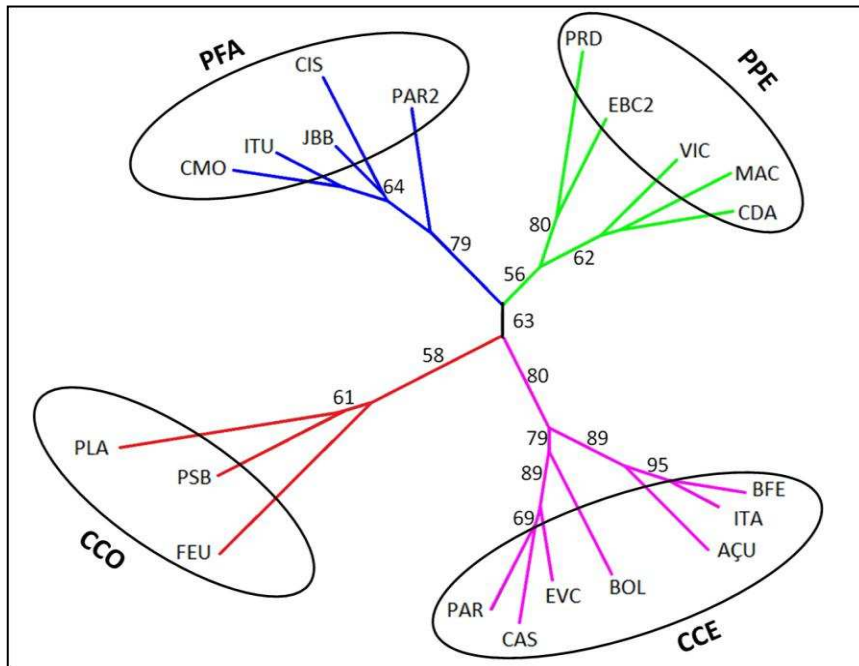


Figura 4. Árvore não enraizada de Neighbor-Joining gerada com base na distância genética D_A (NEI et al., 1983). São mostrados os valores de bootstrap maiores que 50. Populações (SJU, PAR, EBC, CIA, AMA e BRA) foram retiradas devido ao pequeno tamanho amostral. Cada táxon é representado por uma cor. Populações do mesmo táxon apresentam ramos com as mesmas cores.

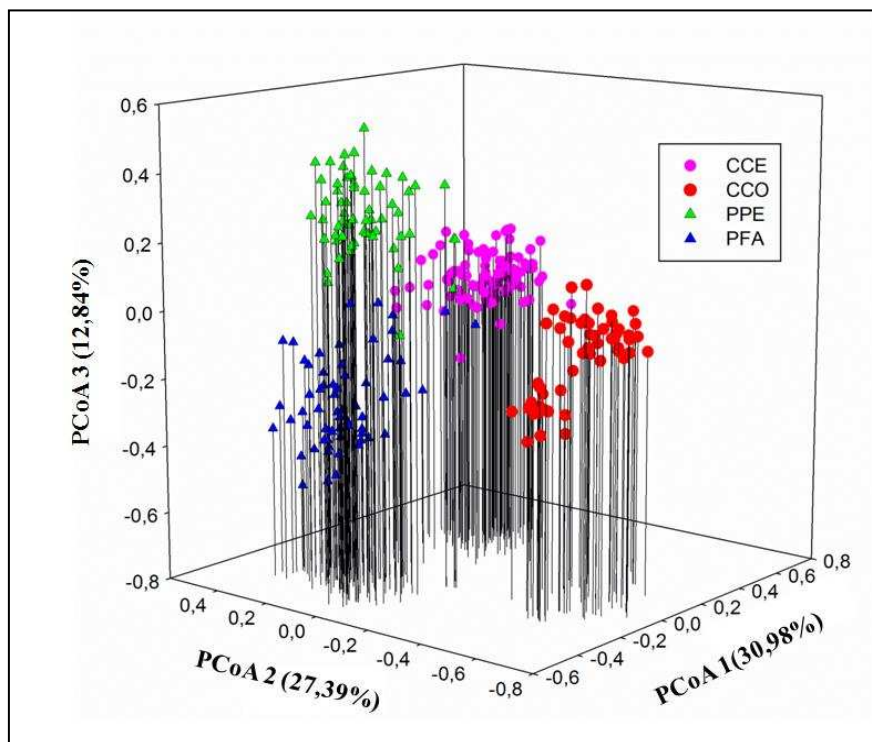


Figura 5. As três dimensões plotadas da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) obtidas a partir da matriz de dados SSR dos indivíduos. Cada táxon é representado por uma cor.

4. Diferenciação populacional das espécies de *Anadenanthera* sensu Altschul (1964)

Valores de pares de F_{ST} (metade inferior) e uma estimativa dos números absolutos de migrantes (metade superior) entre as 14 populações de *A. colubrina* sensu Altschul (1964) e entre as 11 populações de *A. peregrina* sensu Altschul (1964) são mostrados nas Tabelas 6 e 7 respectivamente. Em ambas, o menor número médio de migrantes foi observado entre populações de diferentes variedades (parte superior da Tabela 6 e 7 não hachurada) e os menores pares de F_{ST} entre populações de uma mesma variedade. Esses resultados indicam uma relação de fluxo gênico mais limitado entre populações de diferentes variedades, isso foi observado tanto para *A. colubrina* como em *A. peregrina*.

A Figura 6 mostra a distribuição das populações de *Anadenanthera*. Populações de *A. colubrina* (táxons CCO e CCE) e de *A. peregrina* (táxons PPE e PFA) foram observadas ocorrer simpatricamente como visto pela distribuição das populações CMO-PLA, EBC-EBC2 e PAR-PAR2.

Os três níveis hierárquicos da AMOVA revelou que a variação genética é maior dentro de populações. Isso foi observado no agrupamento de populações das variedades da espécie *A. colubrina* (69,9%; $\Phi_{ST}= 0,300$; $P<0,001$) e também no agrupamento de populações das variedades da espécie *A. peregrina* (82,95%; $\Phi_{ST}=0,170$; $P<0,001$) (Tabela 8).

Tabela 6. Matriz de valores de número absoluto de migrantes (metade superior) e pares de F_{ST} (metade inferior) entre populações de *A. colubrina* sensu (ALTSCHUL, 1964). O primeiro retângulo hachurado corresponde a populações de *A. colubrina*. var. cebil (CCE) e o segundo a populações de *A. colubrina* var. colubrina (CCO). *, significante a $P < 0,005$.

