

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE
BIOLÓGICA E CONSERVAÇÃO

PAULIANNY DE MOURA RIBEIRO

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *PILOSOCEREUS*
***AUREISPINUS*: UMA ESPÉCIE DE CACTÁCEA VULNERÁVEL E**
MICROENDÊMICA

SOROCABA

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE
BIOLÓGICA E CONSERVAÇÃO

PAULIANNY DE MOURA RIBEIRO

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *PILOSOCEREUS*
***AUREISPINUS*: UMA ESPÉCIE DE CACTÁCEA VULNERÁVEL E**
MICROENDÊMICA

Trabalho apresentado ao Programa de
Diversidade Biológica e Conservação,
Universidade Federal de São Carlos,
campus Sorocaba, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Diversidade Biológica e Conservação.
Área de concentração: Diversidade
Genética e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Marsola de
Moraes

SOROCABA

2015

R484d Ribeiro, Paulianny de Moura.
Diversidade e estrutura genética de *Pilosocereus aureispinus*: uma espécie de cactácea vulnerável e microendêmica. / Paulianny de Moura Ribeiro. -- 2015.
57 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, *Campus* Sorocaba, Sorocaba, 2015
Orientador: Evandro Marsola de Moraes
Banca examinadora: Fernando Faria Franco, Camila Menezes Trindade Macrini
Bibliografia

1. Cacto - genética. 2. Genética de populações. I. Título. II. Sorocaba-Universidade Federal de São Carlos.

CDD 583.56

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca *Campus* Sorocaba.

Às três Marias.

Agradecimentos

Agradeço à Profa. Dra. Léia Scheinvar, pela oportunidade de cursar a disciplina ‘Cactología’, na Universidad Nacional Autónoma de México, por despertar meu interesse por esse grupo de plantas tão magnífico.

Ao Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes pela orientação e confiança no meu trabalho, por possibilitar meu crescimento pessoal e profissional durante todo o período do curso de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Fernando Faria Franco pela disponibilidade e pelas contribuições dadas ao longo do desenvolvimento do trabalho.

À técnica Heidi Utsunomiya pelo suporte e ajuda na realização dos experimentos deste trabalho.

Aos colegas do LaGEvol, pelas conversas e momentos de descontração, por tornarem os dias de trabalho mais divertidos.

Ao meu companheiro Hylio, por ouvir e discutir comigo todas as etapas deste trabalho e por estar sempre presente na minha vida.

Às amigas Marília e Patrícia, pelo apoio e incentivo incondicionais.

À Maju, pelos ciclos de pomodoro virtuais compartilhados à distância.

À minha mãe, Maria Bernadete, e irmãs, Paola e Pâmela, pelo amor, compreensão e incentivo em todas as minhas escolhas, desde sempre.

Resumo

RIBEIRO, P. M. Diversidade e estrutura genética de *Pilosocereus aureispinus*: uma espécie de cactácea microendêmica e vulnerável. 2015. 58 f. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica e Conservação) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2015.

Pilosocereus aureispinus (Buining & Brederoo) F. Ritter é um cacto colunar microendêmico e com distribuição restrita na porção do leste do Brasil, na região dos municípios de Ibotirama e Oliveira dos Brejinhos, Bahia. Nesse trabalho foram estimados os níveis de diversidade genética e estruturação populacional a partir de oito locos de DNA microssatélite em quatro localidades de ocorrência de *P. aureispinus*, abrangendo sua distribuição conhecida. Os níveis de diversidade genética foram relativamente altos ($A = 4,2$ e $H_E = 0,451$) quando comparados com outras espécies proximamente relacionadas e com espécies de distribuição restrita. Não foram detectados locos com desvios significativos em relação às proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação. Alelos exclusivos foram detectados em baixa frequência, assim como baixos níveis de estruturação genética ($F_{ST} = 0,071$ e $G''_{ST} = 0,132$). A análise no programa STRUCTURE não identificou estruturação, indicando que as amostras das quatro localidades analisadas representam apenas um grupo genético ($K=1$). Esses resultados permitem inferir que há acentuado fluxo gênico recente entre as localidades amostradas, o qual pode neutralizar os efeitos de diferenciação e a perda de diversidade genética. Embora nossos resultados indiquem que *P. aureispinus* não esteja sofrendo perda de variabilidade genética devido à sua distribuição restrita, a espécie deveria ser classificada como ameaçada (EN) na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN devido aos distúrbios antrópicos existentes nas regiões onde ocorre.

Palavras-chave: Cactaceae, distribuição restrita, endemismo, estrutura populacional e diversidade genética.

Abstract

RIBEIRO, P. M. Genetic diversity and population structure of *Pilosocereus aureispinus*: a vulnerable and microendemic cactus species. 2015. 58 f. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica e Conservação) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2015.

Pilosocereus aureispinus (Buining & Brederoo) F. Ritter is a narrow endemic columnar cactus of eastern Brazil, occurring at Ibotirama and Oliveira dos Brejinhos, Bahia. In this work the genetic diversity and population structure were assessed for eight microsatellite loci in four *P. aureispinus* localities of occurrence, covering its known distribution. Genetic diversity levels were relatively high ($A = 4,2$ e $H_E = 0,451$) comparing with closely related species and other narrowly distributed plant species. Significant Hardy-Weinberg Equilibrium departures and linkage disequilibrium were not detected. Private alleles in low frequencies and low levels of genetic structure ($F_{ST} = 0,071$ e $G''_{ST} = 0,132$) were detected. STRUCTURE software analysis did not identified structure, showing that samples from four analyzed localities represent a unique genetic group ($K=1$). These results pointed to high level of ongoing gene flow among sampled localities, which may counteract differentiation effects and genetic diversity loss. Despite *P. aureispinus* is not suffering genetic variability erosion due its narrow distribution, the species should be classified as endangered (EN) at IUCN Red List of Threatened Species due existent anthropogenic disturbs in regions where it occurs.

Keywords: Cactaceae, narrow distribution, endemism, population structure and genetic diversity.

Lista de Figuras

Figura 1. – Distribuição geográfica das populações das espécies do grupo taxonômico <i>P. AURISSETUS</i> no leste do Brasil.....	14
Figura 2. – Indivíduos da espécie <i>Pilosocereus aureispinus</i>	15
Figura 3. – Distribuição geográfica das populações conhecidas de <i>P. aureispinus</i> analisadas neste trabalho.....	16
Figura 4. – Exemplo de genótipos obtidos a partir da leitura de um gel de poliacrilamida desnaturante 6%.....	30
Figura 5. – Resultado gráfico da análise de estruturação a partir da estatística $\ln P(D)$ calculado por meio de 10 replicações.....	33
Figura 6. – Resultado gráfico da análise de coordenada principal utilizando os valores de F_{ST} pareado das localidades.....	34

Lista de Tabelas

Tabela 1. – Localidades onde foram realizadas coletas de material biológico de indivíduos da espécie.....	20
Tabela 2. – Relação dos oito locos de DNA microssatélite utilizados para a genotipagem, unidades repetitivas, sequencias dos iniciadores <i>forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R), e temperaturas de hibridização padronizadas (<i>Ta</i>).....	22
Tabela 3. – Iniciadores para a amplificação e sequenciamento das regiões analisadas, com suas respectivas sequencias e autores.....	28
Tabela 4. – Média dos parâmetros de variabilidade genética das quatro localidades amostradas neste trabalho.....	31
Tabela 5. – Valores de F_{ST} e G''_{ST} por locos e as significâncias estatísticas respectivas.....	32
Tabela 6. – Lista de alelos privados por população e loco, com sua respectiva frequência.....	32
Tabela 7. – Resultados da análise de detecção de migrantes. São apresentadas as populações amostradas e as prováveis populações-fonte.....	35

Sumário

1. Introdução.....	9
2. Objetivos	17
3. Metodologia	18
3.1. Estudo da Espécie	18
3.2. Área de Estudo.....	19
3.3. Amostragem Populacional.....	20
3.4. Extração de DNA.....	20
3.5. Locos de DNA microssatélite.....	21
3.6. Validação dos dados genotípicos.....	23
3.7. Diversidade Genética.....	24
3.8. Estrutura Populacional.....	24
3.9. Detecção de Migrantes.....	25
3.10. Regiões do Genoma do Cloroplasto.....	26
4. Resultados	29
4.1. Validação dos Dados Genotípicos	29
4.2. Diversidade Genética.....	30
4.3. Estruturação Populacional	31
4.4. Detecção de Migrantes.....	34
4.5. Dados do Genoma Cloroplastidial.....	35
5. Discussão.....	37
6. Conclusão.....	45
7. Referências Bibliográficas	46
8. Anexos.....	55

1. Introdução

A história evolutiva de espécies com distribuição restrita tem recebido pouca atenção em comparação com espécies de distribuição mais ampla. O tamanho populacional reduzido de espécies com essas características em conjunto com isolamento geográfico e ecológico são considerados fatores determinantes na distribuição da diversidade genética (Jiménez-Mejías *et al.*, 2015). Acredita-se que populações de espécies endêmicas com distribuição restrita geralmente são mais sensíveis aos eventos de extinção devido ao possível tamanho populacional reduzido e ao isolamento espacial (Frankham, 2005; Young *et al.*, 1996).

Em geral, é esperado que essas populações possuam diversidade genética reduzida em comparação com espécies de distribuição mais ampla (Ellstrand & Elam, 1993; Lesica & Allendorf, 1995; Frankham, 2005; Hamilton & Eckert, 2007; Hou & Lou, 2011). Em conjunto com outros processos estocásticos, como a ocorrência de catástrofes naturais e variações ambientais, a expectativa é que estes fatores aumentem as chances de extinção das populações (Ouborg *et al.*, 2006). Esses efeitos são resultados da elevada deriva genética e endogamia dentro das populações e do reduzido fluxo gênico entre elas (Frankham, 2005; Holsinger & Weir, 2009). Como consequência, enquanto a diminuição da heterozigosidade pode reduzir a aptidão individual e comprometer a viabilidade da população em um tempo relativamente curto, a diminuição da riqueza alélica pode limitar a capacidade das populações de superarem novas pressões seletivas (Frankham, 2005; Young *et al.*, 1996).

Nas plantas, além do padrão de distribuição geográfica, o sistema de cruzamento, os mecanismos de polinização, a dispersão de sementes e a longevidade

dos indivíduos são também fatores importantes para o nível e a distribuição da variação genética dentro e entre populações (Loveless & Hamrick, 1984). Por exemplo, espécies com sobreposição de gerações geralmente exibem níveis mais elevados de variação genética em comparação com espécies com tempo de vida curto, pois a longevidade possibilita o acúmulo de mais genótipos diferentes dentro das populações (Jones *et al.*, 2005).

Com base nesse corpo de conhecimento sobre a relação entre parâmetros genético-populacionais e extinção, a *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) reconhece a diversidade genética como uma das três formas de biodiversidade alvo de conservação. Com a finalidade de promover maior objetividade e transparência na avaliação do status de conservação das espécies, a IUCN elaborou um guia de categorias de espécies ameaçadas (anexo 1). Para determinar se um táxon é ameaçado ou não, e se ameaçado, a qual categoria pertence (criticamente ameaçado, CR; ameaçado, EN; ou vulnerável, VU), basta apresentar um (ou mais) dos cinco critérios baseados em indicadores biológicos de populações: (A) população em declínio (passado, presente e/ou projetada); (B) amplitude da distribuição geográfica E fragmentação, declínio ou flutuações; (C) população pequena E fragmentação, declínio ou flutuações; (D) populações muito pequenas OU distribuição restrita; (E) análise quantitativa de risco de extinção (ex: modelagem da persistência da população) (IUCN, 2013).

