

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

NICOLLE DA CUNHA CARVALHO

Filogeografia do Palmitreiro (*Euterpe edulis*) na Mata Atlântica
Brasileira

Porto Alegre

Julho, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

NICOLLE DA CUNHA CARVALHO

00185202

Filogeografia do Palmitreiro (*Euterpe edulis*) na Mata Atlântica
Brasileira

Trabalho apresentado como requisito para
obtenção do grau de Bacharel no curso de
Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul.

Orientador: Nelson Jurandi Rosa Fagundes

Porto Alegre

Julho, 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador o Professor Doutor Nelson Jurandi Rosa Fagundes, pois sem sua vontade de tornar este projeto realidade, não estaríamos aqui. Agradeço sua orientação, paciência e dedicação em me ajudar no que precisei, além de todas as dicas e explicações que certamente me acrescentou muito conhecimento ao longo desta caminhada.

Gostaria de agradecer à minha família que não tiveram nada a ver com a realização deste projeto, mas entenderam o quanto era importante e me apoiaram emocionalmente na realização deste TCC: À minha mãe Raquel, meus irmãos Michelle e Lauro, meu amado sobrinho Gabriel e a meu pai Lauro.

À minha família do coração, meu namorado Gustavo e nossos cinco gatos Lancer, Sky, Zed, Capes e Fay. Aos amigos que apoiaram de alguma forma minha escolha de curso e mandaram mensagem positivas ao longo do projeto em especial Caroline, Tatiana e Natália.

Muito obrigado a todos.

RESUMO

A Mata Atlântica brasileira (MAB) é um dos biomas mais ricos em termos de biodiversidade, e constitui um mosaico de diversos tipos de vegetação e ecossistemas ao longo da costa litorânea. A palmeira *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae) é endêmica deste bioma ocorrendo desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul. A espécie é comum, conhecida popularmente como palmito-juçara, e se encontra ameaçada pelo extrativismo ilegal, além da fragmentação de seu habitat. Estudos recentes sobre a origem e evolução desse bioma sugerem a hipótese de que algumas áreas da MAB podem ter servido como refúgios durante os períodos glaciais do Pleistoceno. O presente estudo investigou a filogeografia de *E. edulis* baseando-se no polimorfismo de regiões do DNA plastidial e nuclear para avaliar o grau de estrutura genética ao longo da MAB e sua relação com a hipótese de refúgios glaciais para a Mata Atlântica. Com este propósito foram analisadas dezesseis populações dispersas ao longo da distribuição da espécie. As amostras tiveram seu DNA extraído, e três espaçadores plastidiais e um gene nuclear foram amplificados pela técnica de PCR. Após a análise de qualidade das sequências, foram identificados dez polimorfismos para o cpDNA, definindo dez haplótipos, e dez polimorfismos para gene nuclear, definindo quinze haplótipos. Uma análise Bayesiana populacional das 16 populações com os dados combinados identificou quatro grupos filogeográficos distintos: “Bahia” (BA), “Espírito Santo” (ES), “Rio de Janeiro” (RJ) e “Sul” (Sul). Os haplótipos de cpDNA mostraram maior estruturação populacional em relação aos haplótipos do gene nuclear, que apresentou, inclusive, haplótipos compartilhados entre os grupos. Em termos quantitativos, o F_{ST} entre grupos para o cpDNA foi de 0,79, e apenas 0,21 para o gene nuclear. De maneira geral, diferentes testes de neutralidade não demonstraram evidências de expansão populacional de maneira consistente. Considerando os quatro grupos filogeográficos, a árvore filogenética mais suportada pelos dados separa um clado ao norte com os grupos BA e ES, e um clado ao sul com os grupos RJ e Sul, e sugere uma divergência recente entre as populações, sendo a raiz estimada em ~14 mil anos atrás (entre ~6,5 e 25 mil anos atrás) datando do Pleistoceno. Esses resultados são compatíveis com a interpretação de quatro regiões de estabilidade (refúgios) para essa espécie ao longo de sua distribuição, e apoiam a interpretação de que o último máximo glacial pode ter tido um papel na fragmentação de populações florestais ao longo da MAB.

Palavras-chave: filogeografia, *Euterpe edulis*, refúgios glaciais, Mata Atlântica brasileira.

ABSTRACT

The Brazilian Atlantic Forest (BAF) is one of the richest biomes in terms of biodiversity, and constitutes a mosaic of diverse vegetation types and ecosystems along the coast. The palm *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae) is endemic to this biome occurring from the state of Bahia to Rio Grande do Sul. The species is common, popularly known as palmito-juçara, and is currently threatened by illegal extractivism, as well as habitat fragmentation. Recent studies on the origin and evolution of the biome suggest the hypothesis that some BAF areas may have served as refuges during the Pleistocene glacial periods. The present study investigated the phylogeography of *E. edulis* based on the DNA polymorphism in plastid and nuclear regions to evaluate the degree of genetic structure along the BAF and its relationship with the hypothesis of glacial refuges in the BAF. With this purpose, we analyzed sixteen populations dispersed along the distribution of the species. Samples had their DNA extracted, and three plastid spacers and one nuclear gene were amplified by the PCR technique. Following the quality control of the sequences, we identified ten polymorphisms for cpDNA that defined ten haplotypes, and ten polymorphisms for the nuclear gene that defined fifteen haplotypes. A Bayesian population analysis for the 16 populations with the combined data identified four distinct phylogeographic groups: "Bahia" (BA), "Espírito Santo" (ES), "Rio de Janeiro" (RJ) and "South" (Sul). CpDNA haplotypes showed greater population structure when compared to the haplotypes of the nuclear gene, which, in addition, showed shared haplotypes among the groups. In quantitative terms, the F_{ST} among groups for the cpDNA was 0.79, and only 0.21 for the nuclear gene. Overall, different neutrality tests did not showed consistent evidence of population expansions. Regarding the four phylogeographic groups, the most supported phylogenetic tree separates a northern clade, with groups BA and ES, and a southern clade with groups RJ and Sul, suggesting a recent divergence among populations, with the root estimated at ~14 thousand years ago (between ~ 6.5 and 25 thousand years ago), in the Pleistocene. These results are compatible with the interpretation of four stability regions (refuges) for this species throughout its distribution, and support the interpretation that the last glacial maximum may have played a role in the fragmentation of forest populations throughout the BAF.

Key words: phylogeography, *Euterpe edulis*, glacial refuges, Brazilian Atlantic Forest.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	7
2. Objetivos	10
3. Material e Métodos.....	10
4. Resultados	14
5. Discussão	18
6. Conclusão	20
7. Referências.....	21

1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica brasileira (MAB) é considerada um dos maiores *hotspots* de biodiversidade do mundo graças à sua ampla distribuição e heterogeneidade em termos de clima e vegetação, contendo milhares de espécies de plantas e animais, muitos dos quais são endêmicos da região (Myers *et al.*, 2000; Mittermeier *et al.*, 2005). Dessa forma, a MAB consiste em um mosaico de formações vegetais que abrigam ecossistemas ricos em biodiversidade. O agrupamento destes diferentes ecossistemas não tem valor científico, mas de certo modo é benéfico sob o ponto de vista conservacionista, já que todo o conjunto de formações legalmente consideradas no Domínio Atlântico tem proteção assegurada pela legislação (Tonhasca, 2005).