	BOL	BFE	ITA	AÇU	SJU	EVC	CAS	PAR	FEU	PSB	EBC	CIA	AMA	PLA
BOL		3,239*	4,873*	2,575*	2,749*	5,220*	3,306*	4,453*	0,972*	0,984*	1,010*	0,982*	1,288*	0,846*
BFE	0,133*		21,734	3,357*	2,868*	2,143*	1,626*	1,665*	0,761*	0,820*	0,718*	0,763*	0,937*	0,721*
ITA	0,093*	0,022		4,142*	3,607*	2,933*	2,119*	2,320*	0,885*	0,914*	0,864*	0,940*	1,125*	0,818*
AÇU	0,162*	0,129*	0,107*		3,578*	2,271*	1,819*	2,011*	0,756*	0,938*	0,869*	0,979*	1,147*	0,835*
SJU	0,153*	0,148*	0,121*	0,122*		2,881*	1,972*	2,397*	0,640*	0,924*	0,694*	0,787*	1,127*	0,868*
EVC	0,087*	0,189*	0,145*	0,180*	0,147*		7,556*	13,70*	0,838*	1,031*	1,041*	1,034*	1,429*	0,860*
CAS	0,131*	0,235*	0,190*	0,215*	0,202*	0,062*		6,803*	0,790*	0,958*	0,926*	0,914*	1,167*	0,794*
PAR	0,100*	0,230*	0,177*	0,199*	0,172*	0,035*	0,068*		0,720*	0,891*	0,844*	0,937*	1,300*	0,764*
FEU	0,339*	0,396*	0,360*	0,397*	0,438*	0,373*	0,387*	0,409*		1,082*	0,804*	0,949*	0,874*	0,662*
PSB	0,336*	0,378*	0,353*	0,347*	0,350*	0,326*	0,342*	0,359*	0,316*		1,100*	1,586*	1,082*	1,139*
EBC	0,331*	0,410*	0,366*	0,365*	0,418*	0,324*	0,350*	0,371*	0,383*	0,312*		1,761*	1,541*	0,613*
CIA	0,337*	0,395*	0,347*	0,338*	0,388*	0,325*	0,353*	0,347*	0,345*	0,239*	0,221*		2,625*	0,865*
AMA	0,279*	0,347*	0,307*	0,303*	0,307*	0,259*	0,299*	0,277*	0,363*	0,316*	0,244*	0,16		0,904*
PLA	0,371*	0,409*	0,379*	0,374*	0,365*	0,367*	0,386*	0,395*	0,430*	0,304*	0,449*	0,366*	0,355*	

Tabela 7. Matriz de valores de número absoluto de migrantes (metade superior) e pares de F_{ST} (metade inferior) entre populações de *A. peregrina* sensu (ALTSCHUL, 1964). O primeiro retângulo hachurado corresponde a populações de *A. peregrina* var. peregrina (PPE) e o segundo a populações de *A. peregrina* var. falcata (PFA). *, significante a $P < 0,005$.

	VIC	MAC	CDA	PRD	EBC2	CMO	ITU	JBB	PAR2	CIS	BRA
VIC		2,897*	2,531*	2,286*	1,872*	1,691*	2,193*	1,479*	1,891*	1,300*	1,933*
MAC	0,147*		4,079*	1,735*	2,394*	1,395*	1,461*	2,028*	2,472*	1,789*	2,278*
CDA	0,164*	0,109*		1,507*	2,337*	1,117*	1,259*	1,426*	1,791*	1,274*	1,497*
PRD	0,179*	0,223*	0,249*		3,272*	1,479*	1,666*	1,398*	1,627*	1,194*	1,684*
EBC2	0,210*	0,172*	0,176*	0,132*		1,184*	1,433*	1,840*	2,229*	1,556*	1,951*
CMO	0,228*	0,263*	0,309*	0,252*	0,296*		8,911*	3,376*	2,961*	3,699*	2,484*
ITU	0,185*	0,254*	0,284*	0,230*	0,258*	0,053*		3,573*	4,540*	3,370*	2,328*
JBB	0,252*	0,197*	0,259*	0,263*	0,213*	0,128*	0,122*		15,808	7,315*	3,358*
PAR2	0,209*	0,168*	0,218*	0,234*	0,183*	0,144*	0,099*	0,0306		8,496*	3,833*
CIS	0,277*	0,218*	0,281*	0,295*	0,243*	0,119*	0,129*	0,063*	0,055*		2,572*
BRA	0,205*	0,179*	0,250*	0,228*	0,203*	0,167*	0,176*	0,129*	0,115*	0,162*	

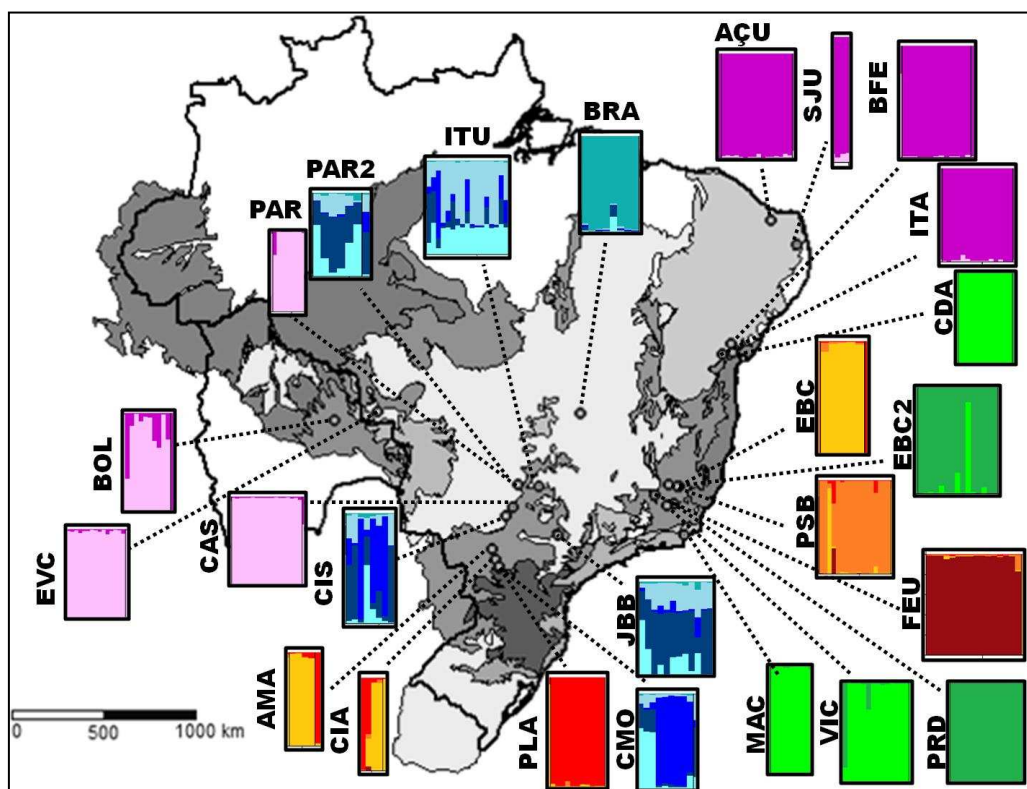


Figura 6. Distribuição das 25 populações com seus respectivos gráficos obtidos pela análise no STRUCTURE para cada táxon avaliado individualmente. Tonalidades próximas representam populações do mesmo táxon. CCE (lilás); CCO (vermelho), PPE (verde) e PFA (azul).