Entre esses critérios utilizados pela IUCN, pode-se observar que vários deles estão relacionados com a amplitude da distribuição geográfica e tamanho populacional (critérios B, C e D). Em parte, a utilização desses critérios é justificada pela propensão a erosão genética que espécies com essas características estão sujeitas. Geralmente,

distribuição restrita já é uma condição suficiente para classificar um táxon como ameaçado (IUCN, 2013).

Entre os vários grupos vegetais com espécies inseridas na lista da IUCN, a família Cactaceae possui 155 espécies com ocorrência no Brasil classificadas como ameaçadas, das quais 31 CR, 57 EN e 43 VU. Além destas, 15 espécies são classificadas como preocupantes para sua conservação (NC) e para outras nove os dados são insuficientes (DD) para sua classificação. Para a maior parte dessas espécies, população em declínio por perda de hábitat e fragmentação é considerada a maior ameaça (IUCN, 2012b).

Dentre as características taxonômicas da família, vale observar as que podem estar relacionadas às condições xéricas presentes nos ambientes em que ocorrem, tais como: (1): tricomas em suas raízes, (2) cutícula espessa na epiderme, (3) tecidos modificados, (4) modificação de folhas em espinhos, (5) caule com pigmentos fotossintéticos e (6) metabolismo ácido das crassuláceas (CAM); em geral, essas características estão associadas à redução da perda de água e eficiência da capacidade fotossintética (Nyffeler, 2002; Arakaki *et al.*, 2011; Zappi *et al.*, 2011)

Juntamente com o sudeste dos Estados Unidos e México, bem como a região dos Andes, em particular no Peru e na Bolívia, a porção leste do Brasil é um dos principais centros de diversidade de cactáceas, representando o terceiro centro mais importante para a família, cuja distribuição abrange toda região Neotropical (Hunt *et al.*, 2006). O endemismo e diversidade destas áreas de vegetação xerófita no leste do Brasil provavelmente estão associados a eventos geológicos e climáticos ocorridos no final do período Terciário e início do Quaternário (Werneck *et al.*, 2011; Prado *et al.*, 2012), resultando na distribuição atual das espécies e populações desses ambientes (Ab'Saber,

1982; Pennington *et al.*, 2000, 2004; Taylor & Zappi, 2004; Moraes *et al.*, 2009; Bonatelli *et al.*, 2014).

São reconhecidos no leste do Brasil cerca de 40 gêneros e 227 espécies (Souza & Lorenzi, 2005), dentre os quais 176 são endêmicas (Taylor & Zappi, 2004). Embora a maior parte dessas espécies ocorra no domínio da Caatinga, há uma grande diversidade de cactáceas nas regiões centro-oeste e sudeste (Taylor & Zappi, 2004). Nessas regiões, as populações de cactáceas geralmente estão restritas a pequenos enclaves de habitats secos e/ou abertos sobre afloramentos rochosos ou solos arenosos. Esse padrão de distribuição nas regiões centro-oeste e sudeste sugere que as populações e espécies de cactáceas possuam baixos níveis de variabilidade genética, o que justificaria a classificação em uma das categorias de espécies ameaçadas da IUCN.

O número de espécies de cactáceas analisadas em estudos sobre variabilidade genética populacional até o presente é relativamente pequeno para propor um padrão geral para a família; apenas 30 espécies analisadas dentre cerca de 1500 (Figueiredo *et al.*, 2010). A maior parte das espécies investigadas mostra níveis relativamente altos de heterozigosidade e diversidade alélica, porém com muitos locos exibindo um único alelo em elevada frequência acompanhado de alelos raros (Figueiredo *et al.*, 2010). Por exemplo, a investigação da variabilidade genética utilizando marcadores aloenzimáticos em populações das espécies *Facheiroa squamosa* (Gürke) P. J. Braun & Esteves, *Pilosocereus machrisii* (E.Y. Dawson) Backeberg, *Pilosocereus aureispinus* (Buining & Brederoo) F. Ritter, *Pilosocereus vilaboensis* (Diers & Esteves) P.J. Braun e *Praerocereus euchlorus* (F.A.C. Weber ex K. Schum.) N.P. Taylor revelaram níveis relativamente elevados de variação genética (Moraes *et al.*, 2005). Uma vez que a maior parte dessas espécies é formada por populações pequenas e fragmentadas, esses resultados contrariam as expectativas sobre o nível esperado de variabilidade (Young *et*

al., 1993; Figueiredo *et al.*, 2010). Em *Pilosocereus tillianus* Gruber & Schaltz, uma espécie endêmica e restrita a uma pequena porção dos Andes Venezuelanos, a análise com marcadores aloenzimáticos também revelou uma alta diversidade genética, sugerindo que mesmo com esse padrão de distribuição a espécie não está sofrendo perda de diversidade genética (Figueiredo *et al.*, 2010).

Em contraposição aos elevados índices de variabilidade genética encontrados por Moraes *et al.* (2005) e Figueiredo *et al.* (2010), Clark-Tapia *et al.* (2005) encontraram baixa variação aloenzimática em populações de *Stenocereus eruca* (Brandege) A.C. Gibson & K.E. Horak, uma espécie endêmica do Deserto de Sonora. Similarmente, Lambert *et al.* (2006) observou menor variação genética em 12 locos aloenzimáticos analisados em espécies do gênero *Melocactus* Link & Otto, em comparação com os níveis observados no gênero *Discocactus* Pfeiffer, um cacto também globoso com ocorrência na mesma área de *Melocactus* e ocupando habitats semelhantes.

Entre os táxons de cactáceas com padrão de distribuição naturalmente fragmentada no leste e centro-oeste do Brasil, o gênero *Pilosocereus* Byles & G.D. Rowley abriga 44 espécies de cactos colunares subdivididas em dois subgêneros: *Gounellea*, com somente três espécies [*Pilosocereus freweni* Zappi & N. P. Taylor, *Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber) Byles & G.D. Rowley e *Pilosocereus tuberculatus* (Werderm.) Byles & G.D. Rowley], e *Pilosocereus*. Este, por sua vez, é subdividido em cinco grupos informais (*P. ARRABIDAE*, *P. PENTAEDROPHORUS*, *P. LEUCOCEPHALUS*, *P. AURISSETUS* e *P. PIAUHIENSIS*) com base em descontinuidades morfológicas e na distribuição geográfica das espécies (Taylor & Zappi, 2004; Hunt *et al.*, 2006).

As espécies do grupo *PILOSOCEREUS AURISSETUS* [*Pilosocereus aureispinus* (Buining & Brederoo) F. Ritter, *Pilosocereus aurisetus* (Werderm.) Byles & G.D. Rowley, *Pilosocereus bohlei* Hofacker, *Pilosocereus jauruensis* (Buining & Brederoo) P.J. Braun, *Pilosocereus machrisii* (E.Y. Dawson) Backeberg, *Pilosocereus parvus* (Diers & Esteves) P.J. Braun, *Pilosocereus pusillibaccatus* P.J. Braun & Esteves, *Pilosocereus vilaboensis* (Diers & Esteves) P.J. Braun] possuem distribuição geográfica naturalmente fragmentada (figura 1), ocorrendo em manchas de afloramentos rochosos ou sobre topo de montanhas espalhadas no Cerrado, geralmente associadas à vegetação de campos rupestres (Zappi, 1994).

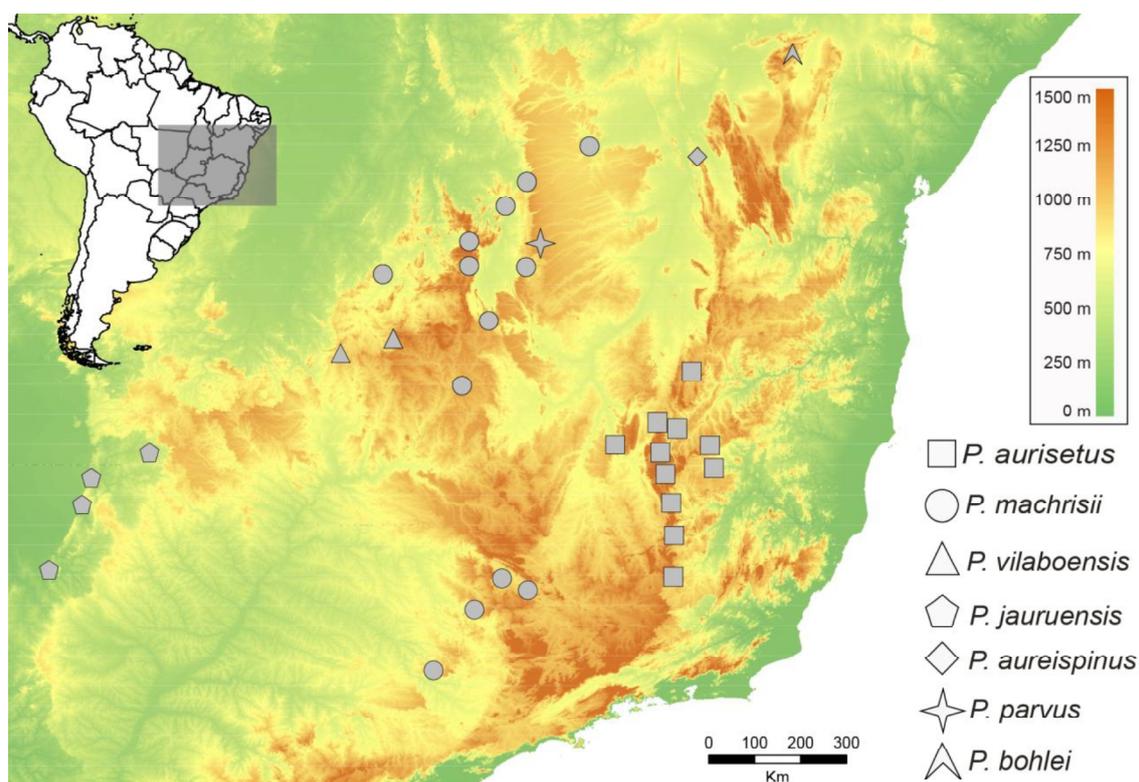


Figura 1. – Distribuição de populações das espécies do grupo *P. AURISSETUS*.

Dentre as espécies do grupo *P. AURISSETUS*, *P. aureispinus* (figura 2) é a única inserida na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN, categoria vulnerável

(VU) (Zappi *et al.*, 2013). A distribuição de *P. aureispinus* é conhecida apenas em uma área de aproximadamente 300 km² na margem leste do Rio São Francisco, nos municípios de Ibotirama e Oliveira dos Brejinhos na Bahia (figura 3) (Zappi, 1994). A sua classificação como espécie ameaçada é justificada pela sua distribuição restrita, ameaça de perda de habitat pela proximidade com rodovias e ocorrência de fogo.