Atualmente, remanescentes da MAB representam menos de 11,5% de sua extensão original, sendo representada por fragmentos de matas dispersos ao longo da costa litorânea brasileira (desde o Rio Grande do Sul até o Rio Grande do Norte) alcançando ainda a Argentina e o Paraguai (Pinto & Brito, 2005; Galindo-Leal & Câmara, 2005). É um dos biomas mais devastados e mais seriamente ameaçados do planeta, pois sofre interferência de sucessivos processos de exploração econômica desde a época da colonização européia até, mais recentemente, as expansões das áreas urbanas e industriais. Cerca de 1,5 bilhões de pessoas vivem em suas áreas urbanas e rurais, e cerca de um quarto delas vive em extrema pobreza (Galindo-Leal & Câmara, 2005; Liebsch *et al.*, 2008).

A contínua perda de biodiversidade na MAB causada pelo constante processo de degradação de seus habitats pode trazer consequências terríveis, como a perda de ecossistemas, populações, e espécies únicas, bem como a própria variabilidade genética que abrigam (Galindo-Leal & Câmara, 2005). A variabilidade genética é reconhecida como um componente fundamental da biodiversidade (Moritz & Faith, 1998), e todo estudo que possa fornecer informações a respeito de populações fragmentadas ou isoladas, é uma importante ferramenta para estratégias de conservação (Haig, 1998; Ávila-Diaz & Oyama, 2007).

Pouco se conhece dos processos que originaram essa diversidade e os padrões de endemismo do bioma. A hipótese mais antiga sobre a origem dessa diversidade está baseada no modelo clássico de refúgios florestais no Pleistoceno (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1981) que supõe que as mudanças climáticas causadas pelos ciclos glaciais teriam promovido separação das populações como consequência da regressão, fragmentação e expansão da floresta (Hewitt, 2000; Câmara, 2005; Silva & Casteletti, 2005). Mais recentemente, estudos

utilizando modelagem de nicho ecológico nas condições climáticas estimadas para o último máximo glacial, sugeriram que algumas áreas da MAB podem ter servido como “refúgios” durante os ciclos glaciais (Carnaval & Moritz, 2008). Esses refúgios propostos parecem estar relacionados com as zonas de maior biodiversidade e endemismo desse bioma. A existência de múltiplos refúgios também poderia explicar a grande heterogeneidade na distribuição de espécies e de linhagens genéticas na Mata Atlântica.

Estudos filogeográficos com espécies endêmicas da MAB representam um ótimo modelo de estudo para testar a hipótese de refúgios (e. g. Carnaval *et al.*, 2009). Porém, o número de trabalhos envolvendo espécies locais ainda é relativamente limitado, especialmente levando em conta estudos com plantas (Moritz *et al.*, 2000; Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). Descontinuidades filogeográficas dentro da MAB já foram sugeridas para diferentes grupos de organismos, como por exemplo: morcegos (Martins *et al.*, 2009), abelhas (Batalha-Filho *et al.*, 2010), répteis (Pellegrino *et al.*, 2005; Grazziotin *et al.*, 2006), anfíbios (Carnaval *et al.*, 2009; Thomé *et al.*, 2010), aves (Cabanne *et al.*, 2007, 2008), macacos (Harris *et al.*, 2005), preguiças (Moraes-Barros *et al.*, 2006) e plantas (Ribeiro *et al.*, 2010). Entretanto, de maneira geral, o padrão de diversificação das diferentes linhagens parece ser bastante diverso para ser explicado majoritariamente por eventos associados à teoria dos refúgios climáticos, tanto em relação à profundidade temporal das diferenças entre grupos filogeográficos quanto em relação à localização desses supostos refúgios (revisado em Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). Além disso, embora novos métodos de sequenciamento de DNA tenham trazido uma relativa diminuição dos custos dessa metodologia, os estudos filogeográficos já realizados na região Neotropical foram majoritariamente restritos a um único marcador (tipicamente o DNA mitocondrial no caso de animais, e o DNA de cloroplasto – cpDNA – no caso de plantas; Turchetto-Zolet *et al.*, 2013) – embora esse seja padrão não seja restrito aos estudos da região Neotropical (Avice, 2008). Sabe-se, porém, que a história da espécie não pode ser acuradamente refletida por um único marcador genético (Edwards & Beerli, 2000), sendo fundamental que novos trabalhos utilizem outros marcadores para auxiliar na identificação de áreas com alta variabilidade genética e manutenção do potencial evolutivo das espécies, além de serem valiosos para identificar linhagens genéticas com histórias evolutivas únicas (Byrne, 2003).

A palmeira *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae) é uma espécie endêmica da Mata Atlântica, ocorrendo ao longo do litoral desde a Bahia até o Rio Grande do Sul (Reis & Reis, 2000), e em porções de floresta no interior do sul do país. É a única espécie do gênero com

distribuição não-Amazônica (Henderson, 2000). É conhecida por diversos nomes populares, os mais conhecidos são palmeira juçara, palmitero e palmito-doce (Reis & Reis, 2000). É uma planta de um único tronco que germina na sombra e parece se reproduzir melhor dentro do ambiente florestal abaixo do dossel alcançando até 20 metros de altura (Orlande *et al.*, 1996).

A espécie já foi considerada como a palmeira dominante do ecossistema (Henderson *et al.*, 1995), mas atualmente encontra-se ameaçada pelas ações antrópicas e fragmentação do habitat (MMA, 2008). O meristema comestível a torna um alvo do extrativismo ilegal graças a seu alto valor comercial (Galetti & Fernandez, 1998). Para colher o palmito de *E. edulis* o meristema do tronco é cortado, o que causa a morte da planta. A exploração descontrolada da espécie sem preocupação com a sustentabilidade dessa atividade em longo prazo causou um forte declínio das populações naturais dessa espécie (Reis & Reis, 2000). A exploração ilegal do palmito traz também diversos problemas ecológicos, pois os frutos da juçara são consumidos por várias espécies de animais (Reis & Kageyama, 2000). Embora atualmente estima-se que o Açaí (*E. oleraceae*) responda por 90% da produção do palmito brasileiro (Martins & Lima, 1999), a pressão sobre as populações naturais de *E. edulis* permanece, uma vez que a extração ilegal representa uma alternativa de ganho financeiro para famílias de baixa renda (Reis & Reis, 2000).

Diversos estudos foram realizados sobre o manejo sustentável da espécie, bem como a avaliação do potencial da exploração não apenas do palmito, mas também do fruto da espécie (Martins, 2008), como uma fonte de renda alternativa para as populações locais. Um ponto importante para o manejo sustentável, em termos de conservação, é a caracterização da diversidade genética presente nas populações remanescentes da espécie. O que pode revelar populações isoladas ou estoques genéticos únicos que mereçam atenção especial para conservação.

A variabilidade genética das populações do palmitero vem sendo estudada há algum tempo. Porém a maioria dos trabalhos tem um caráter regional. Por exemplo, Conte *et al.* (2006) compararam a diversidade genética em populações naturais e manejadas no estado de Santa Catarina, e concluíram que a variabilidade genética não parece ter diminuído com a exploração da espécie. Porém o impacto de diferentes sistemas de manejo sobre a diversidade genética dessa espécie é completamente desconhecido para outras regiões, e pode variar bastante dependendo dos sistemas de manejo empregados. Mais abrangente em termos

geográficos é o trabalho de Cardoso *et al.* (2000), que utilizaram marcadores AFLP para comparar populações distribuídas ao longo da floresta ombrófila densa desde a Bahia até o Paraná. Eles concluíram que a relação entre as populações parece se adequar a um modelo de isolamento por distância talvez influenciado por uma possível história de fragmentação dessa vegetação durante o Pleistoceno. Como reconhecido pelos próprios autores (Cardoso *et al.*, 2000), é possível que a utilização de outros marcadores genéticos possa contribuir para uma visão mais clara sobre o relacionamento histórico das populações dessa espécie.