Tabela 8. AMOVA para estrutura genética de populações com três níveis hierárquicos. Análise entre variedades das espécies de *Anadenanthera* sensu ALTSCHUL (1964).

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Componente de variância	Índice de fixação	Porcentagem de variação	Valor-P
Três níveis hierárquicos dentro de <i>A. colubrina</i>						
Entre dois grupos de variedades	1	732495,392	3048,2168 Va	$\Phi_{CT}= 0,0715$	7,15	<0,001
Entre populações dentro de variedades	12	2921337,496	9775,0536 Vb	$\Phi_{SC}= 0,2471$	22,94	<0,001
Dentro de populações	302	8994323,213	29782,5271 Vc	$\Phi_{ST}= 0,3009$	69,9	<0,001
Total	315	12648156,10	42605,7976			
Três níveis hierárquicos dentro de <i>A. peregrina</i>						
Entre dois grupos de variedades	1	200783,919	405,0461 Va	$\Phi_{CT}= 0,0129$	1,3	<0,001
Entre populações dentro de variedades	9	1213554,207	4916,0798 Vb	$\Phi_{SC}= 0,1595$	15,75	<0,001
Dentro de populações	239	6187482,514	25889,0481 Vc	$\Phi_{ST}= 0,1704$	82,95	<0,001
Total	249	7601820,640	31210,17415			

5. Diferenciação populacional dentro dos táxons de *Anadenanthera*

Populações de CCO obtiveram alta diferenciação dentro do táxon ($G_{ST}=0,267$; $F_{ST}=0,338$; $R_{ST}=0,365$), com valores dos pares de F_{ST} entre suas populações variando de 0,221 a 0,449, entre EBC-CIA e EBC-PLA, respectivamente (Tabela 9 e metade inferior da Tabela 6). Das três populações com maiores quantidades de alelos privados (quatro), duas são representantes do táxon CCO (FEU e PLA). A maior média de alelos privados por população foi registrado nesse táxon ($A_{PRIV}=12$) (Tabela 5). Na segunda análise do STRUCTURE, populações do táxon CCO (vermelho) foram diferenciadas em quatro subgrupos ($K=4$). Três destes subgrupos foram formados cada um por apenas uma população, enquanto que um quarto subgrupo reuniu três populações EBC, CIA e AMA (Figura 7b).

As populações do táxon CCE exibiram valores moderados de diferenciação total ($G_{ST}=0,130$; $F_{ST}=0,141$; $R_{ST}=0,1915$) (Tabela 9). Os pares de F_{ST} revelaram a menor distância genética entre as populações EVC – PAR ($F_{ST}= 0,035$) e a maior distância genética entre as populações BFE – CAS ($F_{ST}= 0,235$) (metade inferior da Tabela 6). A média de alelos privados por população no táxon CCE foi ($A_{PRIV}=11$) (Tabela 5). Na análise do STRUCTURE para o táxon CCE (rosa), as oito populações foram arranjadas em dois subgrupos ($K=2$), com as populações do nordeste do Brasil (BFE, ITA, AÇU e SJU) diferenciadas das demais populações (BOL, EVC, CAS e PAR) (Figura 7a).

Dentro do táxon PPE a diferenciação foi moderada ($G_{ST}=0,150$, $F_{ST}=0,186$ e $R_{ST}=0,2312$) e superior à diferenciação observada dentro dos táxons CCE e PFA (Tabela 6). O menor par de F_{ST} entre populações de PPE foi encontrado para as populações MAC e CDA ($F_{ST}=0,109$) e o maior par entre as populações CDA e PRD ($F_{ST}=0,249$) (metade inferior da Tabela 7). A média de alelos privados por população nesse táxon foi ($A_{PRIV}=5$) (Tabela 5). O táxon, PPE (verde) apresentou o menor número de populações e ficou arranjado em dois subgrupos ($K=2$) de acordo com a segunda análise do STRUCTURE. As populações VIC, CDA e MAC foram diferenciadas das populações PRD e EBC2 (Figura 7c).

As análises indicaram uma menor diferenciação dentro do táxon PFA ($G_{ST}=0,106$; $F_{ST}=0,120$; $R_{ST}=0,166$), com baixos valores de pares de F_{ST} entre suas populações, variando de 0,053 (CMO-ITU) a 0,176 (ITU-BRA) (Tabela 9 e metade inferior da Tabela 7). As análises de diversidade genética das populações desse táxon mostraram populações bastante homogêneas entre si. A média de alelos privados por

população no táxon PFA foi ($A_{PRIV}=5$) (Tabela 5). O maior número de subgrupos dentro de táxons, ($K=5$), foi observado em PFA (azul). Com exceção da população BRA, nenhuma estruturação foi detectada nesse grupo, ao contrário, todas as populações apresentaram uma mistura genética de subgrupos (Figura 7d).

Em todos os táxons, populações que apresentaram os maiores pares de F_{ST} apresentaram também os menores números de migrantes, pois quanto maior a distância genética entre populações, menor será o fluxo gênico. Por outro lado, menores valores de pares de F_{ST} entre populações geograficamente distantes foram observados dentro da maioria dos táxons como em CCE (EVC-PAR, $F_{ST}=0,035$), PFA (CMO-ITU, $F_{ST}=0,053$) e PPE (MAC-CDA, $F_{ST}=0,109$) (metade inferior da Tabela 5), indicando a possível ausência de correlação entre distância genética e geográfica dentro de táxons.

Tabela 9. Índices de diversidade genética G_{ST} (NEI, 1973); F_{IT} , F_{ST} e F_{IS} (WEIR e COCKERHAM, 1984) e R_{ST} (SLATKIN, 1995) obtidos no F_{STAT} para diferentes grupos de dados.

Grupo (tamanho)	G_{ST}	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	R_{ST}
A. colubrina ¹ (14)	0,294	0,418**	0,301**	0,169**	0,5453
A. macrocarpa ² (8)	0,130	0,269**	0,141**	0,149**	0,1915
A. colubrina ² (6)	0,267	0,492**	0,338**	0,233*	0,3651
A. peregrina ¹ (11)	0,197	0,333**	0,216**	0,149**	0,2618
A. peregrina ² (5)	0,150	0,310**	0,186**	0,152**	0,2312
A. falcata ² (6)	0,106	0,249**	0,120**	0,146**	0,1667

Legenda: Estatisticamente significativo (*) $P<0,05$; (**) $P<0,01$. ⁽¹⁾Espécies de *Anadenanthera sensu Altschul* (1964) ⁽²⁾Espécies de *Anadenanthera sensu Brenan* (1955).