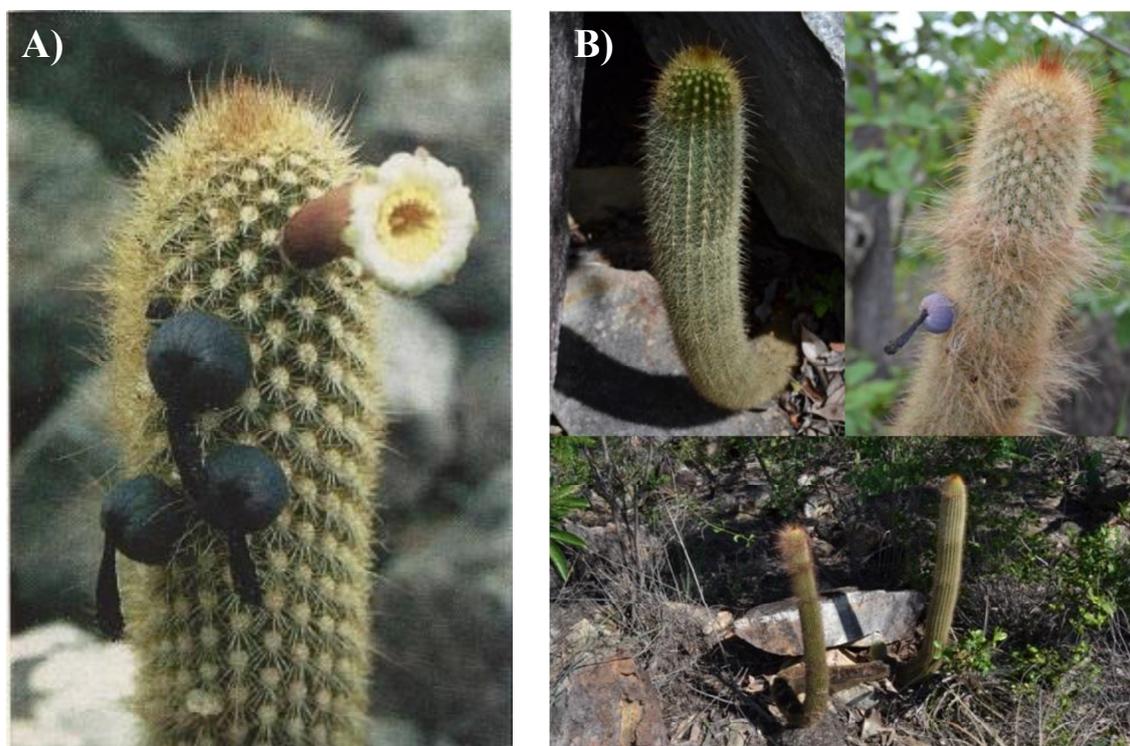


Figura 2. – A) Foco na flor e nos frutos de *P. aureispinus*. Fonte: imagem retirada do artigo de descrição da espécie (Buining & Brederoo, 1974). B) Indivíduos da espécie *P. aureispinus* na localidade de Oliveira dos Brejinhos – BA. Fonte: arquivo pessoal.

Os resultados de estudos de variabilidade genética em cactáceas até o momento sugerem que condição endêmica e distribuição geográfica restrita não necessariamente promovem uma baixa diversidade genética nesse grupo de plantas. Porém, são

necessários estudos adicionais de cactáceas com distribuição restrita (Figueiredo *et al.*, 2010) para confirmar este padrão em cactáceas. Estudos de variabilidade genética em *P. aureispinus*, propostos neste trabalho, contribuíram para ajudar a compreender não somente o status de conservação da espécie e seu atual risco de extinção, como também forneceram dados para explorar quais fatores históricos e ecológicos mantêm a variabilidade genética nessas plantas.

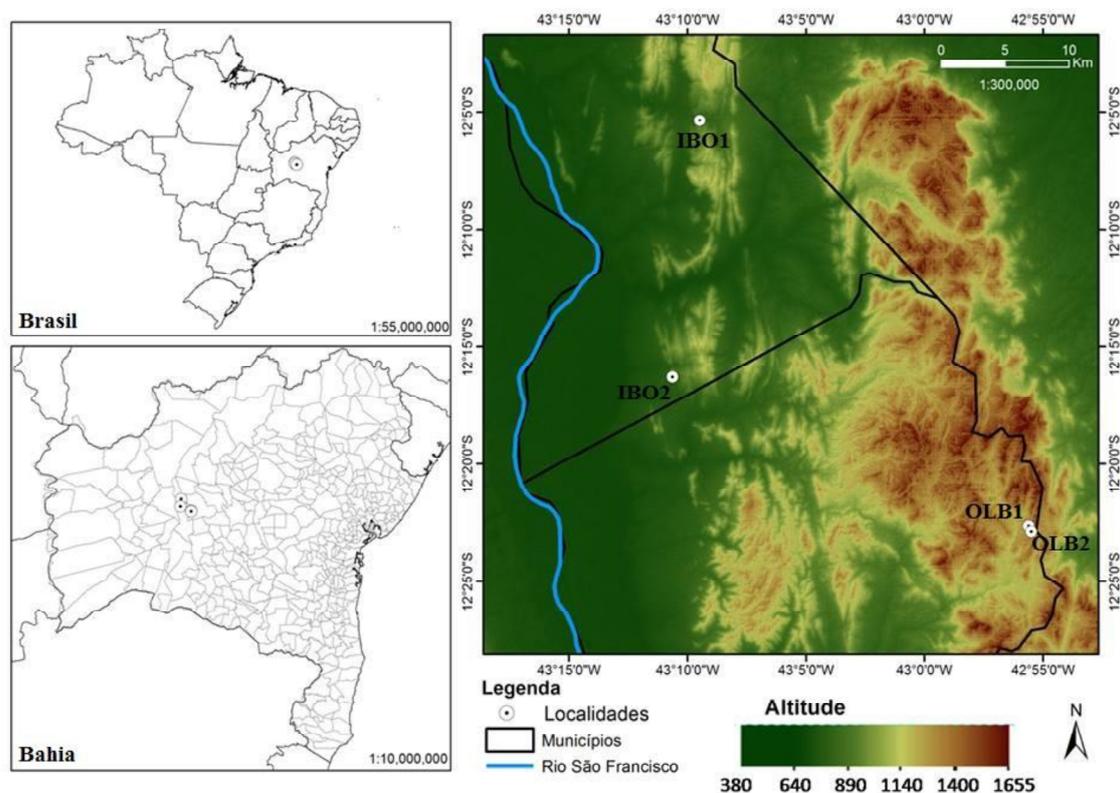


Figura 3. – Distribuição geográfica das populações de *P. aureispinus* conhecidas e analisadas neste trabalho.

2. Objetivos

O objetivo do presente estudo foi avaliar a estrutura genética das populações atualmente conhecidas de *Pilosocereus aureispinus* e explorar quais fatores ecológicos moldam a distribuição de sua diversidade genética; esse táxon foi utilizado com a finalidade de compor e expandir o repertório de estudos de variabilidade genética e estrutura populacional em Cactaceae, em especial no que diz respeito às espécies com distribuição restrita.

3. Metodologia

3.1. Caracterização da Espécie

Pilosocereus aureispinus tem como localidade tipo o município de Ibotirama – BA, na Serra da Barriguda, a 450m de altitude e localizado próximo da margem direita do Rio São Francisco. De acordo com as populações atualmente consideradas (ver figuras 1 e 3) como pertencentes à espécie, *P. aureispinus* é um cacto colunar com hábitos arbustivos que possui cladódios eretos ramificados somente na altura do solo, podendo chegar até dois metros de altura. A epiderme possui coloração verde escura com espinhos translúcidos na base, variando de dourado a ferruginoso, apresentando a presença de longos tricomas brancos em suas aréolas. As flores são robustas e possuem coloração variando de rosa a branco, com antese noturna. Essas características florais são compatíveis com a síndrome de polinização por morcegos, sendo que aves e abelhas também são consideradas possíveis polinizadores. Os frutos apresentam coloração avermelhada a roxo escuro, com polpa esbranquiçada na qual estão imersas pequenas sementes de coloração marrom escuro a preto. As sementes de *P. aureispinus* possuem características peculiares como forma bem alongada e células da testa cônicas, podendo estar relacionadas com dispersão por formigas, as quais são amplamente abundantes na região onde as populações ocorrem (Zappi, 1994).

3.2. Caracterização da Área de Ocorrência

Analisando dados históricos do Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMEP) do satélite de Bom Jesus da Lapa, por um período de 15 anos (dos anos de 2000 a 2015), verifica-se que chove 5,9 dias ao mês, com período de chuvas concentrado nos meses de novembro, dezembro e janeiro. Os meses de maio, junho e julho configuram a época seca, caracterizando a sazonalidade típica da região, com estações seca e chuvosa bem demarcadas. A média de precipitação mensal é de 63,99mm, com média anual inferior a 800mm. A temperatura mínima média é de 19,1 °C e temperatura máxima média é de 31,4 °C (INMET, 1992). Embora essa região esteja nos limites dos domínios Caatinga e Cerrado, associada a uma vegetação de campos rupestres, essas características estão dentro dos parâmetros climáticos para o domínio Caatinga, o qual é caracterizado por um clima quente e semi-árido, fortemente sazonal, com menos de 1000mm de precipitação anual (Leal *et al.*, 2003).

Para uma melhor compreensão do domínio Caatinga, o qual apresenta uma grande variedade fitofisionômica, foi criada uma proposta de divisão em oito ecorregiões, baseadas em similaridades tanto geomorfológicas como bióticas. A ecorregião que se encontra *P. aureispinus* é a denominada Depressão Sertaneja Meridional, a qual é a segunda ecorregião mais ameaçada; essa grande ameaça é devido principalmente à ação antrópica e por possuir poucas áreas protegidas (em número e área total). Na região mais próxima das localidades em que há registro de ocorrência da espécie, existe apenas uma área protegida, a Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) “Fazenda Pé da Serra”, uma área de 1259,20 ha no município de Ibotirama (anexo 2) (Velloso *et al.*, 2002).

3.3.Amostragem Populacional

Foram coletados tecidos da raiz de 91 indivíduos de *P. aureispinus*, variando de 12 a 28 indivíduos amostrados por localidade. Foi mantida uma distância mínima de 10 metros entre cada indivíduo com o intuito de minimizar a probabilidade de amostrar clones. As viagens de campo foram realizadas pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Diversidade Genética e Evolução (LaGEvol) da UFSCar, nos anos de 2009, 2011 e 2014. O material biológico foi higienizado, acondicionado em criotubos de 2mL e armazenados em um ultrafreezer -80°C. As informações sobre as amostras e localidades estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. – Localidades onde foram realizadas coletas de material biológico de indivíduos da espécie *P. aureispinus*.

Município	Código	Coordenadas Geográficas	Data Coleta	Número indivíduos
Ibotirama	IBO1	S12°05' W43°09'	30/01/2009	24
Ibotirama	IBO2	S12°16' W43°10'	08/01/2011	27
Oliveira dos Brejinhos	OLB1	S12°22' W42°55'	09/01/2011	28
Oliveira dos Brejinhos	OLB2	S12°22' W42°55'	10/01/2014	12

3.4.Extração de DNA

Os tecidos radiculares de cada amostra foram macerados em nitrogênio líquido para o rompimento das paredes celulares. A extração do DNA foi realizada com o kit

comercial Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo as alterações descritas por Helsen *et al.* (2007) para remoção mais eficiente dos polissacarídeos. As amostras de DNA foram submetidas a corridas eletroforéticas em géis de agarose 1% para quantificação, a partir da comparação da intensidade das bandas geradas com as do marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

3.5.Locos de DNA microsatélite

Todos os 91 indivíduos foram genotipados em oito locos de DNA microsatélite, os quais foram previamente isolados e descritos para a espécie *P. machrisii* por Perez *et al.* (2011). A amplificação desses locos foi testada com sucesso para outras espécies do grupo *P. AURISSETUS* por Moraes *et al.* (2012), incluindo *P. aureispinus*.

Os locos foram amplificados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), em reações com volume de 10µL, contendo: 1µL de DNA, 1x de tampão padrão para PCR (Promega), 0,2mM de cada dNTP, 0,25µM de cada um dos iniciadores, 0,5U de Taq DNA polimerase (Promega) e 1,5mM de MgCl₂ (Promega). As condições físicas empregadas no termociclador foram: 94°C por 2 minutos; 35x (94°C por 40 segundos, temperatura de hibridização específica por 40 segundos, 72°C por 40 segundos); 72°C por 10 minutos. A relação dos oito locos de DNA microsatélite, as unidades repetitivas, as sequencias dos iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R) e as temperaturas de hibridização padronizadas (*Ta*) para cada loco estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Relação dos oito locos de DNA microssatélite utilizados para as genotipagens em *P. aureispinus*, unidades repetitivas, sequências dos iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R), e temperaturas de hibridização padronizadas (*Ta*).