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo investigar a filogeografia do palmitreiro *E. edulis* baseando-se no polimorfismo de regiões do cpDNA e do DNA nuclear para avaliar o grau de estrutura genética ao longo da Mata Atlântica e o quanto esses resultados se adequam à hipótese de refúgios da Mata Atlântica proposta por Carnaval e Moritz (2008). Os objetivos específicos são:

- a) Caracterizar os principais grupos filogeográficos para essa espécie ao longo de sua distribuição;
- b) Quantificar o grau de variabilidade genética e de estrutura populacional entre os grupos filogeográficos;
- c) Testar se há evidências de crescimento populacional para cada um dos grupos filogeográficos;
- d) Estimar o tempo de divergência entre os grupos filogeográficos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A Tabela 1 apresenta a origem das populações de *E. edulis* utilizadas nesse estudo. Para treze populações, amostras de DNA foram obtidas junto ao Banco de DNA de Espécies da Flora Brasileira do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ), incluindo populações distribuídas desde a Bahia até o Paraná. As amostras de DNA que compõem a coleção são obtidas de folhas jovens, imediatamente secas em sílica gel, ou coletadas em nitrogênio líquido. O DNA celular total foi extraído através do método descrito por Doyle & Doyle (1987), com pequenas modificações, produzindo amostras puras o suficiente para não inibir

tratamentos enzimáticos. Sua quantidade e qualidade são avaliadas através de eletroforese em gel de agarose e por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Sambrook & Russell, 2001). Outras três populações localizadas no estado do RS e já caracterizadas no Herbário ICN foram coletadas pelo Prof. Nelson J. R. Fagundes em 2008 a partir de folhas, sendo pulverizadas no almofariz contendo nitrogênio líquido com o auxílio de um pilão e armazenadas em tubos *eppendorf* a temperatura de -20 °C. A extração de DNA dessas amostras foi realizada em 2014 a partir do kit *PureLink® Genomic DNA* (Invitrogen), utilizado conforme as instruções do fornecedor. O DNA extraído e os obtidos com o Banco de DNA do JBRJ foram quantificados no *Picodrop* e armazenados a temperatura de -20 °C.

Tabela 1: Populações de *Euterpe edulis* estudadas com devidos códigos de população e coordenadas geográficas.

População	Localidade	Grupo	Coordenadas
1	Uruçuca (Distrito de Serra Grande) - BA		14°26'20"S/39°01'45"O
2	Ihéus (Mata da Esperança) - BA	Bahia (BA)	14°47'00"S/39°04'00"O
3	Caraibuna (Reserva Biológica de Una) - BA		15°12'00"S/39°05'00"O
4	Linhares (Reserva Natural Vale do Rio Doce) - ES	Espírito	19°12'00"S/40°02'00"O
5	Santa Teresa (Estação Biológica de Santa Lúcia) - ES	Santo (ES)	19°58'00"S/40°32'17"O
6	Santa Maria Madalena (Entorno do PE do Desengano) - RJ		21°59'00"S/41°58'00"O
7	Magé (EE do Paraíso) - RJ	Rio de	22°30'00"S/42°54'00"O
8	Rio de Janeiro (PN da Tijuca, Archer) - RJ	Janeiro (RJ)	22°27'00"S/43°17'00"O
9	Nova Iguaçu (Tinguá, RB do Tinguá) - RJ		22°35'00"S/43°25'00"O
10	Rio de Janeiro (Abrão, Ilha Grande) - RJ		23°09'00"S/44°10'00"O
11	Resende (PN do Itatiaia) - RJ		22°25'00"S/44°42'00"O
12	Palmeiras de São Paulo (Reserva Municipal de Pindamonhangaba) - SP		22°50'00"S/45°31'00"O
13	Guaraqueçaba (Reserva Particular de Salto Morato) -PR	Sul	25°11'00"S/48°18'00"O
14	Dom Pedro de Alcântara (Área do Batista) - RS		29°30'00"S/49°50'00"O
15	São Francisco de Paula (Pró-Mata, Vale do Três Forquilhas) - RS		29°32'13"S/50°03'52"O
16	Mariana Pimentel (Cerro Negro) - RS		30°20'25"S/51°33'59"O

Os marcadores genéticos a serem caracterizados foram amplificados enzimaticamente através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Diversos marcadores plastidiais e nucleares foram testados para avaliar o sucesso de amplificação bem como seu conteúdo polimórfico. Três espaçadores plastidiais: psbA-trnH (Sang *et al.*, 1997 e Tate & Simpson, 2003), trnL-trnF (Taberlet *et al.*, 1991) e trnS-trnFM (Demesure *et al.*, 1995); e um gene nuclear: Adh (Gaut *et al.*, 1996), foram selecionados para o estudo. A reação de PCR para cada par de primers plastidiais foi realizada com 2 mM de MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, Tampão 1x, 0,25 µM de cada primer, 1 U de Taq Platinum polimerase e 1,0 µL de DNA, em um volume final de 25 µL de reação. A reação de amplificação para os pares de primers trnH-psbA e trnLE-trnLF ocorreu após uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 10 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C (diminuindo 0,5°C a cada ciclo) por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguido de 30 ciclos adicionais de 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Com a realização de um passo de extensão final por 5 minutos a 72°C. Para a reação de amplificação do par de primers trnS-trnFM foi realizada uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 10 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C (diminuindo 0,5°C a cada ciclo) por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguido de 30 ciclos adicionais de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Com a realização de um passo de extensão final por 5 minutos a 72°C. Para o gene nuclear, foram realizadas duas reações distintas, a primeira utilizando primers externos (Adh E3F1 e E10R1) com o DNA total, seguidos de uma reação com primers internos (Adh E4F2 e E10R2) utilizando 1 µL do PCR anterior. Para esta reação de amplificação foi realizada uma desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 42°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, finalizando com uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

A amplificação dos fragmentos foi verificada por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% corado com GelRed. O produto de PCR obtido foi purificado com as enzimas Exonuclease 1 (ExoI) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. O DNA foi sequenciado pela empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul) em ambas as direções. Os cromatogramas obtidos foram analisados visualmente, alinhados e editados utilizando o programa Geneious (<http://www.geneious.com/>) e o programa BioEdit (Hall, 1999). Para a separação das linhagens haplotípicas do gene Adh foi utilizado o programa *Phase* (Stephens *et al.*, 2001) a partir de 3 réplicas utilizando 1 milhão de passos MCMC amostrando a cada 100 passos, após 100.000 passos descartados como

burnin. Os três marcadores plastidiais foram sempre analisados de maneira concatenada, uma vez que não há recombinação no cpDNA. O programa Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013) foi utilizado para a escolha do melhor modelo de análise para os dados.