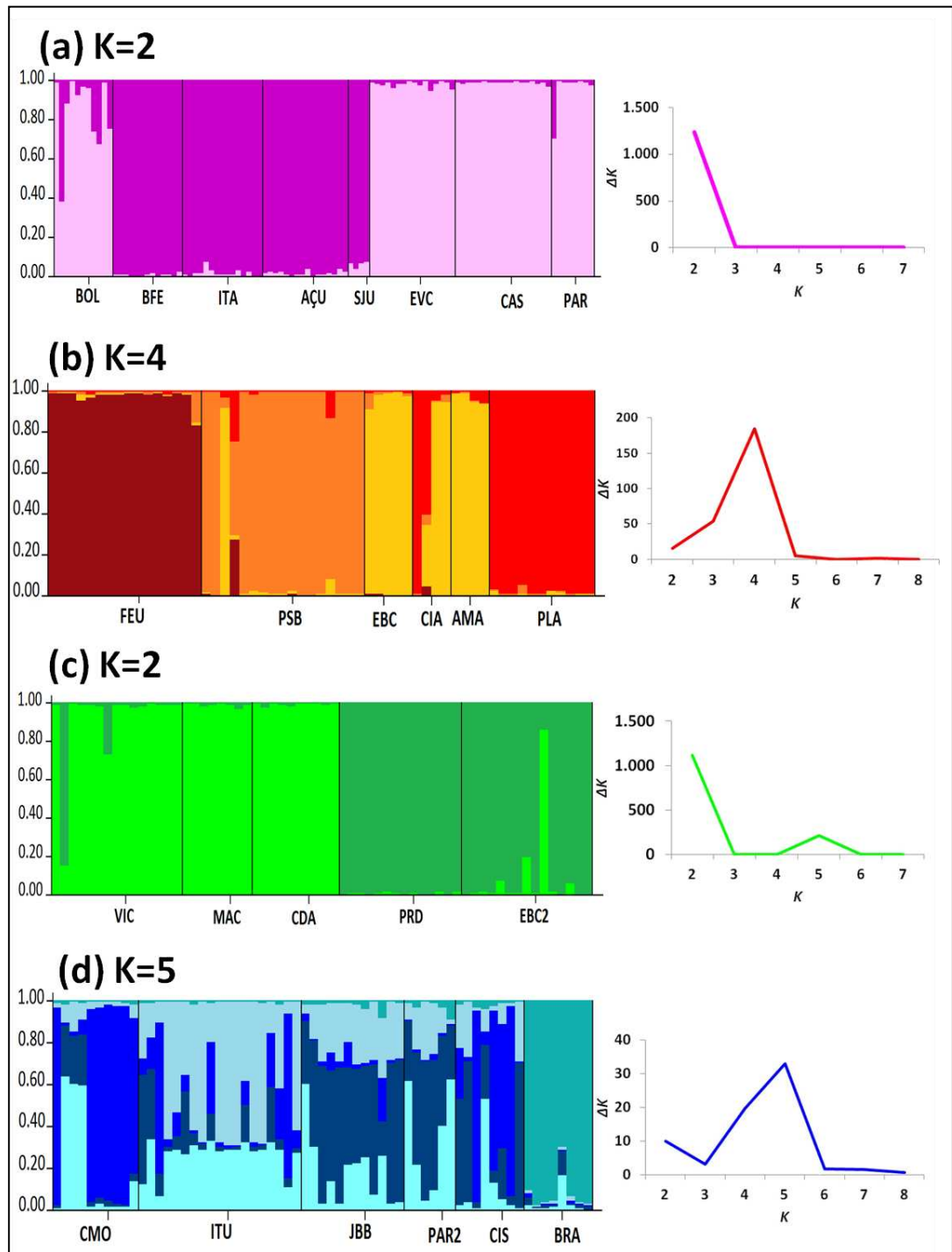


Figura 7. Gráficos obtidos pela análise STRUCTURE para cada táxon avaliado individualmente, seguidos do gráfico de ΔK Evanno et al. (2005) indicando o melhor número de subgrupos. Cada grupo é representado por uma cor e cada indivíduo é representado por uma barra vertical. (a) táxon CCE com 2 subgrupos; (b) táxon CCO com 4 subgrupos; (c) táxon PPE com 2 subgrupos; e (d) táxon PFA com 5 subgrupos.

DISCUSSÃO

1. **Microsatélites apoiam a divisão sensu Brenan (1955) do gênero *Anadenanthera***

O histórico do gênero *Anadenanthera* mostra que este foi criado por Spegazzi (1923) com a finalidade de acomodar as espécies *Piptadenia peregrina* (L.) Bentham e *P. falcata*, ambas caracterizadas pela ausência de glândula no ápice da antera. Brenan (1955) ao propor uma revisão do gênero *Piptadenia* Benth. com o intuito de estabelecer limites para o mesmo, resgata o nome *Anadenanthera* como um dos gêneros do “complexo *Piptadenia*” e acrescenta outras duas espécies que possuem glândula no ápice da antera a esse gênero, circunscrevendo *Anadenanthera* com quatro espécies distintas: *A. colubrina* (Vell.) Brenan, *A. macrocarpa* (Benth.) Brenan, *A. peregrina* (L.) Speg. e *A. falcata* (Benth.) Speg.

Altschul (1964) em um estudo taxonômico do gênero *Anadenanthera* considera apenas duas espécies para o gênero: *A. peregrina* e *A. colubrina*, cada uma com duas variedades, *A. colubrina* (Vell.) Brenan var. *colubrina*, *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul, *A. peregrina* (L.) Speg var. *peregrina* e *A. peregrina* var. *falcata* (Bentham) Altschul. No entanto, Tamashiro (1989) considera *Anadenanthera* composto por quatro espécies como proposto antes por Brenan (1955).

Entre as duas espécies de *Anadenanthera* sensu Altschul (1964) *A. colubrina*, apresenta frutos brilhantes, lisos a reticulados, anteras com glândula apical e invólucro logo abaixo do receptáculo. Já *A. peregrina* apresenta frutos opacos, com superfície verrucosa, anteras eglandulares e invólucro localizado no terço superior do pedúnculo. Com relação às variedades das duas espécies, *A. colubrina* var. *colubrina* (CCO) se diferencia de *A. colubrina* var. *cebil* (CCE) por apresentar frutos mais escuros, estreitos e com margens regularmente contraídas que a variedade *cebil*. *A. peregrina* var. *peregrina* (PPE) apresenta frutos mais longos e largos e geralmente retos, comparados com *A. peregrina* var. *falcata* (PFA) que possui frutos menores e comumente falciformes (ALTSCHUL, 1964).