Loco	Unidade Repetitiva	Sequência do Iniciador	Ta(° C)
<i>Pmac082</i>	(GAG) ₅ (GAA) ₂	F: GTAAAAGAGGAGGATGGAGAGG	56
	(GAG) ₂ GAA(GAG) ₂	R: CTTCTTCTTGCTAGGTTTCTCG	
<i>Pmac084</i>	(AG) ₉ CG(AG) ₂	F: CATAAATTGCAGAAATGAGGAC	52
		R: AGGTAAACCGCTAACTCGATG	
<i>Pmac102</i>	(AG) ₉	F: TCTATAAGTGCCGATGGATGC	59
		R: CACACCTCACTCCCAACCTC	
<i>Pmac128</i>	(TC) ₅ TT(TC) ₁₀ (AC) ₁₀	F: GTGTTGATTGTA CTCTTCAG	58
		R: CTAACCCTTTGTATACATGC	
<i>Pmac130</i>	(AG) ₇ CA(AG) ₁₂	F: GAGGTGCCAATAAATCG	55
		R: TGTCACGCAATCTTGAACC	
<i>Pmac135</i>	(TC) ₅ TG(TC) ₁₂	F: ACCAGAATGAGCTCAGCTGTAG	54
		R: CCTAGCTAGCAGAATCAGAGTGAAGAC	
<i>Pmac146</i>	(AG) ₂₀	F: ACCCGACATCCC ACTTGTAG	60
		R: TAGTCTGAAACGGAGCAAGG	
<i>Pmac149</i>	(TC) ₁₉	F: TTCATCCTGCTTTTGAAGTTTG	59
		R: TGATGGATTAGGATTGACCTG	

Para a genotipagem, os produtos da PCR foram submetidos a corridas eletroforéticas em géis de poliacrilamida desnaturantes 6%, que é útil para separar fragmentos pequenos de 1-500 pares de base (pb), possibilitando a identificação de alelos. Com o intuito de evitar possíveis erros de genotipagem devido a diferenças

decorrentes da corrida eletroforética e facilitar a identificação de alelos, para cada loco tomou-se a precaução de incluir indivíduos de todas as populações em um mesmo gel. A leitura foi realizada por revelação com nitrato de prata, utilizando o protocolo descrito por Creste *et al.* (2001), acompanhado de registro fotográfico. Para a amostra da localidade IBO1, a qual esses mesmo locos de DNA microssatélite foram genotipados através de sequenciador automático (Moraes *et al.*, 2012), foi verificado a correspondência dos alelos entre os dois métodos, assegurando a reprodutibilidade dos dados genotípicos aqui coletados.

3.6. Validação dos dados genotípicos

Os genótipos dos indivíduos de *P. aureispinus* foram checados com o programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (van Oosterhout *et al.* 2004) com a finalidade de verificar possíveis erros de genotipagem, ocorrência de alelos nulos, *allele drop-out* e bandas *stutter*. A ocorrência de locos possivelmente ligados foi verificada pelo programa FSTAT (Goudet, 1995) através da análise de desequilíbrio de ligação (DL). A significância estatística dos testes de desequilíbrio foi realizada após a aplicação de correção sequencial de Bonferroni para múltiplos testes com $\alpha = 0,05$ (Rice, 1989). Para os locos que apresentaram presença de alelos nulos, foi realizada a correção das frequências alélicas utilizando o programa FreeNA a fim de avaliar desvios nas estimativas de parâmetros populacionais causados por alelos nulos (Chapuis & Estoup, 2007).

3.7. Diversidade Genética

Os parâmetros de diversidade genética, como estimativa de frequências alélicas, número de alelos por loco (A), número efetivo de alelos (n_E), riqueza alélica (A_R), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) foram estimados utilizando o programa FSTAT (Goudet, 1995) e o programa GENEALEX 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Testes de desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) também foram realizados e o nível de endogamia dentro das populações foi obtido a partir dos desvios médios em relação às proporções do EHW e pelo cálculo do coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) da estatística- F de Wright (Wright, 1951). Foi realizada a correção sequencial de Bonferroni para múltiplos testes com $\alpha = 0,05$ (Rice, 1979) sobre os valores de P dos testes de EHW e valores de F_{IS} .

3.8. Estrutura Populacional

O nível de estruturação genética das populações foi avaliado por meio do índice de fixação F_{ST} , calculado a partir do estimador θ (Weir & Cockerham, 1984) utilizando o programa FSTAT (Goudet, 1995). Devido à limitação desse parâmetro quando se utiliza marcadores altamente variáveis, também foi utilizada a estatística não enviesada G''_{ST} (Meirmans & Hedrick 2011), estimada pelo programa GENEALEX 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Esse programa também foi utilizado para estimar o número e frequência de alelos exclusivos em cada uma das populações.

A estrutura populacional também foi investigada a partir de uma análise Bayesiana implementada no programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000). Esta análise busca identificar o número mais provável de grupos de indivíduos intercruzantes

na amostra total (K) a partir da informação dos genótipos multilocos, descartando a informação geográfica dos indivíduos e buscando minimizar os desequilíbrios de ligação e desvios no EHW nos grupos inferidos. A análise também fornece uma atribuição (q) da proporção do genótipo multiloco individual pertencente a cada grupo genético, permitindo analisar a proporção de mistura da composição genética dentro de cada população geográfica. A quantidade mais provável de grupos genéticos (K) foi estimada a partir dos resultados de dez simulações simultâneas independentes, permutados com o programa CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg, 2007). Para cada simulação, 1.100.000 interações foram realizadas, sendo descartadas as 100.000 interações iniciais (*burn-in*), com o número de grupos variando de um a cinco de acordo com o número de populações amostradas. Para identificação do K mais provável, foi utilizada a estatística ΔK proposta por Evanno *et al.* (2005) e a probabilidade posterior [$\ln P(D)$] dos diferentes valores de K testados. A representação gráfica dos resultados foi realizada com o programa DISTRUCT (Rosenberg, 2004).

Para complementar a análise de estruturação, as relações genéticas entre as populações foram avaliadas através de uma análise de coordenada principal (PCoA) utilizando os valores de F_{ST} pareado das localidades, no programa GENEALX 6.5 (Peakall e Smouse, 2012).

3.9. Detecção de Migrantes

A presença de indivíduos migrantes nas localidades analisadas foi investigada a partir do método Bayesiano implementado no programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000). As informações geográficas foram incorporadas na análise e o número de

grupos foi fixado de acordo com o número de localidades ($K=4$). Nesta análise estima-se a probabilidade (q) dos indivíduos pertencerem à localidade onde foram coletados, de serem migrantes ou descendentes de migrantes. Indivíduos com um valor de q abaixo de 0,5 para a população onde foi amostrado são considerados migrantes ou descendentes de migrantes, e a provável população fonte é determinada pelo maior valor de q entre as populações amostradas.

Diferente da análise implementada no STRUCTURE, uma segunda análise Bayesiana proposta por Cornuet *et al.* (1999) e implementada no programa GENECLASS2 (Piry *et al.*, 2004) foi utilizada para detectar migrantes. Primeiramente, foi estimada a probabilidade de um indivíduo ser migrante de uma população não amostrada (L_{home}), considerando a incerteza de todas as populações fonte de migrantes estarem na análise. Em uma segunda etapa, a probabilidade de um indivíduo ser migrante de uma população amostrada foi estimada pela razão entre a verossimilhança de um indivíduo pertencer à população onde foi amostrado e o valor máximo de verossimilhança desse indivíduo entre as populações amostradas (L_{home}/L_{max}). Para a realização de ambas as análises foi utilizado o critério Bayesiano definido por Rannala e Mountain (1997) e o método de Paetkau *et al.* (2004) a partir de 10.000 reamostragens com o parâmetro alpha, que determina a probabilidade de ocorrência de erros do tipo I, fixado em 0,01.

3.10. Regiões do Genoma do Cloroplasto

A variação nucleotídica em quatro regiões não-codificadoras do genoma plastidial (*trnS-trnG*, *trnT-trnL*, *petL-psbE* e *psbD-trnT*) foi avaliada pelo sequenciamento dessas regiões em cinco indivíduos de cada localidade. Essas regiões

foram apontadas em estudos anteriores como altamente informativas para as espécies do grupo *P. AURISSETUS* (Bonatelli *et al.* 2013; Dias & Moraes, 2013).

As seqüências foram amplificadas por PCR e as informações sobre temperatura de hibridização e iniciadores para as regiões estão apresentados na tabela 3. A amplificação do espaçador intergênico *trnS-trnG* foi realizada utilizando dois conjuntos de iniciadores descritos por Shaw *et al.* (2005) e Bonatelli *et al.* (2013). As reações foram realizadas em um volume de 25µL, contendo: 1µL de DNA, 1x de tampão padrão para PCR (Promega), 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ (Promega), 0,1 µM de cada iniciador e 1U de *Taq* DNA Polimerase (Promega).

O espaçador intergênico *trnT-trnL* foi amplificado utilizando os iniciadores descritos por Taberlet *et al.* (1991) em reações com volume de 25µL, contendo: 1µL de DNA, 1x tampão padrão para PCR (Promega), 200 µL de cada dNTP, 3mM de MgCl₂ (Promega), 0,1 µM de cada iniciador e 1,25 U de *Taq* DNA Polimerase (Promega).

Os espaçadores intergênicos *petL-psbE* e *psbD-trnT* foram amplificados utilizando os iniciadores descritos por Shaw *et al.* (2007), em reações com volume de 25 µL, contendo: 1 µL de DNA, 1x tampão padrão para PCR (Promega), 200 µL de cada dNTP, 3mM de MgCl₂ (Promega), 0,1 µM de cada iniciador e 1U de *Taq* DNA Polimerase (Promega).

Para as quatro regiões, as condições físicas empregadas no termociclador foram aquelas descritas por Shaw *et al.* (2005, 2007): 95°C por 1 minuto, 30x (95°C por 1 minuto, temperatura de hibridização por 1 minuto), 65°C por 4 minutos e 65°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP-IT (GE Healthcare) e 20µL deste material foram enviados para sequenciamento à empresa Macrogen, por meio do sequenciador ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster

City, California, USA) utilizando o kit de sequenciamento Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Os cromatogramas foram visualizados e editados manualmente no programa Geneious 7.1.3 (Biomatters), o qual permite a formação de contigs, avaliação da qualidade dos picos obtidos e resolução de possíveis incongruências.

Tabela 3. – Iniciadores para a amplificação e sequenciamento das regiões analisadas no presente estudo, com suas respectivas sequencias e autores.

cpDNA	Iniciador e Sequência	Ta(°C)	Referência
<i>trnS-trnG</i>	trnS^{GCU} : AGATAGGGATTTCGAACCCTCGGT		Shaw <i>et al.</i> (2005)
	SGRev2 : TCCGCTCATTAGCTCTCCTC	65	Bonatelli <i>et al.</i> (2013)
	SGFwd2 : CACCCATGGTTCCCATTAGA		Shaw <i>et al.</i> (2005)
	5'trnG2S : GCGGGTATAGTTTAGTGGTAAAA		Bonatelli <i>et al.</i> (2013)
<i>trnT-trnL</i>	trnT^{UGU} : CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT		Taberlet <i>et al.</i> (1991)
	5'trnL^{UAA} : TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC	50	
<i>petL-psbE</i>	petL : AGT AGA AAA CCG AAA TAA CTA GTT A		Shaw <i>et al.</i> (2007)
	psbE : TAT CGA ATA CTG GTA ATA ATA TCA GC	50	
<i>psbD-trnT</i>	trnD^{GUC} : ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC		Shaw <i>et al.</i> (2005)
	trnT^{GGR} : CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG)	50	

4. Resultados

4.1. Validação dos Dados Genotípicos

Os genótipos (figura 4) verificados no MICRO-CHECKER apontou a presença de alelos nulos apenas para os locos *Pmac135* e *Pmac146* em todas as localidades, com frequência de 21% e 31%, respectivamente. Através da análise de desequilíbrio de ligação, verificou-se que os locos *Pmac135* e o *Pmac146* também apresentaram DL com significância estatística após a correção sequencial de Bonferroni. Embora os valores de F_{ST} para esses dois locos não diferiram significativamente entre as estimativas com as frequências alélicas originais e corrigidas, conforme verificado com o programa FreeNA, o coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) nesses locos foi bastante discrepante dos valores para o restante dos locos (anexo 3), causando um aumento importante nos valores médios de F_{IS} para as populações analisadas. Dessa maneira, optamos por retirar esses dois locos das análises de diversidade genética e estrutura populacional a fim de evitar distorções importantes na estimativa desses parâmetros.