Para as análises de redes de haplótipos foi utilizado o programa Network (<http://fluxus-engineering.com/>) utilizando o algoritmo de Median-Joining (Bandelt *et al.*, 1999). As estatísticas gerais de genética de populações tais como diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) (Nei, 1987), F_{ST} , AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992), bem como os testes de neutralidade de D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu, 1997) foram calculadas no programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). A definição de grupos filogeográficos para as populações amostradas foi realizada no programa BAPS (Corander & Marttinen, 2006) utilizando os dois marcadores (cpDNA e Adh) simultaneamente. Foram avaliados agrupamentos tanto em nível populacional quanto em nível individual.

A relação evolutiva entre os grupos filogeográficos inferidos anteriormente, bem como a estimativa do seu tempo de divergência foi realizada no programa BEAST 1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012), utilizando o módulo *Beast, de “árvore de espécie” (Heled & Drummond, 2010), e tratando os grupos filogeográficos como terminais. Para datação molecular, foram utilizadas duas abordagens distintas. Primeiramente, foi feita uma análise assumindo os modelos HKY e HKY+G, e taxas de $2,0 \times 10^{-9}$ /sítio/ano (entre $1,0 \times 10^{-9}$ e $3,0 \times 10^{-9}$ /sítio/ano - Wolfe *et al.*, 1987; Casazza *et al.*, 2016) e $6,1 \times 10^{-9}$ /sítio/ano (entre $5,1 \times 10^{-9}$ /sítio/ano e $7,1 \times 10^{-9}$ /sítio/ano - Wolfe *et al.*, 1989) para o cpDNA e o Adh, respectivamente. Nessa análise, apenas substituições de nucleotídeo foram utilizadas para o cpDNA. Para utilizar também a informação de variações estruturais (inserção/deleção - *indels* e microinversões), foi feita uma segunda análise utilizando um prior de taxa relativa para o cpDNA (Ferreira & Suchard, 2008), na qual a taxa evolutiva do cpDNA foi calibrada a partir da taxa do gene Adh. Como não foram observadas diferenças entre as topologias, essa segunda estratégia foi utilizada nas análises posteriores para maximizar o uso da informação dos marcadores plastidiais. Essas análises utilizaram 100.000.000 de passos MCMC amostrando a cada 1000 passos e descartando os primeiros 5.000.000 de passos como *burnin*. Três hipóteses topológicas relacionadas à geografia foram testadas para os grupos filogeográficos sendo 1) “clado Norte vs. clado Sul” – ((BA, ES), (RJ, Sul)); 2) “Divergência Norte-Sul” – (BA, (ES, (RJ, Sul))); 3) “Divergência Sul-Norte” – (Sul, (RJ, (ES, BA))). Essas hipóteses foram testadas utilizando o fator de Bayes ($2 \cdot \log BF$, no qual BF é a diferença, em escala logarítmica, entre a verossimilhança marginal entre dois modelos - Kass & Raftery,

1995), inferindo a verossimilhança marginal a partir de *path sampling* e *stepping-stone sampling* após amostrar 100 “*power posteriors*”. Finalmente, o programa BEAST 1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012) foi utilizado para uma análise de variação de tamanho populacional ao longo do tempo para os dois marcadores combinados e para cada grupo filogeográfico individualmente utilizando o modelo de *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP - Heled & Drummond, 2008), usando os mesmos parâmetros descritos anteriormente.

4. RESULTADOS

Foram sequenciados 96 indivíduos para os três espaçadores plastidiais, o conjunto de dados alinhados consistiu em 1974 pares de base e apresentaram dez sítios variáveis, sendo cinco substituições de ponto, e cinco polimorfismos estruturais, sendo quatro *indels* e uma micro-inversão de 13 pares de bases. Esses polimorfismos definiram 12 haplótipos para o cpDNA (Tabela 2). Para o gene nuclear *Adh* foram sequenciados 87 indivíduos e o conjunto de dados alinhados consistiu em 1013 pares de bases. Na análise das sequências foram encontradas dez substituições de ponto, correspondendo a 15 diferentes haplótipos nas 16 populações estudadas (Tabela 2).

Para as análises posteriores, cada polimorfismo estrutural do cpDNA foi codificado como um único evento evolutivo (*i.e.* um caractere). A definição de grupos filogeográficos populacionais sugeriu a existência de quatro grupos distintos: Bahia (3 populações), Espírito Santo (2 populações), Rio de Janeiro (4 populações) e Sul (7 populações) (Figura 1A), com um forte componente geográfico (Figura 1B). A definição de grupos filogeográficos em nível individual foi, de modo geral, consistente com a classificação baseada em populações, com pequenas diferenças: O grupo BA foi dividido em três componentes distintos, sendo um deles representado exclusivamente por uma população e os demais compartilhados entre as duas populações restantes. O grupo ES foi subdividido em dois grupos, sendo um dos componentes compartilhado com um indivíduo de uma população do grupo RJ, que por sua vez também foi subdividido em mais dois componentes exclusivos (além do componente compartilhado com o indivíduo do grupo ES), citado acima. Finalmente, o grupo Sul foi subdividido em três componentes. Curiosamente, um mesmo componente genético foi identificado para indivíduos das populações mais ao norte e mais ao sul na amostra, possivelmente representando uma homoplasia, e não um evento de dispersão por longa distância (Figura 1C).

Tabela 2: Distribuição dos haplótipos de cpDNA e gene nuclear Adh nas populações de *E. edulis*.

População	Grupo	cpDNA		Adh	
		N	Haplótipo (n° amostrado)	N	Haplótipo (n° amostrado)
1	Bahia (BA)	5	Hap10 (5)	5	Hap01 (1), Hap06 (2), Hap07 (5), Hap10 (2)
2		6	Hap11 (6)	6	Hap01 (4), Hap02 (1), Hap09 (4), Hap10 (2), Hap15 (1)
3		6	Hap12 (6)	6	Hap01 (1), Hap05 (1), Hap07 (3), Hap09 (1), Hap15 (6)
4	Espírito Santo (ES)	6	Hap07 (4), Hap08 (2)	6	Hap01 (3), Hap07 (1), Hap09 (3), Hap10 (5)
5		5	Hap07 (3), Hap09 (2)	5	Hap01 (3), Hap04 (1), Hap07 (3), Hap14 (3)
6	Rio de Janeiro (RJ)	6	Hap01 (1), Hap03 (4), Hap06 (1)	5	Hap01 (6), Hap05 (1), Hap10 (1), Hap11 (1), Hap13 (1)
7		7	Hap03 (7)	7	Hap01 (14)
8		6	Hap01 (3), Hap02 (3)	7	Hap01 (6), Hap07 (1), Hap08 (1), Hap09 (5), Hap11 (1)
9		7	Hap03 (7)	7	Hap01 (11), Hap05 (1), Hap09 (2)
10	Sul	6	Hap04 (6)	6	Hap01 (4), Hap08 (8)
11		6	Hap05 (6)	6	Hap01 (3), Hap09 (1), Hap10 (2), Hap11 (4), Hap14 (2)
12		9	Hap05 (9)	8	Hap01 (7), Hap03 (1), Hap06 (1), Hap07 (1), Hap09 (2), Hap11 (4)
13		6	Hap04 (6)	6	Hap01 (4), Hap08 (7), Hap11 (1)
14		5	Hap04 (5)	5	Hap01 (4), Hap08 (1), Hap11 (4), Hap12 (1)
15		5	Hap04 (1), Hap05 (4)	1	Hap01 (1), Hap12 (1)
16	5	Hap04 (5)	1	Hap01 (2)	