Altschul (1964) circunscreveu o gênero com base em poucos caracteres morfológicos consistentes Torres e Repke (2006), e cita o Brasil como provável centro

de origem de *Anadenanthera*. Entretanto, não examinou espécimes depositados em herbários brasileiros, onde as mesmas são bem representadas (TAMASHIRO, 1989).

Segundo Altschul (1964) as duas espécies de *Anadenanthera* apresentam ocorrência simpátrica com períodos de floração que se coincidem, entretanto parece não hibridizar naturalmente. Esse padrão foi reafirmado geneticamente pelo presente estudo, uma vez que populações de táxons que representam diferentes espécies, apesar de coletadas no mesmo local geográfico, não apresentaram mistura genética expressiva pela análise do STRUCTURE.

Os parâmetros genéticos estimados nesse estudo ainda suportam um fluxo gênico bastante limitado entre as populações de *A. colubrina* var. *cebil* (CCE) e *A. colubrina* var. *colubrina* (CCO), um achado pouco provável, já que variedades apresentam a característica de se reproduzir livremente com todos os outros membros da espécie (DARWIN, 1859). Da mesma forma, embora menos pronunciado essa limitação de fluxo gênico entre populações de diferentes variedades de *A. peregrina* foi observado. Infelizmente, não obtivemos populações simpátricas das duas variedades de *A. colubrina*, ou das duas variedades de *A. peregrina*, o que daria um suporte ainda maior na separação dessas variedades como espécies distintas.

Diferentes análises como STRUCTURE (Figura 3), NJ (Figura 4) e PCoA (Figura 5) foram altamente concordantes, e separaram os espécimes do gênero *Anadenanthera* em quatro grupos distintos. Esses resultados apoiam o proposto por Brenan (1955) e reafirmado por Tamashiro (1989), da composição do gênero *Anadenanthera* por quatro espécies distintas, que ao longo desse estudo foram denominadas como táxons CCE (*A. macrocarpa*), CCO (*A. colubrina*), PPE (*A. peregrina*) e PFA (*A. falcata*).

2. Congruência parcial entre dados de SSR e de ITS

O resultado da análise Bayesiana e da árvore de Neighbor-joining a partir de dados de microssatélites foram incongruentes em maior parte com a variação da sequência de ITS apresentada por Silva (2010). Esses resultados mostraram agrupamentos diferentes em comparação com os resultados obtidos a partir do ITS, que retrataram apenas a monofilia de *A. colubrina* var. *colubrina*. Em contraste, nossos dados de microssatélites separaram os espécimes do gênero *Anadenanthera* em quatro grupos distintos de acordo

com o número de espécies sensu Brenan (1955). Essa separação sugere a existência de uma origem distinta no passado que permitiu a diferenciação dessas espécies.

A incongruência entre esses marcadores nucleares, contudo, não é total, uma vez que a diferenciação e isolamento de *A. colubrina* são concordantes nos resultados de ambos marcadores. Com ITS, os indivíduos de *A. colubrina* sensu Brenan (1955) formaram um clado distinto e mais basal e a partir de SSR formaram também um grupo genético distinto com as várias análises apresentadas aqui, sustentando essa diferenciação (diversidade genética, pares de F_{ST} , valores de F_{ST} ; número de absoluto de migrantes e AMOVA).

O número de alelos privados por população em *A. colubrina*, sua diferenciação em quatro subgrupos e o baixo nível de mistura genética entre estes, sugerem que essa espécie se diversificou em um período anterior ou mais antigo que as demais espécies analisadas, assim como observado a partir de ITS.

Altschul (1964) argumenta com suporte anatômico que a espécie *A. colubrina* var. *colubrina* evoluiu da variedade *cebil*, estando distribuída em áreas mais úmidas que a sua parental *cebil*. A relação de *A. colubrina* var. *colubrina* com regiões mais úmidas é confirmado pelos registros de locais de coletas onde suas espécimes foram localizadas, sempre a margem de rios ou em locais bastante úmidos. Entretanto, dados baseado em DNA, como obtidos por ITS Silva (2010) e o relatado aqui com microssatélites não apoiam esse argumento, uma vez que o contrário parece ser mais provável.

3. Comparação da diversidade genética em espécies de *Anadenanthera*

A diversidade genética representa o efeito da evolução em longo prazo evidenciando assim o potencial evolutivo da espécie (LI et al., 1999). Dessa forma, conhecer a variabilidade genética e sua distribuição no táxon em estudo, é importante do ponto de vista taxonômico, ecológico e conservacionista (POMETTI et al., 2010). Esse é o primeiro estudo que avalia a diversidade genética com microssatélites na espécie *A. peregrina* sensu Altschul (1964) e em uma amostragem grande, que representa todo o gênero *Anadenanthera*.

A média de diversidade genética alta, em termos de riqueza alélica e heterozigosidade, encontrada para os táxons CCE, PPE e PFA e a substancial redução da diversidade para o táxon CCO pode está relacionado com alguns fatores. Um

primeiro fator está associado com a área de distribuição de CCO, que é mais restrita quando comparada com a área dos demais táxons (ALTSCHUL, 1964). Estudos relatam que a diversidade genética em plantas é afetada pela amplitude de distribuição, mantendo uma diversidade maior em táxons amplamente distribuídos (WANG et al., 2012; ZHAO et al., 2012). Outro fator corresponde aos valores de pares de F_{ST} elevados. Nossos resultados mostraram maiores valores de F_{ST} entre comparações de populações do táxon CCO. Ortego et al. (2012) afirmaram que níveis de diversidade genética e fluxo gênico, são mais baixos em populações isoladas, com valores de pares de F_{ST} elevados avaliados entre quaisquer outras populações. Uma terceira explicação seria o coeficiente de endogamia (F_{IS}) elevado. A maioria das populações de CCO experimentaram altos níveis de endogamia. Baixa diversidade genética é esperada em populações endogâmicas (CHARLESWORTH, 2003).

Trabalhos com outras espécies arbóreas da família Leguminosae também usando marcadores moleculares microssatélites, encontrou valores de H_E média e número médio de alelos por loco menores do que a média registrada aqui ($H_E = 0,58$ e $A/\text{loco} = 5,6$) para as 25 populações de *Anadenanthera*, como observado em *Pericopsis elata* ($H_E = 0,363$ e $A/\text{loco} = 3,25$) (MICHENEAU et al., 2011), em *Dipteryx alata* ($H_E = 0,386$ e $A/\text{loco} = 3,1$) (TARAZI et al., 2010) e em *Parapiptadenia rígida* ($H_E = 0,441$ e $A/\text{loco} = 3,1$) (COSTA et al., 2012). Por outro lado, maiores valores foram detectados em *Platypodium elegans* ($H_E = 0,808$ e $A/\text{loco} = 13,40$) (HUFFORD e HAMRICK, 2003).