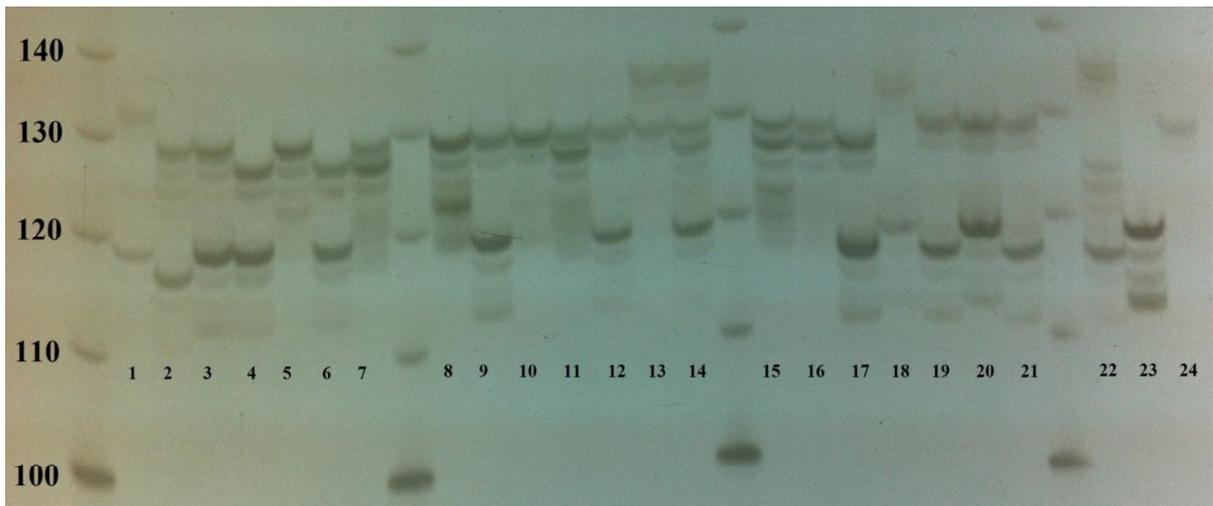


Figura 4. – Exemplo de genotipagem obtida a partir da leitura de um gel de poli-acrilamida desnaturante 6%, com as bandas geradas pelo marcador molecular DNA Ladder 10 pb (Invitrogen) e os 24 indivíduos da população IBO1 para o loco *Pmac* 128. Indivíduo 5 e 10 foram considerados homocigotos, e os indivíduos 6 e 7 foram considerados heterocigotos, por exemplo.

4.2. Diversidade Genética

Os níveis de diversidade obtidos (anexo 3 e tabela 4) mostraram que o número médio de alelos (A) variou de 3,8 em IBO1 a 4,5 em IBO2; o número efetivo de alelos (n_E) variou de 2,1 em OLB2 a 2,7 em OLB; a riqueza alélica (A_R) variou de 3,2 em IBO1 a 4,4 em IBO2; a heterocigotidade média observada (H_O) variou de 0,358 em IBO1 a 0,44 em IBO2; a heterocigotidade média esperada (H_E) variou de 0,471 em IBO1 a 0,553 em OLB. Não foram encontrados em nenhuma população valores significativos de F_{IS} e desvios significativos em relação às proporções do EHW após a correção sequencial de Bonferroni.

Tabela 4. Média dos parâmetros de variabilidade genética das quatro localidades analisadas de *P. aureispinus*: N, número médio de indivíduos analisados; *A*, número médio de alelos por loco; n_E , número efetivo de alelos; H_O , heterozigosidade média observada; H_E , heterozigosidade média esperada; A_R , riqueza alélica; F_{IS} , valor do coeficiente de endocruzamento.

Loco	N	<i>A</i>	n_E	A_R	H_O	H_E	F_{IS}
IBO1	23,8	3,8	2,2	3,2	0,358	0,471	0,011
IBO2	26,8	4,5	2,5	4,4	0,382	0,519	0,004
OLB1	27,2	4	2,7	3,9	0,499	0,553	-0,082
OLB2	11,7	4,3	2,6	4,0	0,519	0,494	-0,005

4.3.Estruturação Populacional

Os valores do índice de fixação F_{ST} para as quatro localidades de *P. aureispinus* obtidos pelo estimador θ (Weir & Cockerham, 1984) foi de 0,071. As estimativas por loco variaram entre 0,052 (*Pmac130*) a 0,097 (*Pmac149*). A estimativa do índice de fixação G''_{ST} (Meirmans & Hedrick, 2011) resultou em um valor médio de 0,132 e as estimativas por loco variaram de 0,061 (*Pmac82*) a 0,295 (*Pmac128*) (tabela 5).

Tabela 5. Valores de F_{ST} e G''_{ST} por loco e as significâncias estatísticas respectivas.

Loco	F_{ST}	P	G''_{ST}	P
<i>Pmac82</i>	0,063	0,001	0,061	0,008
<i>Pmac84</i>	0,055	0,001	0,112	0,018
<i>Pmac102</i>	0,072	0,001	0,068	0,006
<i>Pmac128</i>	0,082	0,001	0,295	0,001
<i>Pmac130</i>	0,052	0,001	0,237	0,001
<i>Pmac149</i>	0,097	0,001	0,248	0,001
Total	0,071	0,001	0,132	0,001

Alelos exclusivos foram observados em baixas frequências nas quatro localidades estudadas (tabela 6), variando de 1,8% a 8,3%. As localidades IBO1 e IBO2 apresentaram um alelo exclusivo cada no loco *Pmac128*, a população OLB1 apresentou dois alelos (*Pmac82* e *Pmac128*) e a população OLB2 também dois alelos exclusivos (*Pmac102* e *Pmac128*).

Tabela 6. – Lista de alelos exclusivos por população/loco e suas respectivas frequências.

População (Loco)	Alelo	Frequência
IBO1 (<i>Pmac128</i>)	122	0,042
IBO2 (<i>Pmac128</i>)	120	0,037
OLB1 (<i>Pmac82</i>)	96	0,071
OLB1 (<i>Pmac128</i>)	134	0,018
OLB2 (<i>Pmac102</i>)	104	0,083
OLB2 (<i>Pmac128</i>)	124	0,083

A análise Bayesiana do programa STRUCTURE a partir do cálculo ΔK apontou uma estruturação em quatro grupos principais ($K=4$). Porém, dado que a estatística ΔK não é capaz de avaliar o resultado de $K=1$, a validade dessa hipótese também foi avaliada através da probabilidade posterior $\ln P(D)$ dos diferentes valores de K testados. Essa abordagem apontou que $K=1$ é a hipótese mais provável para explicar a distribuição da variação genética nas quatro populações analisadas (figura 5). Dessa forma, é possível inferir que as quatro localidades analisadas formam apenas um grupo genético com baixa diferenciação entre as populações geográficas, conforme apontado pelo valor de F_{ST} .

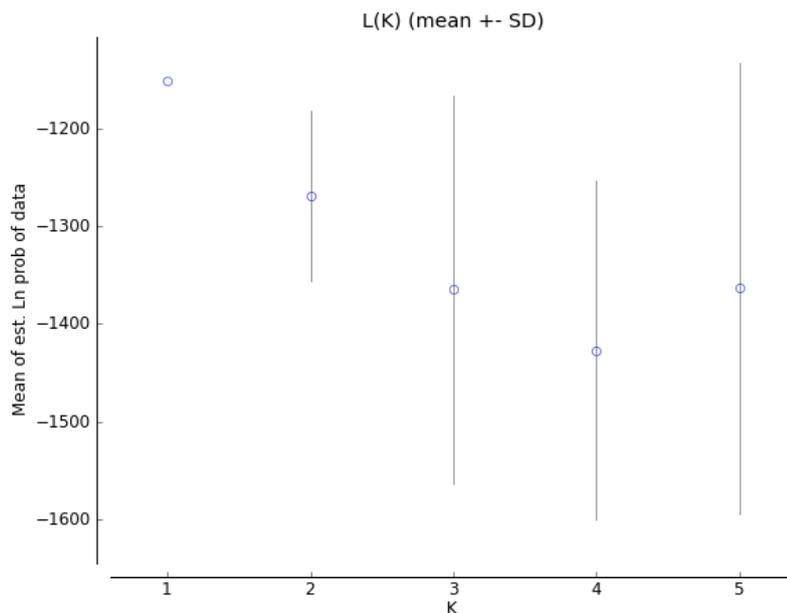


Figura 5. Resultado gráfico da análise para identificação do valor mais provável de K a partir da estatística $\ln P(D)$ calculado por meio de 10 replicações.

A análise de coordenada principal PCoA apresentou 75,31% da variação total explicada pelos dois primeiros eixos (eixo 1 = 48,06% e eixo 2 = 27,24%), apontando baixa diferenciação genética entre as localidades (figura 6).

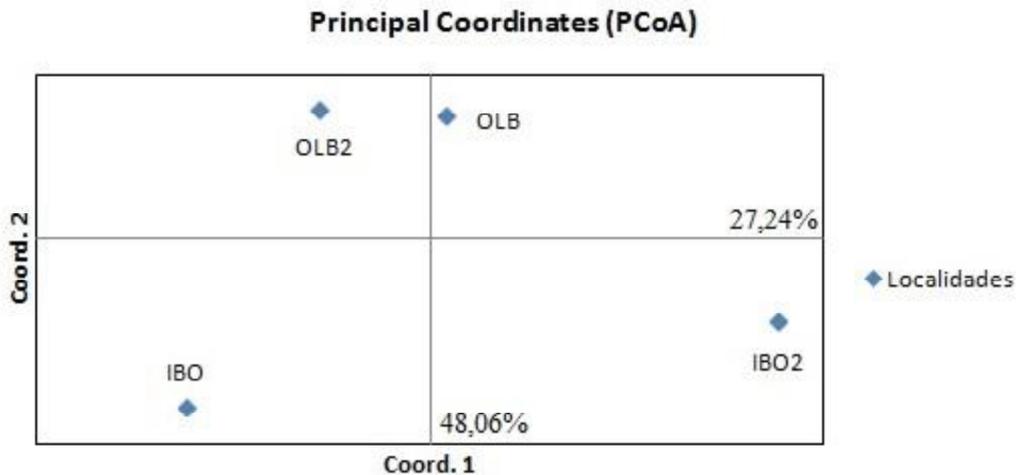


Figura 6. – PCoA a partir de valores de F_{ST} mostrando a divergência entre as localidades (75,31%) da variação nos dois eixos representados).