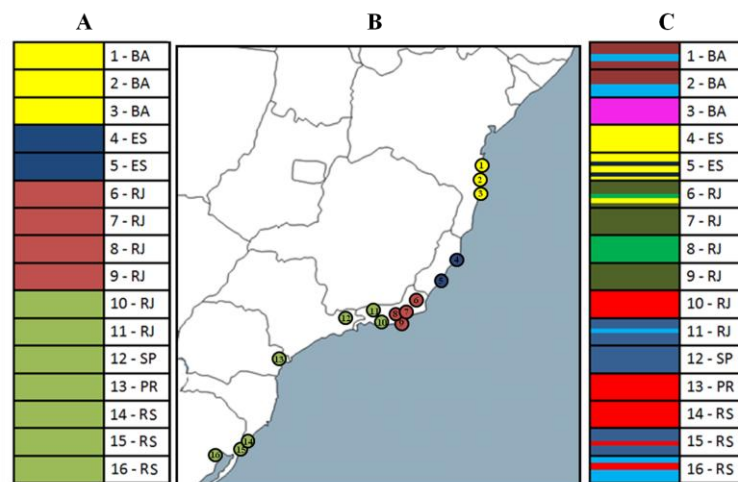


Figura 1: Resumo da estrutura populacional encontrada para *Euterpe edulis* quando considerados os grupos utilizados no trabalho (A), com um forte componente geográfico (B). E a definição de grupos filogeográficos em nível individual (C).

As relações genealógicas entre os haplótipos de cpDNA demonstraram uma forte correspondência entre haplótipo e grupo filogeográfico, onde cada grupo foi associado a haplótipos próprios, não compartilhados. Por outro lado, a rede de haplótipos para o gene *Adh* foi dominada por haplótipos compartilhados entre os grupos filogeográficos (Figura 2).

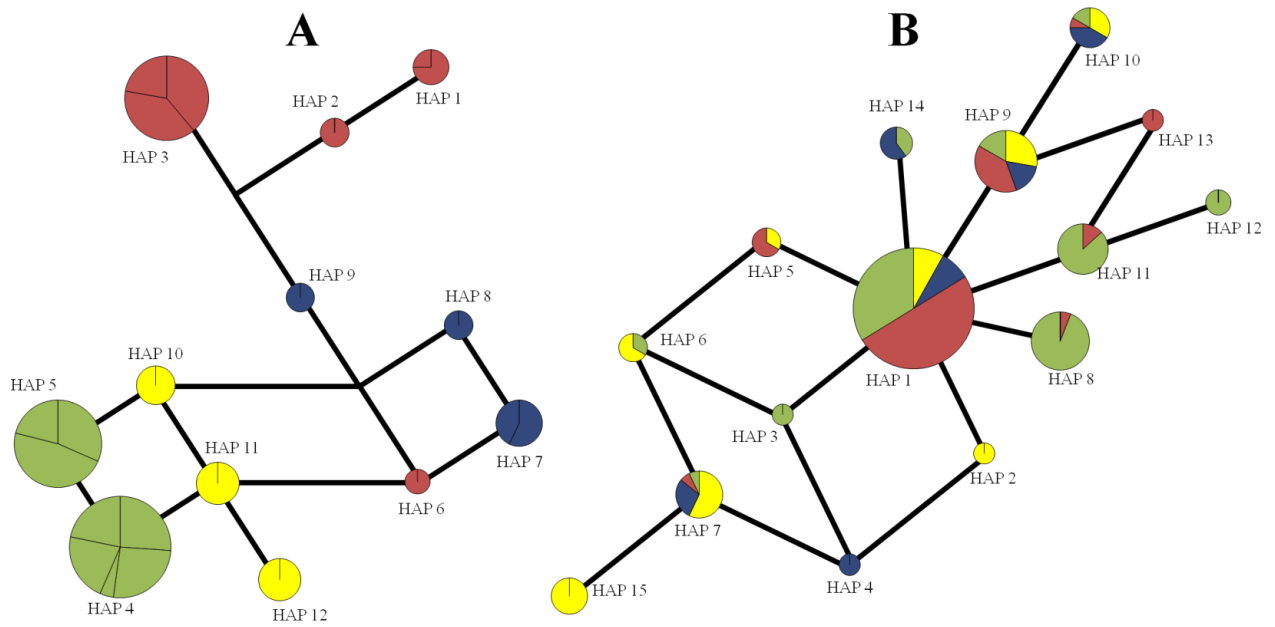


Figura 2: Rede de haplótipos para os espaçadores plastidiais (A) e para o gene nuclear *Adh* (B) para os quatro grupos conforme o mapa.

A árvore relacionando os quatro grupos filogeográficos identificados anteriormente não apresentou bons valores de suporte (Probabilidade Posterior $< 0,7$), mas indicaram uma divergência recente entre as populações. Para tentar avaliar qual a hipótese de divergência mais provável, três topologias alternativa foram testadas, todas contendo um forte componente geográfico. A topologia “clado Norte vs. clado Sul” recebeu suporte “positivo” em relação às topologias alternativas, com fatores de Bayes entre 2,64 e 4,94 (Kass & Raftery, 1995). Foi obtida uma data de 14.737 anos atrás para a raiz (95% *highest posterior density* (HPD) 6.456 – 24.983 anos atrás), com as divergências entre BA e ES, e RJ e Sul datadas em 10.656 anos atrás (95% HPD 3.479 – 20.151 anos atrás) e 9.046 anos atrás (95% HPD 3.148 – 17.429 anos atrás), respectivamente.

Os principais valores de diversidade para os grupos filogeográficos estão resumidos na Tabela 3. A diversidade haplotípica variou entre 0,50 a 0,70 entre os grupos para o DNA plastidial e entre 0,48 a 0,85 para o gene nuclear. De modo geral, os valores de diversidade

foram maiores nos grupos mais ao norte da distribuição. Os testes de neutralidade não foram significativos para o cpDNA, enquanto para o Adh, ambos os testes foram significativos para o grupo RJ, podendo indicar uma expansão populacional. A diferença entre os grupos populacionais explicou 79,18% da variação observada para o cpDNA, apresentando valores F_{ST} acima de 0,64 quando comparados par a par. Para o gene Adh, a diferença entre os grupos explicou 21,28% da variação observada, apresentando valores F_{ST} abaixo de 0,33 quando comparados par a par (Tabela 4). Quando analisados de maneira combinada pelo método de EBSP, os dados sugeriram que não há sinal de expansão populacional para nenhum grupo. Ao contrário, o tamanho populacional efetivo estimado para cada grupo teria se mantido estável entre ~60 e 90 mil indivíduos (Tabela 5).

Tabela 3: Resultados estatísticos dos testes realizados separando as populações de *E. edulis* em quatro grupos filogeográficos para os dois conjuntos de dados.