A análise de AMOVA mostrou que a maior parte da variação genética foi devido a diferenças entre indivíduos. Esse resultado está de acordo com o esperado para espécies arbóreas tropicais e alógamas (HAMRICK e LOVELESS, 1989). Altos níveis de variação dentro de populações também foram encontrados em outras mimosoideas a partir de diferentes marcadores moleculares como, *Plathymenia reticulata* (LACERDA et al., 2001), *Acacia senegal* (OMONDI et al., 2010) e *Acacia visco* (POMETTI et al., 2013) e também, em lenhosas com padrão de distribuição parecido com o de *Anadenanthera colubrina* como *Astroniuim urundeuva* (CAETANO et al., 2008) e *Enterolobium cyclocarpum* (GONZALES et al., 2010) também através de outros marcadores moleculares.

As taxas de endogamia observadas nos quatro táxons do gênero *Anadenanthera* (Tabela 4), não condiz com os vários aspectos da biologia reprodutiva das espécies do gênero *Anadenanthera* que favorece a polinização cruzada, como o elevado grau de auto-incompatibilidade genética e a protandria apresentada (COSTA et al., 1992;

COSTA et al., 2003). Entretanto, a fragmentação florestal favorece um gradual aumento de auto-compatibilidade na população como um mecanismo de geração de descendência (COSTA et al., 2003). Espécies do gênero *Anadenanthera* ocorrem predominantemente em florestas estacionais (ALTSCHUL, 1964; QUEIROZ, 2009), que são florestas bastante desmatadas. Na América Latina cerca de 60% dessas florestas se encontram altamente destruídas (MILES et al., 2006).

O número de alelos privados é uma medida altamente afetada e condicionada pelo tamanho da amostra. Assim, se espera encontrar mais alelos em amostras maiores. Por isso, o maior número de alelos privados no táxon CCE ($A_{PRIV}=32$), pode ser justificado pela sua ampla representação amostral (101 indivíduos) (LEBERG, 2002; KALINOWSKI, 2004). Ao contrário, a comparação entre os táxons CCO, PPE e PFA é permitida, uma vez que apresentam número similar de indivíduos, 57, 62 e 63 respectivamente. Entre esses três táxons, o maior número de alelos privados identificado em CCO reflete sua maior diferenciação. Este fato também coincide com sua diferenciação morfológica, uma vez que esse táxon é considerado como o elemento mais facilmente reconhecível no gênero *Anadenanthera* (ALTSCHUL, 1964).

4. Inferências sobre a história evolutiva de *Anadenanthera* e de florestas estacionais

Tem sido sugerido que a distribuição existente das mimosoideaes seja o resultado de uma origem no semi-árido Laurásico, seguido por uma propagação para outros biomas, incluindo florestas tropicais e por isso a dispersão e não a vicariância parece ser mais plausível para explicar a distribuição geográfica atual dessas leguminosas. (SCHRIRE et al., 2009; BOUCHENAK-KHELLADI et al., 2010).

Anadenanthera colubrina var. *cebil* é considerada por Prado e Gibbs (1993) como espécie modelo de Florestas Estacionais devido a sua ocorrência na maioria dos núcleos, que juntos constituem o chamado “Arco Pleistocênico”. Entretanto, a ausência de registros palinológicos de *Anadenanthera* nos sedimentos do Pleistoceno na região do Chiquitano e sua contínua ocorrência em sedimentos do Holoceno, tem sido utilizada como um argumento contra a teoria do Arco Pleistocênico, e por isso uma ocupação mais recente dessas florestas tem sido sugerido (MAYLE, 2004).

Alguns estudos indicam que a flora na região do Chiquitano é essencialmente jovem e que as espécies encontradas nas florestas secas são resultantes de processos migratórios recentes (BURBRIDGE et al., 2004; MAYLE, 2004).

A observação de populações de *A. macrocarpa* do núcleo Misiones e do núcleo do Chiquitano num mesmo subgrupo (Fig.7a), indica a existência de similaridades genéticas entre as populações de *A. macrocarpa*, desses dois blocos de florestas estacionais e sugere que a flora de *A. macrocarpa* encontrada na floresta seca do Chiquitano seja resultado de uma possível migração a partir da floresta estacional do Misiones.

Como consequência da amostragem nos dois extremos de distribuição, a análise Bayesiana para a espécie *A. macrocarpa* identificou dois subgrupos genéticos, que também apresentaram diferenças morfológicas bem pronunciadas, com árvores de *A. macrocarpa* a partir do nordeste do Brasil apresentando um porte menor e frutos mais estreitos e menores quando comparadas com árvores de ocorrência nas demais regiões amostradas.

O baixo nível de mistura genética entre os dois subgrupos de *A. macrocarpa* sugere que a diferenciação entre eles aconteceu num passado mais antigo e que permanece atualmente, já que um corredor seco formado pelo Cerrado atua provavelmente como uma barreira, impedindo a ocorrência de fluxo gênico entre populações de diferentes subgrupos.

A particularidade de populações altamente miscigenadas observada para a espécie *A. falcata* (Fig.7d) parece apoiar um cenário de expansão recente, em que populações antes isoladas, por algum motivo, no passado mais recente começaram a se homogeneizar, permitindo a ocorrência de fluxo gênico entre indivíduos de diferentes populações. Todas as populações com elevado nível de mistura genética foram amostradas em regiões de transição com o domínio fitogeográfico do Cerrado, apenas uma população, BRA, apresentou um nível surpreendentemente menor de mistura genética, sendo a única situada mais internamente ao Cerrado. Nesse sentido, o local de amostragem parece ter uma relação direta com o predomínio de mistura genética, com populações distribuídas numa região mais central tendendo ao isolamento e por consequência baixo nível de mistura e maior diferenciação. Contudo é necessária uma amostragem capaz de abranger um maior número de populações na região central do Cerrado, para que maiores inferências sejam tomadas sobre a história evolutiva de *A. falcata*.

CONCLUSÕES

A diferenciação taxonômica sensu Brenan (1955) de quatro espécies para o gênero *Anadenanthera* foi apoiada por microssatélites.

Ambos marcadores nucleares (ITS e SSR) foram concordantes na diferenciação de *A. colubrina*.

A menor diversidade genética em *A. colubrina* é possivelmente consequência da sua distribuição mais restrita e da ocorrência mais frequente de endogamia nessa espécie.