4.4. Detecção de Migrantes

As análises de identificação de migrantes realizadas com o programa STRUCTURE não resultaram na detecção de indivíduos migrantes. Nas análises implementadas no programa GENECLASS2, quatro indivíduos foram identificados quando utilizada a probabilidade L_{home} , sendo: um possível migrante na população IBO1 (S21A17) oriundo da população OLB1, um possível migrante na população IBO2 (S49A21) oriundo de IBO1, e dois indivíduos na população OLB2 (S118A1 e S119A2), oriundos de IBO2 e população não amostrada, respectivamente. Quando utilizada a probabilidade L_{home}/L_{max} , foram identificados três possíveis migrantes, sendo um indivíduo na população IBO1 (S21A20) oriundo da população OLB1 e dois indivíduos

na população IBO2 oriundos de IBO1 (S49A1) e de OLB1 (S49A2). As informações estão sintetizadas na tabela 7.

Tabela 7. - Resultados da análise de detecção de migrantes. São apresentadas as populações amostradas e as prováveis populações-fonte de acordo com os programas STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2009) e GENECLASS (Piry *et al.*, 2004).

Indivíduo migrante	População amostrada	GENECLASS	STRUCTURE
		Provável pop-fonte	Provável pop-fonte
S21A17	IBO1	OLB1	-
S21A20	IBO1	OLB1	-
S49A1	IBO2	IBO1	-
S49A2	IBO2	OLB1	-
S118A1	OLB2	IBO2	-
S118A2	OLB2	?	-

? população não amostrada.

4.5.Dados do Genoma Cloroplastidial

Embora as regiões escolhidas tenham sido identificadas como altamente informativas para as espécies do grupo *P. AURISSETUS*, os sequenciamentos aqui obtidos não detectaram variação em nenhuma das regiões estudadas no nível de espécie. As variações encontradas por Bonatelli *et al.* (2013) dizem respeito principalmente as diferenças entre a população de *P. aureispinus* (IBO1) e as populações das outras espécies relacionadas do grupo *P. AURISSETUS* para os segmentos *trnS-trnG* e *trnT-trnL*. Já a prospecção realizada por Dias & Moraes (2013) apontaram *petL-psbE* e

psbD-trnT como regiões altamente informativas; porém, o estudo incluiu apenas as espécies relacionadas *P. machrisii*, *P. aurisetus*, as quais possuem distribuição geográfica mais ampla dentro do grupo, e *P. vilaboensis*. A compreensão de como os mecanismos de dispersão atuam na diversidade da espécie não pode ser inferida por falta de variação haplotípica intrapopulacional.

5. Discussão

Os locos *Pmac135* e *Pmac146* foram retirados das análises realizadas nesse trabalho porque ambos apresentaram alta frequência de alelos nulos e DL com significância estatística. Trabalhos anteriores que utilizaram esses locos (Moraes *et al.*, 2012; Perez, M. F., 2012; Godoy, M. O., 2014) para espécies relacionadas do grupo *P. AURISSETUS* também experimentaram a mesma dificuldade para esses locos.

No estudo da espécie *P. jauruensis*, os locos *Pmac135* e *Pmac146* apresentaram alelos nulos na frequência de 22% e 25%, respectivamente (Godoy, M. O., 2014). No estudo da espécie *P. machrisii*, para a qual os locos foram descritos, o loco *Pmac135* foi descartado, pois apresentou ampliações consistentes apenas na região sul da distribuição da espécie; o loco *Pmac146* também apresentou alta frequência de alelos nulos em oito populações estudadas para essa espécie. Em estudo conduzido por Moraes *et al.* (2012) utilizando seis espécies do grupo *P. AURISSETUS*, a maior parte dos desvios do EHW foram devido a deficiência de heterozigotos também para os locos *Pmac135* e *Pmac146*.

Os valores de F_{ST} para cada loco, utilizando as frequências alélicas corrigidas pelo FreeNA, não diferiram se comparados aos valores originais. Verificou-se nesse trabalho que, quando todo o conjunto de genótipos para investigar a estrutura populacional foi utilizado (incluindo os locos *Pmac135* e *Pmac146*), além de alterar o F_{IS} médio das localidades estudadas, a estrutura populacional estimada pelo método de classificação Bayesiana foi superestimada.

Os resultados obtidos com os dados de seis locos indicaram baixa diferenciação genética entre as localidades e níveis altos de fluxo gênico recente em *P.*

aureispinus, verificados pelo baixo valor dos parâmetros F_{ST} e G''_{ST} (0,071 e 0,132, respectivamente) e pela baixa frequência de alelos exclusivos. Esses resultados apoiam a hipótese de que nem sempre espécies com distribuição restrita possuem um cenário de baixa diversidade genética. Contrastando com esses resultados, a espécie relacionada *P. machrisii*, a qual possui distribuição mais ampla dentro do grupo *P. AURISSETUS* apresentou um F_{ST} 0,357, sendo que das populações estudadas seis apresentaram alelos exclusivos em alta frequência, chegando a oito alelos exclusivos em uma única população. Esses resultados possibilitam identificar níveis baixos de fluxo gênico e a possível explicação dada pelo autor é que a distribuição atual de *P. machrisii* foi provavelmente formada por eventos de vicariância a partir de uma conexão maior entre as populações no passado (Perez, 2012).

Para outras espécies de cactáceas analisadas em trabalhos de estrutura populacional e diversidade genética, observa-se que o índice F_{ST} encontrado neste trabalho pode ser considerado baixo. Para *Lophocereus schottii* (Engelm.) Britton & Rose, por exemplo, um cacto colunar de distribuição ampla no México que abrange desde o noroeste de Sinaloa, oeste de Sonora e Baja Califórnia, o valor de F_{ST} encontrado utilizando marcadores moleculares isoenzimáticos foi 0,130 (Parker & Hamrick, 1992). Os autores explicam essa estruturação moderada através de reprodução clonal frequente em *L. schottii*, numa média de 58,8% de 34 plantas observadas em campo. Embora reprodução vegetativa seja reportada para *P. aureispinus* (Zappi, 1994), os dados obtidos evidenciam que a reprodução cruzada tem sido bastante eficiente na manutenção da diversidade genética, promovendo a baixa diferenciação entre as localidades.

Similarmente aos dados de Parker & Hamrick (1992), um estudo em *Melocactus curvispinus* Pfeiffer, um cacto globoso que ocorre na Venezuela, apresenta

um valor de F_{ST} também moderado, de 0,193 e que, em conjunto com deficiência de heterozigotos encontrada, Nassar *et al.* (2001) sugerem que esses dados são compatíveis com a hipótese de que plantas com sistemas de auto-cruzamento e cruzamento misto apresentam uma maior estruturação genética do que plantas com reprodução cruzada, devido ao fluxo gênico reduzido. Não há dados sobre fenologia de *P. aureispinus*, mas há evidências de que as espécies do grupo *P. AURISSETUS* são auto-incompatíveis (Zappi, 1994), explicando, em parte, não só a pouca estruturação encontrada, como também o nível de diversidade encontrada.

Os altos índices de diversidade genética observados neste trabalho ($A = 4,2$ e $H_E = 0,451$) são maiores do que os encontrados para espécies que apresentam o mesmo padrão de distribuição restrita. Por exemplo, Lambert *et al.* (2006) em estudo com *Melocactus paucispinus* G. Heimen & R. Paul e *Melocactus concinnus* Buining & Brederoo, espécies de cactáceas simpátricas endêmicas da Bahia, obtiveram $A = 1,0 - 1,6$ e $H_E = 0,000 - 0,123$ para *M. paucispinus*, e $A = 1,0 - 1,4$ e $H_E = 0,000 - 0,104$ para *M. concinnus*. Segundo os autores, esses resultados de baixa diversidade genética podem estar associados a efeitos gargalos recentes experimentados pelas populações, visto que elas ocorrem em áreas de distúrbio, geralmente próximas a rodovias, em áreas de agricultura ou extração de areia.

Em observação de campo, há registros que *P. aureispinus* ocorre em simpatria com cactáceas das espécies *Facheiroa squamosa* (Gürke) P.J. Braun & Esteves, *Melocactus zehntneri* (Britton & Rose) Luetzelb, *Leocereus bahiensis* Britton & Rose, *Tacinga inamoena* (K. Schum.) N.P. Taylor & Stuppy e *Pilosocereus pachycladus* F. Ritter, sem relatos de hibridação.

Outro estudo de um cacto endêmico dos Andes Venezuelanos, *Pilosocereus tillianus* Gruber & Schaltz, Figueiredo *et al.* (2010) encontraram índices de diversidade, embora relativamente altos, também menores do que os encontrados em *P. aureispinus*, com $A = 2,61$ e $H_E = 0,352$. Os autores levantam três possíveis hipóteses para explicar a elevada diversidade genética encontrada: (1) poliploidia; (2) dispersão e polinização mediadas principalmente por morcegos e aves; e (3) um cenário de especiação vicariante em que a atual distribuição geográfica restrita de *P. tillianus* representa um relicto de uma distribuição mais ampla no passado. Acreditamos que a segunda hipótese explica em grande parte, assim como em *P. tillianus*, o fluxo gênico acentuado encontrado entre as localidades de *P. aureispinus*, resultando em baixos valores de F_{ST} e F_{IS} e relativamente alto nível de diversidade genética.

Em estudo utilizando os mesmos marcadores microssatélites com seis espécies do grupo taxonômico *P. AURISSETUS* (*P. aureispinus*, *P. aurisetus*, *P. bohlei*, *P. jauruensis*, *P. machrisii*, *P. parvus*, *P. vilaboensis*), Moraes *et al.* (2012) tiveram índices de diversidade similares aos obtidos para *P. aureispinus* neste trabalho, com A variando de 2 a 12 alelos por locos e H_E variando de 0,03 (*P. bohlei*) a 0,91 (*P. aurisetus*). Em estudo anterior utilizando marcadores aloenzimáticos das espécies *Praecereus euchlorus*, *Pilosocereus machrisii*, *P. vilaboensis*, *P. aureispinus* e *Facheiroa squamosa*, Moraes *et al.* (2005), encontraram A variando de 2,34 a 3,33 e H_E variando de 0,266 a 0,401, índices menores aos obtidos para *P. aureispinus* neste trabalho.

Em contrapartida, Terry *et al.* (2012) em um estudo de *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem., uma cactácea endêmica do nordeste do México, utilizando marcadores microssatélites encontraram $A = 9,9$ e H_E variando de 0,631 a 0,911; os autores afirmam que esses valores são compatíveis com reprodução cruzada, e, em conjunto com o baixo valor de F_{ST} (0,05), sugerem evidência de altas taxas de fluxo gênico devido a eficiência

do polinizador. Embora os níveis de diversidade encontrados sejam relativamente maiores do que em *P. aureispinus*, essa diferença pode estar relacionada à amostragem em *A. asterias* (142 indivíduos de 5 localidades, contrastando com 91 indivíduos de 4 localidades). Além disso, os indivíduos de *A. asterias* estudados podem não refletir mudanças genéticas recentes, pois os autores afirmam que apenas indivíduos com flores foram amostrados, e devido às características de amadurecimento sexual da espécie podem ter germinado antes de 1980.

Dentre os padrões elencados por Jiménez-Mejías *et al.* (2015) para compreender a diversidade genética e diferenciação espacial em estudo de espécies de plantas com distribuição restrita nos Alpes mediterrâneos, a hipótese de que “populações espacialmente separadas revelam pouca divergência genética porque elas funcionam como uma metapopulação ou porque há fluxo gênico recente, e que a separação e/ou manutenção de fluxo gênico recente entre as populações pode neutralizar os efeitos de diferenciação, evitando efeitos gargalos, deriva genética e perda de diversidade genética” explicam em grande parte os resultados obtidos nesse trabalho. Essa hipótese é corroborada pelo valor de $K=1$ obtida a partir da análise implementada no STRUCTURE, mostrando que as quatro localidades constituem apenas um grupo genético. Os testes realizados para detectar migrantes também reforçam o acentuado fluxo gênico, pois a análise implementada no GENECLASS2 detectou quatro possíveis migrantes (tabela 4), indício de que há troca de indivíduos entre todas as localidades. Porém, devido à baixa estruturação, o STRUCTURE não foi capaz de detectá-los. As localidades amostradas neste trabalho estão há uma distância máxima relativamente pequena uma da outra, na média 25km. Embora pouco se saiba acerca da polinização de *P. aureispinus*, características da flor permitem deduzir que a espécie é polinizada por

morcegos, os quais conseguem se deslocar por distâncias como essas que separam as localidades estudadas.