Grupo	N	H	π (x100)	Θ (s)	D_{TAJ}	Fs Fu
cpDNA	96					
BA	17	0,7059	0,0485	0,5916	1,41	0,89
ES	11	0,5818	0,0781	1,3657	0,34	1,44
RJ	26	0,5015	0,0736	1,5723	-0,31	1,14
Sul	42	0,5075	0,0266	0,2324	1,67	1,87
Adh	87					
BA	17	0,8556	0,2462	1,4674	1,94	-0,30
ES	11	0,8398	0,2120	1,6459	0,94	0,10
RJ	26	0,4804	0,0659	1,5491	-1,49*	-4,75*
Sul	33	0,7650	0,1213	1,8910	-0,93	-3,67

N=número amostral, H=Diversidade gênica, π =Diversidade nucleotídica, $\theta(S)$ =Theta, D_{TAJ} = Estatística D de Tajima, Fs Fu = Estatística Fs de Fu. * $P < 0,05$ para D_{TAJ} ; $P < 0,02$ para Fs Fu.

Tabela 4: Tabela de valores de F_{ST} para comparação par a par entre os grupos filogeográficos de *E. edulis* baseados no cpDNA (abaixo da diagonal) e no gene Adh (acima da diagonal)

	BA	ES	RJ	Sul
BA	*	0,0954	0,3319	0,3325
ES	0,7085	*	0,1328	0,1717
RJ	0,8227	0,7079	*	0,0706
Sul	0,6426	0,8266	0,8415	*

$P < 0,05$ para todos os valores.

Tabela 5: Tamanho populacional efetivo para os diferentes grupos filogeográficos de *E. edulis*

	Mediana	95% HPD
BA	63.593	16.615 – 138.849
ES	73.884	17.942 – 168.930
RJ	88.922	7.638 – 184.662
Sul	62.253	13.983 – 131.406

5. DISCUSSÃO

As populações de *E. edulis* estudadas no presente trabalho apresentam um grau de estrutura genética que, apesar de significativa, possui pouca profundidade temporal. A identificação de grupos filogeográficos, bem como o teste de topologias alternativas, sugere que o principal sinal de estruturação genética ocorre entre os grupos filogeográficos mais ao norte (BA e ES) vs. os grupos mais ao sul (RJ e Sul). Os valores de F_{ST} para o gene *Adh* aparecem de acordo com essa explicação, embora para o cpDNA, esses valores não parecem apoiar essa hipótese. Porém, no caso do cpDNA, para o qual não há haplótipos compartilhados entre os grupos filogeográficos, esses valores acabam sendo muito influenciados pela proximidade dos haplótipos na rede de haplótipos, o que acaba inflando a diferença entre RJ e Sul, e diminuindo a diferença entre BA e Sul, por exemplo. A maior estrutura populacional para o cpDNA pode estar relacionada à estratégia de vida da espécie em formar bancos de plântulas próximas à planta-mãe (Paulilo, 2000), uma vez que o cloroplasto é de transmissão materna (Corriveau & Coleman, 1988). Possivelmente, essa divergência basal entre grupos filogeográficos pode ter sido causada pela existência de uma porção de floresta estacional na região nordeste do estado do Rio de Janeiro (Oliveira-Filho *et al.*, 2005), que poderia ter funcionado como um ponto de interrupção para espécies da MAB durante os períodos glaciais. Alternativamente, o rio Paraíba do Sul, que corre na mesma região de disjunção entre os grupos filogeográficos poderia ter tido um papel no isolamento entre esses grupos (Menezes *et al.*, 2016).

Em relação às zonas de estabilidade tradicionalmente propostas para a MAB (Carnaval & Moritz, 2008), a separação entre os grupos filogeográficos “Norte vs. Sul” é consistente com a ideia de zonas de estabilidade (refúgios) na Bahia e na região da Serra do Mar, no

sudeste Brasileiro. Porém, esses modelos gerais não preveem nem a existência de dois grupos em cada uma dessas zonas de estabilidade. Além disso, o “refúgio da Bahia” teria no rio Doce seu limite sul, embora uma das populações do Espírito Santo estudadas aqui esteja distribuída ao sul do rio Doce. Curiosamente, Menezes *et al.* (2016), estudando a história evolutiva de uma espécie de Anura sugeriram a existência de dois grupos filogeográficos tanto para a região do refúgio da Bahia e da Serra do Mar, com limites geográficos semelhantes aos encontrados aqui. Nesse sistema, o rio Jequitinhonha poderia ter funcionado como barreira entre os grupos BA e ES, enquanto o rio Paraíba do Sul poderia ter isolado algumas populações do RJ em relação a outras populações do sudeste brasileiro. Porém, nesse estudo não houve diferenças genéticas para as populações de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e da margem esquerda do rio Paraíba do Sul no Rio de Janeiro (Menezes *et al.*, 2016), justamente a principal quebra filogeográfica encontrada para *E. edulis*.

De fato, o rio Jequitinhonha já foi proposto como uma possível barreira para diversos grupos animais (Pellegrino *et al.*, 2005; Cabanne *et al.*, 2008; Lara-Ruiz *et al.*, 2008; Batalha-Filho *et al.*, 2013; Carnaval *et al.*, 2009; Tonini *et al.*, 2013; Brunet *et al.*, 2014). Entretanto, com exceção do estudo de Menezes *et al.* (2016), pouco, se é que algum trabalho identificou uma estruturação filogeográfica significativa entre populações estado do Rio de Janeiro. Mais comumente, quebras filogeográficas mais ao sul têm sido associadas com a transição entre floresta tropical e subtropical, associada à divisa dos estados de São Paulo e Paraná (Grazziotin *et al.*, 2006; Cabanne *et al.*, 2007; 2008; Thomé *et al.*, 2010; D’Horta *et al.*, 2011). Mesmo a análise de outra espécie arbórea da MAB, *Schizolobium parahyba*, mostrou uma diferença na variabilidade genética presente em populações dos estados do sul do Brasil quando comparada à diversidade presente nos estados do sudeste, embora sem a determinação clara de uma estrutura significativa entre as populações do sudeste (Turchetto-Zolet *et al.*, 2012).

Os valores de diversidade genética semelhantes entre os grupos filogeográficos, bem com as evidências de tamanhos populacionais constantes ao longo do tempo sugerem que cada um dos quatro grupos filogeográficos representa populações que ocupam zonas de estabilidade (*sensu* Carnaval *et al.*, 2009). Apesar dos testes de neutralidade terem sido significativos para o grupo RJ para o Adh, tanto a análise do cpDNA quanto a análise combinada de ambos os marcadores não encontraram sinais de expansão populacional recente. Para o grupo Sul também houve uma tendência, para o Adh, de valores sugestivos de crescimento populacional. Turchetto-Zolet *et al.* (2012) relataram um padrão compatível com

uma expansão populacional das populações ao sul da distribuição de *S. parahyba*, que ocorrem aproximadamente na mesma área geográfica das populações de *E. edulis* dos grupos Sul. Ainda que a essa tendência de crescimento populacional possa ser confirmada futuramente para os grupos Sul e RJ, parece improvável que o grau de crescimento seja forte o bastante para que esses grupos filogeográficos sejam desconsideradas como representantes de regiões de estabilidade. Dessa forma, nossos resultados estão de acordo com aqueles encontrados para outras espécies endêmicas da MAB que já propuseram outros refúgios centrais ou mais ao sul (*e. g.* Grazziotin *et al.*, 2006; Thomé *et al.*, 2010), sugerindo que a história evolutiva de cada espécie pode refletir muito mais características ecológicas individuais do que efeitos em concerto causado pelas mudanças climáticas do Pleistoceno.