A distribuição das populações miscigenadas de *A. falcata* reflete um cenário de expansão recente para essa espécie.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. V. R. A taxonomic study of the genus *Anadenanthera*. **Contrib. Gray Herb**, n. 193, p. 3-65, 1964.
- BARRANDEGUY, M. E.; PRINZ, K.; GARCIA, M. V.; FINKELDEY, R. Development of microsatellite markers for *Anadenanthera colubrina* Var. *cebil* (Fabaceae), a native tree from South America. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 9, p. E372-E374, 2012.
- BOUCHENAK-KHELLADI, Y.; MAURIN, O.; HURTER, J.; VAN DER BANK, M. The evolutionary history and biogeography of Mimosoideae (Leguminosae): An emphasis on African acacias. **Mol Phylogenet Evol**, v. 57, n. 2, p. 495-508, 2010.
- BRENAN, J. P. M. Notes on Mimosoideae: I. **Kew Bulletin**, v. 10, n. 2, p. 161-192, 1955.
- BULLOCK, S. H.; MOONEY, H. A.; MEDINA, E. **Seasonally dry tropical forests**. Cambridge University Press, 1995.
- BURBRIDGE, R. E.; MAYLE, F. E.; KILLEEN, T. J. Fifty-thousand-year vegetation and climate history of Noel Kempff Mercado National Park, Bolivian Amazon. **Quaternary Research**, v. 61, n. 2, p. 215-230, 2004.
- CAETANO, S.; PRADO, D.; PENNINGTON, R. T.; BECK, S.; OLIVEIRA-FILHO, A.; SPICHIGER, R.; NACIRI, Y. The history of seasonally dry tropical forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Mol Ecol**, v. 17, n. 13, p. 3147-3159, 2008.
- CHARLESWORTH, D. Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 358, n. 1434, p. 1051-1070, 2003.
- COSTA, B. F.; RODRIGUES, L. A.; RUAS, E. A.; SOUZA, L. B.; RUAS, C. F.; VIEIRA, B. G.; CONSON, A. R. O.; RUAS, P. M. Characterization of nine microsatellite loci for the tree species *Parapiptadenia rigida* (Fabaceae-Mimosoideae)

and their transferability. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 2338-2342, 2012.

COSTA, R. B.; CONTINI, A. Z.; MELO, E. S. P. Sistema reprodutivo de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg e *Vochysia haenkiana* (Spreng.) Mart. em fragmento de cerrado na Chapada dos Guimarães - MT. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 305-310, 2003.

COSTA, R. B.; KAGEYANA, P. Y.; MARIANO, G. Estudo do sistema de cruzamento de *Anadenanthera falcatan* Benth., *Vochysia tucanorum* Mart. e *Xylopia aromatica* Baill., em área de Cerrado. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 14, n. 1, p. 93-96, 1992.

COTA-SÁNCHEZ, J. H.; REMARCHUK, K.; UBAYASENA, K. Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 24, n. 2, p. 161-167, 2006.

DARWIN, C. On the origin of the species by natural selection. 1859.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Mol Ecol**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

FERES, J. M.; MONTEIRO, M.; ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; MESTRINER, M. A.; ALZATE-MARIN, A. L. Development of microsatellite markers for *Anadenanthera colubrina* (Leguminosae), a neotropical tree species. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 4, p. E154-E156, 2012.

FERRAZ, J. S. F.; ALBUQUERQUE, U. P.; MEUNIER, I. M. J. Valor de uso e estrutura da vegetação lenhosa às margens do riacho do Navio, Floresta, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 125-134, 2006.

GARCIA, M. G.; SILVA, R. S.; CARNIELLO, M. A.; VELDMAN, J. W.; ROSSI, A. A. B.; DE OLIVEIRA, L. O. Molecular evidence of cryptic speciation, historical range expansion, and recent intraspecific hybridization in the Neotropical seasonal forest tree *Cedrela fissilis* (Meliaceae). **Mol Phylogenet Evol**, v. 61, n. 3, p. 639-649, 2011.

GENTRY, A. H. Neotropical floristic diversity: phylogeographical connections between Central and South America, Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of the Andean orogeny? **Ann. Mo. Bot. Gard**, v. 69, p. 557-593, 1982.

GONZALES, E.; HAMRICK, J. L.; SMOUSE, P. E.; TRAPNELL, D. W.; PEAKALL, R. The impact of landscape disturbance on spatial genetic structure in the Guanacaste tree, *Enterolobium cyclocarpum* (Fabaceae). **J Hered**, v. 101, n. 2, p. 133-143, 2010.

GOODMAN, S. J. RST Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. **Mol Ecol**, v. 6, n. 9, p. 881-885, 1997.

GOUDET, J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of heredity**, v. 86, n. 6, p. 485-486, 1995.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. **The Evolutionary Ecology of Plants**, p. 129-146, 1989.

HOHENEGGER, J. Species as the basic units in evolution and biodiversity: Recognition of species in the Recent and geological past as exemplified by larger foraminifera. **Gondwana Research**, v. 25, n. 2, p. 707-728, 2014.

HUBISZ, M. J.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Mol Ecol Resour**, v. 9, n. 5, p. 1322-1332, 2009.

- HUFFORD, K. M.; HAMRICK, J. L. Viability selection at three early life stages of the tropical tree, *Platypodium elegans* (Fabaceae, Papilionoideae). **evolution**, v. 57, n. 3, p. 518-526, 2003.
- HUGHES, C. E.; PENNINGTON, R. T.; ANTONELLI, A. Neotropical Plant Evolution: Assembling the Big Picture. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 171, n. 1, p. 1-18, 2013.
- KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2010.
- KALINOWSKI, S. T. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. **Conservation Genetics**, v. 5, p. 539-543, 2004.
- LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, B. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymania reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Mol Ecol**, v. 10, p. 1143-1152, 2001.
- LANGELLA, O. Populations 1.2. 30. **CNRS UPR9034**, 1999.
- LEBERG, P. L. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. **Molecular Ecology Notes**, v. 11, p. 2445-2449, 2002.
- LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew Richmond, UK, 2005.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data**: Version 2001.
- LI, F.; XIONG, Z. T.; LI, F. M.; ZHU, Y. G. Genetic diversity and divergence between populations of *Hemerocallis lilioasphodelus* L. from Henan and hunan province. **Wuhan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban**, v. 45, p. 849-851, 1999.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol. 1. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, p. 368, 2002.

LUCKOW, M.; MILLER, J. T.; MURPHY, D. J.; LIVSHULTZ, T. A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. **Advances in Legume Systematics**, v. 10, p. 197-220, 2003.

MAYDEN, R. L. On biological species, species concepts and individuation in the natural world. **Fish and Fisheries**, v. 3, n. 3, p. 171-196, 2002.

MAYLE, F. E. Assessment of the Neotropical dry forest refugia hypothesis in the light of palaeoecological data and vegetation model simulations. **Journal of Quaternary Science**, v. 19, n. 7, p. 713-720, 2004.

MAYR, E. **Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist**. Harvard University Press, 1942.

MICHENEAU, C.; DAUBY, G.; BOURLAND, N.; DOUCET, J. L.; HARDY, O. J. Development and characterization of microsatellite loci in *Pericopsis Elata* (Fabaceae) using a cost-efficient approach. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 10, p. E268-E270, 2011.

MILES, L.; NEWTON, A. C.; DEFRIES, R. S.; RAVILIOUS, C.; MAY, I.; BLYTH, S.; KAPOV, V.; GORDON, J. E. A global overview of the conservation status of tropical dry forests. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 3, p. 491-505, 2006.