Em estudo de modelagem de nicho conduzido por Bonatelli *et al.* (2014) para as espécies do grupo *P. AURISSETUS*, pode-se observar que durante os períodos interglaciais do Pleistoceno a área de ocorrência de *P. aureispinus* [que em conjunto com *P. bohlei*, está situada mais ao norte em comparação com as outras população do grupo (ver figura 1)] pode ter permanecido mais estável durante as alterações climáticas de retração e expansão das áreas secas nesse período. Como consequência, suas populações podem ter experimentado uma maior estabilidade demográfica que as outras espécies do grupo. Por estarem localizadas mais ao norte, podem não ter sofrido os mesmos ciclos de alterações climáticas e, caso as espécies tenham sofrido as mesmas interferências climáticas, as respostas podem ter sido bem variáveis (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). A elevada divergência de *P. aureispinus* detectada por Bonatelli *et al.* (2014) em relação às espécies relacionadas pode explicar, em parte, a alta diversidade genética encontrada neste estudo apesar de ser uma espécie microendêmica com distribuição restrita.

Os resultados obtidos adicionam ao conjunto de dados crescente sobre a variabilidade genética em Cactaceae, pois contrários às expectativas sobre condição endêmica e distribuição geográfica restrita, sugerem que, aparentemente, a família e principalmente cactos colunares são caracterizados por apresentar altos índices de diversidade genética. A partir da análise de estudos recentes e dos resultados obtidos neste trabalho, acreditamos que as localidades estudadas em *P. aureispinus* se comportam como uma única população, com acentuado fluxo gênico.

Ao que tudo indica, *Pilosocereus aureispinus* não está sofrendo os efeitos genéticos deletérios esperados para uma espécie com distribuição restrita. No entanto,

observando os critérios e subcritérios da IUCN para classificar táxons como ameaçados de extinção, propomos neste trabalho que a espécie seja considerada ameaçada de acordo com o critério B (subcritérios B1 e B2, condição a e b) e critério D, a saber:

Critério B (Amplitude da Distribuição Geográfica)

- B1 – Extensão da ocorrência: CR quando ocorre em menos 100km², EN quando menos 5000km² e VU quando menos 20000km²
- B2 – Área de ocupação: CR quando ocupa menos 10km², EN quando menos 500km² e VU quando menos 2000km²

E pelo menos duas das três condições:

(a) – Severamente fragmentada ou número de localidades: CR quando ocorre em uma localidade, EN quando em cinco ou menos e VU quando em 10 localidades ou menos.

(b) – Declínio observado, estimado, inferido ou projetado em: (i) extensão de ocorrência, (ii) área de ocupação, (iii) área, extensão e/ou qualidade do hábitat, (iv) número de localidades ou subpopulações e (v) número de indivíduos adultos.

(c) – Flutuações em: (i) extensão de ocupação, (ii) área de ocupação, (iii) número de localidades ou subpopulações e (iv) número de indivíduos adultos.

Critério D (População muito pequena ou restrita)

- D1 – número de indivíduos adultos: CR se existem menos de 50 indivíduos, EN se menos de 250 e VU se menos de 1000.
- D2 (apenas para categoria VU): área de ocupação restrita ou número de localidades com um futuro de ameaça plausível que pode levar o táxon para CR ou EX em um curto período de tempo.

Embora seja possível que sua distribuição seja mais ampla (Taylor & Zappi, 1994), caso não existam outras localidades de ocorrência além das conhecidas,

Pilosocereus aureispinus deve ser considerado ameaçada (EN) de acordo com os itens B1+B2ab(ii, iii, iv)+D1.

6. Conclusão

Ao observar os valores de F_{ST} e G''_{ST} (0,071 e 0,132) e os resultados das análises de estruturação genética ($K=1$), pode-se verificar que as localidades atualmente conhecidas de *P. aureispinus* apresentam baixa estruturação genética e se comportam como uma única população. A elevada diversidade genética encontrada ($A = 4,2$ e $H_E = 0,451$) indica que a polinização (provavelmente realizada por morcegos) é eficiente e promove o fluxo gênico entre as localidades. O fluxo gênico inferido também é corroborado pela análise de migrantes, que identificou quatro possíveis indivíduos oriundos de outra localidade.

A investigação sobre a estrutura genética de *P. aureispinus* amplia o repertório de estudos de variabilidade genética e estrutura populacional em Cactaceae, em especial no que diz respeito a espécies com distribuição restrita, evidenciando que espécies com essas características não necessariamente apresentam perda de diversidade genética e elevada estruturação; é necessário avaliar, nesses casos, também os fatores ecológicos que moldam o nível e a distribuição da diversidade genética.

7. Referências Bibliográficas

- Ab'Saber, A. N. The paleoclimate and paleoecology of Brazilian Amazônia. In: **Biological diversification in the tropics**: G. T. Prance edit. Columbia University Press, New York, 1982.
- Agostini, C.; Papetti, C.; Patarnello, T.; Mark, F. C.; Zane, L.; Marino, I. A. M. Putative selected markers in the *Chionodraco* genus detected by interspecific outlier tests, **Polar Biology** Vol. 36, No. 10, 1509-1518, 2013.
- Arakaki, M.; Christin, P. A.; Lendel, A.; Nyffeler, R.; Eggli, U.; Ogburn, R. M.; Spriggs, E.; Moore, M.; Edwards, E. J. Recent and contemporaneous radiations of the worlds succulent plant lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States fo America**, v. 108, p. 8379-8384, 2011.
- Bonatelli, I. A.; Zappi, D. C.; Taylor, N. P.; Moraes, E. M. Usefulness of cpDNA markers for phylogenetic and phylogeographic analyses of closely-related cactus species. **Genetic and Molecular Research**. v. 12, No. Aop, 2013.
- Bonatelli, I. A. S.; Perez, M. F.; Peterson, A. T.; Taylor, N. P.; Zappi, D. C.; Machado, M. C.; Koch, I.; Pires, A. H. C.; Moraes, E. M. Interglacial microrefugia and diversification of a cactus species complex: phylogeography and palaeodistributional reconstructions for *Pilosocereus aurisetus* and allies. **Molecular Ecology** (2014) 23, 3044–3063.
- Chapuis, M. P.; Estoup, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation, **Molecular Biology and Evolution** Vol. 24, No. 3, 621-631, 2007.

- Clark-Tapia, R.; Alfonso-Corrado, C.; Eguiarte, L. E.; Molina-Freaner F. Clonal diversity and distribution in *Stenocereus eruca* (Cactaceae), a narrow endemic cactus of the Sonoran Desert. **American Journal of Botany** 92(2): 272–278. 2005.
- Cornuet, J. M. Piry, S.; Luikart, G.; Estoup, A.; Solignac, M. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals, **Genetics** Vol. 153, No. 4, 1989-2000, 1999.
- Crandall, K. A.; Beninda-Emonds, O. R. P.; Mace, G. M.; Wayne, R. K. Considering evolutionary processes in conservation biology. **Trends in Ecology and Evolution**. 15: 290-295, 2000.
- Creste, S.; Tulmann Neto, A.; Figueira, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silverstaining. **Plant Molecular Biology Reporter**, 19: 299-306, 2001.
- Dias, V. C.; Moraes, E. M. Triagem da variação nucleotídica em regiões do genoma plastidial de cactáceas para estudos filogeográficos e filogenéticos. **Anais de eventos UFSCar - XX Congresso de Iniciação Científica da UFSCar**. São Carlos, 2013
- Ellstrand, C. N. Gene flow among seed plant populations. **New Forests** Vol. 6, 241-256, 1992.
- Ellstrand, N. C.; Elam, D. R. Population genetic consequences of small populations size: implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**. 24:217-42, 1993.
- Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620, 2005.
- Frankham, R. Genetics and Extinction. 2005. **Biological Conservation** 126 131–140, 2005.

- Figueiredo, C. J.; Nassar, J. M.; García-Rivas, A. E.; González-Carcacía. Population genetic diversity and structure of *Pilosocereus tillianus* (Cactaceae, Cereae), a columnar cactus endemic to the Venezuelan Andes. **Journal of Arid Environments** 74: 1392-1398, 2010.
- Godoy, M. O. 2014. **Diversidade e estrutura genética de *Pilosocereus jauruensis*: uma cactácea restrita aos enclaves de vegetação xérica ao redor do bioma Pantanal**. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Goudet, J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 485-486, 1995.
- Hamilton, J. A.; Eckert C. G.; Population genetic consequences of geographic disjunction: a prairie plant isolated on Great Lakes alvars. **Molecular Ecology**, v. 16: 1649-1660, 2007.
- Helsen, P.; Verdyck, P.; Tye, A.; Desender, K.; Van Houtte, N.; Van Donger, S. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in Galapagos Prickly Pear (*Opuntia*) cactus species, **Molecular Ecology Notes** Vol. 7, No. 3, 454-456, 2007.
- Holsinger, K. E.; Weir, B. S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} , **Nature Reviews Genetics** Vol. 10, No. 9, 639-650, 2009.
- Hou, Y.; Lou, A. Population genetic diversity and structure of a naturally isolated plant species, *Rhodiola dumulosa* (Crassulaceae). **PLoS ONE** 6(9): e24497, 2011.
- Hunt, D.; Taylor, N. P.; Charles, G. **The New Cactus Lexicon, Atlas & Text**. Milborne Port : Dh Books, 2006.

Hurtado, L. A.; Carrera, E.; Adite, A.; Winemiller, K. O. Genetic differentiation of a primitive teleost, the african bonytongue *Heterotis niloticus*, among river basins and within a floodplain river system in Benin, West Africa, **Journal of Fish Biology** Vol. 83, No. 3, 682-690, 2013.

INMET. Normais Climatológicas 1961 a 1990. INMET. Brasília, 1992.

IUCN 2012b. **IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. Second edition.**

Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN. Available at www.iucnredlist.org/technical-documents/categories-and-criteria

IUCN Standards and Petitions Subcommittee. 2013. **Guidelines for Using the IUCN**

Red List Categories and Criteria. Version 10. Prepared by the Standards and Petitions Subcommittee. Downloadable from <http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>.

Jakobsson, M.; Rosenberg, N. A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, v. 23, p. 1801–1806, 2007.

Jiménez-Mejías, P.; Fernandez-Mazuecos, M.; Amat, M. E.; Vargas, P. Narrow endemics in European mountains: high genetic diversity within the monospecific genus *Pseudomisopates* (Plantaginaceae) despite isolation since the late Pleistocene. **Journal of Biogeography**. doi: 10.1111/jbi.12507.

Jones, R. C.; McKinnon, G. E.; Potts, B. M.; Vaillancourt, R. E. Genetic diversity and mating system of an endangered tree *Eucalyptus Morrisbyi*, **Australian Journal of Botany** Vol. 53, No. 4, 367-377, 2005.