Também chama atenção a pequena profundidade temporal das divergências entre grupos filogeográficos. Os tempos de separação inferidos nesse trabalho sugerem datas posteriores ao último máximo glacial, ocorrido entre 26,5 mil e 20-19 mil anos atrás (Clark *et al.*, 2009), indicando que a separação desses grupos filogeográficos pode ter sido uma decorrência desse evento, que teria diminuído a fluxo gênico entre diferentes regiões de estabilidade – provavelmente afetando tanto as espécies polinizadoras quanto dispersoras de *E. edulis*. Estudos com outras espécies da MAB tendem a apresentar divergências entre linhagens mais antigas dentro do Pleistoceno, ou mesmo no Plioceno (ver Turchetto-Zolet *et al.*, 2013, para uma revisão). Embora nossos resultados possam ser interpretados como um reforço à ideia original de refúgios climáticos durante os períodos glaciais (*sensu* Carnaval & Moritz 2008), tomados em conjuntos com outros estudos, é provável que para a maioria das espécies da MAB, eventos mais antigos, ou mais estáveis (como a existência de rios como barreiras) tenham sido mais importantes na formação da estrutura genética da MAB como um todo.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que as populações de *E. edulis* na MAB encontram-se estruturadas em quatro grupos filogeográficos principais que divergiram logo após o último máximo glacial, no final do Pleistoceno, formando quatro zonas de estabilidade, para as quais não há evidências de expansão populacional posterior. Esses resultados parecem corroborar a ideia de refúgios para essa espécie, embora esses refúgios compreendam outras regiões além daquelas tradicionalmente propostas como tal para a MAB como um todo. Além disso, a

ausência de populações fora das áreas de refúgio pode indicar que *E. edulis* foi bastante tolerante em relação às mudanças climáticas do Pleistoceno, embora alterações populacionais em seus polinizadores e dispersores podem ter facilitado a emergência da estrutura genética observada atualmente. A alta estruturação genética observada nesse trabalho também indica que a conservação de populações naturais dessa espécie deve ser pensada regionalmente, uma vez que cada um dos quatro grupos filogeográficos principais representa uma fração da variabilidade genética total observada para a espécie.

7. REFERÊNCIAS

- ÁVILA-DÍAZ I. & OYAMA K. (2007). Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 94:184–193.
- AVISE J.C. (2008). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36:3–15.
- 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., IRESTEDT M., FJELDSÅ J., ERICSON P.G.P., SILVEIRA L.F., MIYAKI C.Y. (2013). Molecular systematics and evolution of the *Synallaxis ruficapilla* complex (Aves: Furnariidae) in the Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67:86–94.
- BATALHA-FILHO H., WALDSCHMIDT A.M, CAMPOS L.A.O., TAVARES M.G. e FERNANDES-SALOMÃO T.M. (2010). Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie* 534-547.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Instrução Normativa n° 6, de 23 de setembro de 2008. Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, v. 145, n. 185, 24 set. 2008. Seção 1, p. 75-83.

- BRUNES T.O., ALEXANDRINO J., BAÊTA D., ZINA J., HADDAD C.F.B., SEQUEIRA F. (2014). Species limits, phylogeographic and hybridization patterns in Neotropical leaf frogs (Phyllomedusinae). *Zoologica Scripta* 43:586–604.
- BYRNE M. (2003). Phylogenetics and the conservation of a diverse and ancient flora. *Comptes Rendus Biologies* 326: S73–S79.
- CABANNE G.S., D’HORTA F.M., SARI E.H.R., SANTOS F.R., MIYAKI C.Y. (2008). Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49:760–773.
- CABANNE G.S., SANTOS F.R., MIYAKI C.Y. (2007). Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 73–84.
- CÂMARA I.G. (2005). Breve história da conservação da Mata Atlântica. In: Galindo-Leal C e Câmara IG (eds.) *Mata Atlântica: Biodiversidade, ameaças e perspectivas*. Belo Horizonte, Fundação SOS Mata Atlântica e Conservation International 31-42.
- CARDOSO S.R.S., ELOY N.B., PROVAN J., CARDOSO M.A., FERREIRA P.C.G. (2000). Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. *Molecular Ecology* 9:1753-1760.
- CARNAVAL A.C., HICKERSON M.J., HADDAD C.F.B., RODRIGUES M.T., MORITZ C. (2009). Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* 323:785-789.
- CARNAVAL A.C. & MORITZ C. (2008). Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35:1187-1201.
- CASAZZA G., GRASSI F., ZECCA G., MINUTO L. (2016). Phylogeographic Insights into a Peripheral Refugium: The Importance of Cumulative Effect of Glaciation on the Genetic Structure of Two Endemic Plants. *PLoS ONE* 11(11).

- CLARK P.U., DYKE A.S., SHAKUN J.D., CARLSON A.E., CLARK J., WOHLFARTH B., MITROVICA J.X., HOSTETLER S.W., MCCABE A.M. (2009). The Last Glacial Maximum. *Science* 325:710-714.
- CONTE R., REIS M.S., VENCOVSKY R. (2006). Effects of management on the genetic structure of *Euterpe edulis* Mart. populations based on microsatellites. *Sci Florest* 72: 81-88.
- CORANDER J., MARTTINEN P. (2006). Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. *Molecular Ecology*, 15, 2833-2843.
- CORRIVEAU J.L. & COLEMAN A.W. (1988). Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *American Journal of Botany* 75:1443-1458.
- DEMASURE B., SODZI N., PETIT R.J. (1995). A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4:129-131.
- D'HORTA F., CABANNE G.S., MEYER D., MIYAKI C.Y. (2011). The genetic effects of Late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic Forest passerine. *Molecular Ecology* 20:1932-1935.
- DOYLE J.J. & DOYLE J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- DRUMMOND A.J., SUCHARD M.A., XIE D. & RAMBAUT A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969-1973.
- EDWARDS S.V. & BEERLI P. (2000). Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution* 54:1839-1854.
- EXCOFFIER L., SMOUSE P.E., QUATTRO J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131:479-491.

- EXCOFFIER L. & LISCHER H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- FERREIRA M.A. & SUCHARD M.A. (2008). Bayesian analysis of elapsed times in continuous-time Markov chains. *Canadian Journal of Statistics*, 36: 355-368.
- FU Y.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915-925.
- GALETTI M. & FERNANDEZ J.C. (1998). Palm heart harvesting in the Brazilian Atlantic Forest: changes in industry structure and the illegal trade. *Journal of Applied Ecology* 35: 294-301
- GALINDO-LEAL C. & CÂMARA I.G. (2005). Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. Capítulo 1. In: Galindo-Leal, C. e Câmara, I.G. (Eds). *Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas*. Belo Horizonte: Conservação Internacional 3-11.
- GAUT B.S., MORTON B.R., MCCAIG B.M., CLEGG M.T. (1996). Substitution rate comparisons between grasses and palms: synonymous rate differences at the nuclear gene *Adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbcL*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:10274-10279.
- GRAZZIOTIN F.G., MONZEL M., ECHEVERRIGARAY S., BONATTO S.L. (2006). Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology* 15:3969-3982.
- HAFFER J. (1969). Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165:131-137.
- HAIG S.M. (1998). Molecular contributions for conservation. *Ecology* 79: 413-425.
- HALL T.A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- HARRIS E.E., GIFALLI-IUGHETTI C., BRAGA Z.H., KOIFFMAN C.P. (2005). Cytochrome b sequences show subdivision between populations of the brown howler