MORIM, M. P. **Anadenanthera - Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro, Acesso em: 02 Fev. 2014.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. **Journal of Molecular Evolution**, v. 19, n. 2, p. 153-170, 1983.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; JARENKOW, L. A.; RODAL, M. J. N. Floristic relationships of seasonally dry forests of Eastern South America based on tree species distribution patterns. **Neotropical Savannas and Seasonally Dry Forests: Plant Diversity, Biogeography, and Conservation**, n. 69, p. 159-192, 2006.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 793-810, 2000.

OLSON, D. M.; DINERSTEIN, E.; WIKRAMANAYAKE, E. D.; BURGESS, N. D.; POWELL, G. V. N.; UNDERWOOD, E. C.; D'AMICO, J. A.; ITOUA, I.; STRAND, H. E.; MORRISON, J. C.; LOUCKS, C. J.; ALLNUTT, T. F.; RICKETTS, T. H.; KURA, Y.; LAMOREUX, J. F.; WETTENGEL, W. W.; HEDAO, P.; KASSEM, K. R. Terrestrial ecoregions of the worlds: A new map of life on Earth. **Bioscience**, v. 51, n. 11, p. 933-938, 2001.

OMONDI, S. F.; KIREGER, E.; DANGASUK, O. G.; CHIKAMAI, B.; ODEE, D. W.; CAVERS, S.; KHASA, D. P. Genetic diversity and population structure of *Acacia senegal* (L) Willd. in Kenya. **Tropical Plant Biology**, v. 3, n. 1, p. 59-70, 2010.

OOSTERHOUT, C. V.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004.

ORTEGO, J.; AGUIRRE, M. P.; CORDERO, P. J. Landscape genetics of a specialized grasshopper inhabiting highly fragmented habitats: a role for spatial scale. **Diversity and Distributions**, v. 18, n. 5, p. 481-492, 2012.

PAES, J. B.; DINIZ, C. E. F.; MARINHO, I. V.; LIMA, C. R. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no Semi-Árido Brasileiro. **Cerne, Lavras**, v. 12, n. 3, p. 232-238, 2006.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.

PENNINGTON, R. T.; LAVIN, M.; OLIVEIRA-FILHO, A. Woody Plant Diversity, Evolution, and Ecology in the Tropics: Perspectives from Seasonally Dry Tropical Forests. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40, n. 1, p. 437-457, 2009.

- PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G. P.; RATTER, J. A. An overview of the plant diversity, biogeography and conservation of neotropical savannas and seasonally dry forests. **Neotropical Savannas and Seasonally Dry Forests: Plant Diversity, Biogeography, and Conservation**, n. 69, p. 1-29, 2006.
- PENNINGTON, R. T.; PRADO, D. E.; PENDRY, C. A. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. **Journal of Biogeography**, v. 27, n. 2, p. 261-273, 2000.
- POMETTI, C. L.; BESSEGA, C. F.; VILARDI, J. C.; SAIDMAN, B. O. Comparison of mating system parameters and genetic structure in three natural scenarios of *Acacia visco* (Leguminosae, Mimosoideae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, n. 4, p. 761-771, 2013.
- POMETTI, C. L.; VILARDI, J. C.; CIALDELLA, A. M.; SAIDMAN, B. O. Genetic diversity among the six varieties of *Acacia caven* (Leguminosae, Mimosoideae) evaluated at the molecular and phenotypic levels. **Plant Systematics and Evolution**, v. 284, n. 3-4, p. 187-199, 2010.
- PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. Patterns of Species Distributions in the Dry Seasonal Forests of South-America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 80, n. 4, p. 902-927, 1993.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.
- QUEIROZ, L. P. **Legumes of the Caatinga**. Royal Botanic Garden Edinburgh, 2009.
- RIAHI, M.; ZARRE, S.; MAASSOUMI, A. A.; ATTAR, F.; KAZEMPOUR OSALOO, S. An inexpensive and rapid method for extracting papilionoid genomic DNA from herbarium specimens. **Genet Mol Res**, v. 9, n. 3, p. 1334-1342, 2010.
- SANTOS, R. M.; OLIVEIRA, A. T.; EISENLOHR, P. V.; QUEIROZ, L. P.; CARDOSO, D. B. O. S.; RODAL, M. J. N. Identity and relationships of the Arboreal Caatinga among other floristic units of seasonally dry tropical forests (SDTFs) of north-eastern and Central Brazil. **Ecol Evol**, v. 2, n. 2, p. 409-428, 2012.

SCHRIRE, B. D.; LAVIN, M.; BARKER, N. P.; FOREST, F. Phylogeny of the Tribe Indigofereae (Leguminosae-Papilionoideae): Geographically Structured More in Succulent-Rich and Temperate Settings Than in Grass-Rich Environments. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 4, p. 816-+, 2009.

SILVA, R. S. **Filogenia e filogeografia molecular de Anadenanthera Speg. Leguminosae (Mimosoideae)**. 2010.f.Doctor Scientiae) - Universidade Federal de Viçosa2010.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, n. 1, p. 457-462, 1995.

TAMASHIRO, J. Y. **Estudos taxonômicos e morfológicos do gênero Piptadenia sensu Dentham no sudoeste do Brasil: avaliação das modificações taxonomicas recentemente propostas**. 1989.f.1989.

TARAZI, R.; MORENO, M. A.; GANDARA, F. B.; FERRAZ, E. M.; MORAES, M. L. T.; VINSON, C. C.; CIAMPI, A. Y.; VENCOVSKY, R.; KAGEYAMA, P. Y. High levels of genetic differentiation and selfing in the Brazilian cerrado fruit tree *Dipteryx alata* Vog. (Fabaceae). **Genet Mol Biol**, v. 33, n. 1, p. 78-85, 2010.

TORRES, C. M.; REPKE, D. B. **Anadenanthera: visionary plant of ancient South America**. Psychology Press, 2006.

VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Ministério da Economia, Fazenda e Planejamento, Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Diretoria de Geociências, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1991.

WANG, X. M.; HOU, X. Q.; ZHANG, Y. Q.; YANG, R.; FENG, S. F.; LI, Y.; REN, Y. Genetic diversity of the endemic and medicinally important plant *Rheum officinale* as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 3, p. 3900-3915, 2012.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **evolution**, p. 1358-1370, 1984.

WEIR, B. S.; HILL, W. G. Estimating F-statistics. **Annual Review of Genetics**, v. 36, n. 1, p. 721-750, 2002.

ZHAO, X.; MA, Y.; SUN, W.; WEN, X.; MILNE, R. High genetic diversity and low differentiation of *Michelia coriacea* (Magnoliaceae), a critically endangered endemic in southeast Yunnan, China. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 4, p. 4396-4411, 2012.