- monkey (*Alouatta guariba*) from Rio de Janeiro and Santa Catarina, Brazil. *Neotropical Primates* 13: 16–21.
- HELED J. & DRUMMOND A.J. (2008). Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 289.
- HELED J. & DRUMMOND A.J. (2010). Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. *Molecular Biology and Evolution* 27(3): 570-580.
- HENDERSON A. (2000). The genus *Euterpe* in Brazil. In: Reis M.S. e Reis A. *Euterpe edulis* Martius (palmeiteiro): biologia, conservação e manejo. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues. 1-22.
- HENDERSON A., GALEANO G., BERNAL R. (1995). Field guide to the palms of the Americas. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 352.
- HEWITT G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913.
- KASS R.E. & RAFTERY A.E. (1995). Bayes Factors. *Journal of American Statistical Association*, 90:377-95.
- LARA-RUIZ P., CHIARELLO A.G., SANTOS F.R. (2008). Extreme population divergence and conservation implications for the rare endangered Atlantic Forest sloth, *Bradypus torquatus* (Pilosa: Bradypodidae). *Biological Conservation* 141: 1332-1342.
- LIEBSCH D., MARQUES M.C.M., GOLDENBERG R. (2008). How long does the Atlantic Rain Forest take to recover after a disturbance? Changes in species composition and ecological features during secondary succession. *Biological Conservation* 141: 1717-1725.
- MARTINS F.M., TEMPLETON A.R., PAVAN A.C.O., KOHLBACH B.C. & MORGANTE J.S. (2009). Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evolutionary Biology* 9, 294.
- MARTINS G. (2008). Palmeira Juçara, potencialidades, cultivo e manejo. Maquiné, Editora da FEPAGRO. 12 pp.

- MARTINS S.V. & LIMA D.G. (1999). Cultura de palmeiras I: Palmitreiro. Cadernos Didáticos 54. Viçosa, Editora UFV. 28 pp.
- MENEZES L., CANEDO C., BATALHA-FILHO H., GARDA A.A., GEHARA M., NAPOLI M.F. (2016). Multilocus Phylogeography of the Treefrog *Scinax eurydice* (Anura, Hylidae) Reveals a Plio-Pleistocene Diversification in the Atlantic Forest. PLoS ONE 11 (6).
- MITTERMEIER R.A., GILL P.R., HOFFMANN M., PILGRIM J., BROOKS J., MITTERMEIER C.J., LAMOURUX J., FONSECA G.A.B. (2005). Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX, Washington.
- MORAES-BARROS N., SILVA J.A.B., MIYAKI C.Y., MORGANTE J.M. (2006). Comparative phylogeography of the Atlantic forest endemic sloth (*Bradypus torquatus*) and the widespread three-toed sloth (*Bradypus variegatus*) (Bradypodidae, Xenarthra). Genetics 126: 189–198.
- MORITZ C. & FAITH D.P. (1998). Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. Molecular Ecology 7: 419-429.
- MORITZ C., PATTON J.L., SCHNEIDER C.J., SMITH T.B. (2000). Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 31: 533–563.
- MYERS N., MITTERMEIER R.A., MITTERMEIER C.G., DA FONSECA G.A.B. & KENT J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403: 853-858.
- NEI M. (1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, NY.
- OLIVEIRA-FILHO A.T., NETO E.T., CARVALHO W.A.C., WERNECK M., BRINA A.E., VIDAL C.V., REZENDE S.C. & PEREIRA J.A.A. (2005). Análise florística do compartimento arbóreo de áreas de floresta atlântica *sensu lato* na região das bacias do leste. Rodriguésia 56: 185-235.
- ORLANDE T., LAARMAN J. & MORTIMER J. (1996). Palmito sustainability and economics in Brazil's Atlantic coastal forest. Forest Ecology and Management 80: 257-265.

- PAULILO M.T. (2000). Ecofisiologia de plântulas e plantas jovens de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae): comportamento em relação à variação de radiação solar, pp. 335-340. Em: *Euterpe edulis* Mart. (Palmitreiro) biologia, conservação e manejo (M.S. Reis & A. Reis, eds.). Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí
- PELLEGRINO K.C.M., RODRIGUES M.T., WAITE A., MORANDO M., YONENAGAYASSUDA Y., SITES J.W.JR. (2005). Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): Genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of Linnean Society*. 85:13–26.
- PINTO L.P. & BRITO M.C.W. (2005). Dinâmica da perda da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira: uma introdução. In: Galindo-Leal C & Câmara IG (Eds. Mata Atlântica biodiversidade, ameaças e perspectivas. Belo Horizonte, Fundação SOS Mata Atlântica. P 27-30.
- REIS A. & KAGEYAMA P.Y. (2000). Dispersão de sementes do palmitreiro (*Euterpe edulis* Martius – Palmae). In: Reis, M.S. & Reis, A. (eds). *Euterpe edulis* Martius (Palmitreiro): biologia, conservação e manejo. Herbário Barbosa Rodrigues. *Sellowia*, 45-48: 60-92.
- REIS M.S. & REIS A. (2000). Apresentação. In: Reis MS e Reis A. *Euterpe edulis* Martius – (palmitreiro): biologia, conservação e manejo. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues. pp vii-xi.
- RIBEIRO R.A., LEMOS-FILHO J.P., RAMOS A.C.S. & 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* 1-12.
- SAMBROOK J. & RUSSELL D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 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.

- SILVA J.M.C. & CASTELETTI C.H.M. (2005). Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. In: Galindo-Leal C e Câmara IG (eds.) Mata Atlântica: Biodiversidade, ameaças e perspectivas. Belo Horizonte, Fundação SOS Mata Atlântica e Conservation International. pp 43-59.
- STEPHENS M., SMITH N., and DONNELLY P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics* 68: 978-989.
- TABERLET P., GIELLY L., PAUTOU G. & BOUVET J. (1991). Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17:1105-1109.
- TAJIMA F. (1989). Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., and KUMAR S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- TATE J.A. & SIMPSON B.B. (2003). Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany* 28: 723–737.
- THOMÉ M.T.C., ZAMUDIO K.R., GIOVANELLI J.G.R., HADDAD C.F.B., BALDISSERA JR. F.A. & ALEXANDRINO J.M.B. (2010). Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55:1018-1031.
- TONHASCA A. (2005). *Ecologia e história natural da Mata Atlântica*. Rio de Janeiro, Interciência. 197p.
- TONINI J.F.R., COSTA L.P., CARNAVAL A.C. (2013). Phylogeographic structure is strong in the Atlantic Forest; predictive power of correlative paleodistribution models, not always. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 51:114–121.
- TURCHETTO-ZOLET A.C.T., CRUZ F., GIOVANNI G., VENDRAMIN G.G., SIMON M.F., SALGUEIRO F., MARGIS-PINHEIRO M., MARGIS R. (2012). Largescale

phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*.

TURCHETTO-ZOLET, A.C., PINHEIRO, F., SALGUEIRO, F. & PALMA-SILVA, C. (2013). Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology* 22: 1193-1213.

VANZOLINI P.E. & WILLIAMS E.E. (1981). The vanishing refuge: a mechanism for ecogeographic speciation. *Papéis Avulsos de Zoologia* 34:251–255.

WOLFE K. H., SHARP P. M., LI W. H. (1989). Rates of synonymous substitution in plant nuclear genes. *Journal of Molecular Evolution* 29:208–211.

WOLFE K.H., LI W-H, SHARP P.M. (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84:9054–9058