Lambert, S. M.; Borba, E. L.; Machado, M. C.; Andrade, S. C. Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for

- hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, north-eastern Brazil. **Annals of Botany** 97: 389–403, 2006
- Leal, I. R.; Tabareli, M.; Silva, J. M. C. Ecologia e conservação da caatinga. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2002.
- Lesica, P.; Allendorf, F. W. When are peripheral populations valuable for conservation? **Conservation Biology** 9: 753–760, 1995.
- Loveless, M. D.; Hamrick, J. L. Ecological determinants of genetic-structure in plant populations, **Annual Review of Ecology and Systematics** Vol. 15, 65-95, 1984.
- Meirmans, P. G.; Hedrick, P. W. Assessing population structure: F_{ST} and related measures, **Molecular Ecology Resources** Vol. 11, No. 1, 5-18, 2011.
- Moraes, E. M.; Abreu, A. G.; Andradre, S. C. S.; Sene, F. M.; Solferini, V. N. Population genetic structure of two columnar cacti with a patchy distribution in eastern Brazil, **Genetica** Vol. 125, No. 2-3, 311-323, 2005.
- Moraes, E. M.; Yotoko, K. S. C.; Manfrin, M. H.; Solferini, V. N.; Sene, F. M. Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 2136-2147, 2009.
- Moraes, E. M.; Perez, M. F.; Teo, M. F.; Zappi, D. C.; Taylor, N. P.; Machado, M. C.; Cross-Species amplification of microsatellites reveals incongruence in the molecular variation and taxonomic limits of the *Pilosocereus Aurisetus* Group (Cactaceae), **Genetica** Vol. 140, No. 7-9, 277-285, 2012.
- Nassar, J. M.; Hamrick, J. L.; Fleming, T. H. Genetic variation and population structure of the mixed mating cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactaceae). **Heredity** 87 (2001) 69-79.

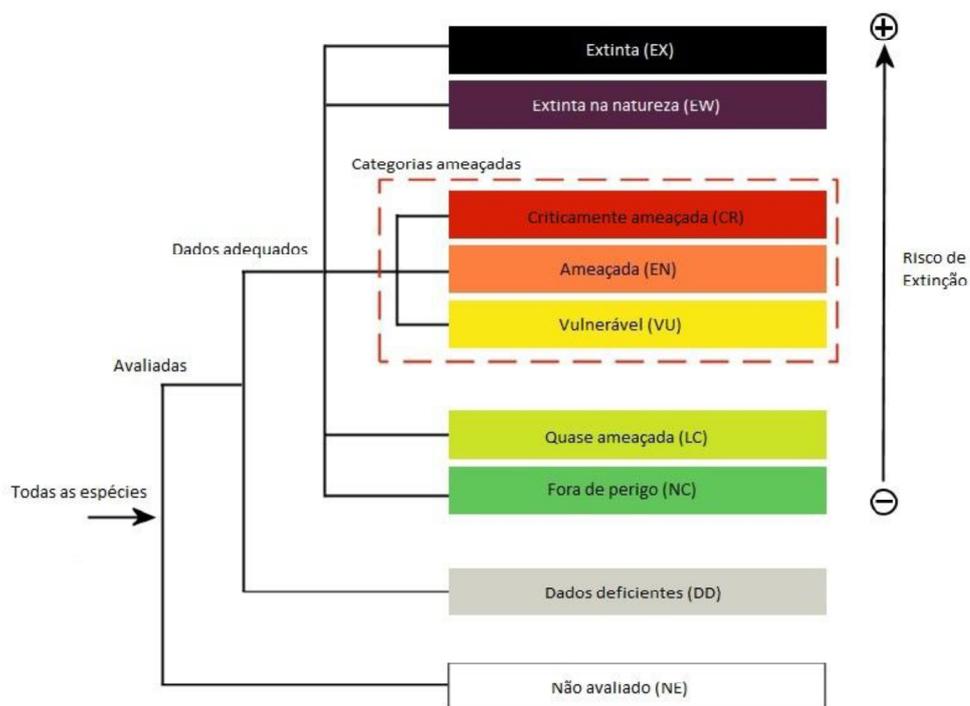
- Nassar, J. M.; Hamrick, J. L.; Fleming, T. H. Population genetic structure of venezuelan chiropterophilous columnar cacti (Cactaceae), **American Journal of Botany** Vol. 90, No. 11, 1628-1637, 2003.
- Nyffeler, R. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from *trnK/matK* and *trnL-trnF* sequences. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 312–326, 2002.
- Ouborg, N.J.; Vergeer, P.; Mix, C. The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants. **Journal of Ecology** **94** (6): 1233-1248 Juniper, T. 2006.
- Peakall, R.; Smouse, P. E. Genalex 6.5: Genetic analysis in excel. Population Genetic Software for Teaching and Research-an Update, **Bioinformatics** Vol. 28, No. 19, 2537-2539, 2012.
- Paetkau, D.; Slade, R.; Burden, M.; Estoup, A. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 55–65, 2004.
- Pennington, R. T.; Prado, D. A.; Pendry C. Neotropical seasonally dry forests and Pleistocene vegetation changes. **Journal of Biogeography**, v. 27, p. 261– 273, 2000.
- Pennington R. T.; Lavin, M.; Prado, D. E.; Pendry, C. A.; Pell, S. K.; Butterworth, C. A. Historical climate change and speciation: neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both Tertiary and Quaternary diversification. **Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 359, p. 515-538, 2004.
- Perez M. F. 2012. **Estudo da estrutura genética da espécie de cactácea colunar *Pilosocereus machrisii* utilizando DNA microssatélite**. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

- Perez, M. F.; Teo, M. F.; Zappi, D. C.; Taylor, N. P.; Moraes, E. M. Isolation, characterization, and cross-species amplification of polymorphic microsatellite markers for *Pilosocereus machrisii* (Cactaceae), **American Journal of Botany** Vol. 98, No. 8, E204-E206, 2011.
- Piry, S.; Alapetite, A.; Cornuet, J. M.; Paetkau, D.; Baudouin, L.; Estoup, A. GeneClass2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection, **Journal of Heredity** Vol. 95, No. 6, 536-539, 2004.
- Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data, **Genetics** Vol. 155, No. 2, 945-959, 2000.
- Rannala, B.; Mountain, J. L. Detecting immigration by using multilocus genotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 9197-9221, 1997.
- Rice, W. R. Analyzing tables of statistical tests, **Evolution** Vol. 43, No. 1, 223-225, 1989.
- Rosenberg, N. A. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 137-138, 2004.
- Shaw, J.; Lickey, E. B.; Beck, J. T.; Farmer, S. B., *et al.* (2005). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany**. 92: 142-166.
- Shaw, J.; Lickey, E. B.; Schilling, E. E.; Small, R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany**. 94: 275-288.

- Souza, V. C.; Lorenzi, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.
- Taberlet, P.; Gielly, L.; Pautou, G.; Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**. 17: 1105-1109.
- Taylor, N. P.; Zappi, D. C. 2004. **The cacti of eastern Brazil.** Royal Botanic Gardens, Kew.
- Terry, M. K.; Pepper, A. E.; Strong, A. W.; Tarin, D. M.; Price, D. M.; Manhart, J. R. Genetic structure of a population of the endangered Star Cactus *Astrophytum asterias*) in Southern Texas. **The Southwestern Naturalist**, 57(2):182-188, 2012.
- 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.
- Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W. F.; Wills, D. P. M.; Shipley, P. Micro-Checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data, **Molecular Ecology Notes** Vol. 4, No. 3, 535-538, 2004
- Velloso, A. L.; Sampaio, E. V. S. B.; Pareyn, F. G. C. **Ecorregiões: propostas para o Bioma Caatinga.** Recife: Associação Plantas do Nordeste; Instituto de Conservação Ambiental The Nature Conservancy do Brasil, 2002.
- Weir, B. S.; Cockerham, C. C. Estimating *F*-statistics for the analysis of population-structure, **Evolution** Vol. 38, No. 6, 1358-1370, 1984.
- Wright, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323–353, 1951.

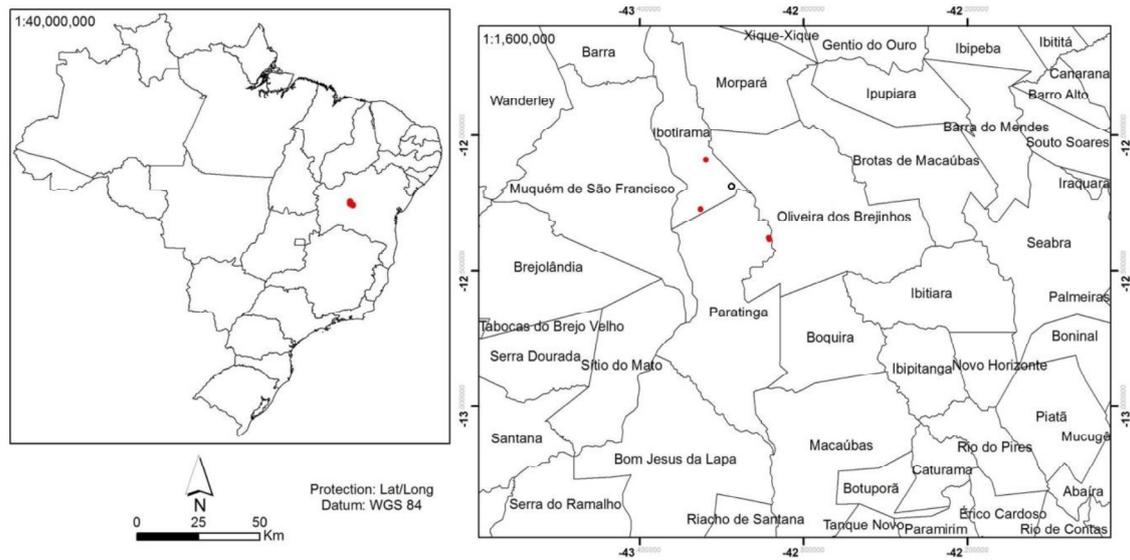
- Young, A. G.; Boyle, T.; Brown, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Tree** 11: 413–418, 1996.
- Young, A.G.; Merriam, H. G.; Warwick, S. I. The effects of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) population. **Heredity** 71: 277–289, 1993.
- Zappi, D.C. ***Pilosocereus* (Cactaceae): the genus in Brazil**. Royal Botanic Gardens, Kew, 1994.
- Zappi, D., Machado, M., Taylor, N.P. & Braun, P. 2013. *Pilosocereus aureispinus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2014.2. Available at www.iucnredlist.org.
- Zappi, D. C.; Taylor, N. P.; Silva, S. R.; Machado, M.; Moraes, E. M.; Calvente, A.; Cruz, B.; Correia, D.; Larocca, J.; Assis, J. G.; Meiado, M.; Santos, M. R.; Bellintani, M.; Coelho, P.; Nahoum, P. I.; Resende, S. **Plano de ação nacional para a conservação das Cactáceas**: Série Espécies Ameaçadas. 1. ed. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2011.

8. Anexos



:

Anexo 1. - Segundo a versão atual, existem nove categorias definidas para todos os táxons, exceto microrganismos: extinta (EX), extinta na natureza (EW), criticamente ameaçada (CR), ameaçada (EN), vulnerável (VU), quase ameaçada (NT), fora de ameaça (LC), dados deficientes (DD) e não avaliado (NE) (IUCN, 2012b).



Anexo 2. – Localização da RPPN “Fazenda Pé da Serra” (circulo preto) em relação às populações conhecidas de *P. aureispinus* (pontos vermelhos).

Anexo 3. Estimativa dos parâmetros de variabilidade genética nas três populações analisadas de *P. aureispinus*: A , número médio de alelos por loco; n_E , número efetivo de alelos; H_O , heterozigosidade média observada; H_E , heterozigosidade média esperada; A_R , riqueza alélica; F_{IS} , valor do coeficiente de endocruzamento.

Loco	N	A	n_E	A_R	H_O	H_E	F_{IS}
Ibotirama (IBO1)							
<i>Pmac82</i>	24	2	1,1	1,7	0,083	0,080	-0.022
<i>Pmac84</i>	24	3	1,3	2,5	0,292	0,254	-0.126
<i>Pmac102</i>	24	1	1,0	1,0	0,000	0,000	*
<i>Pmac128</i>	24	5	3,4	4,7	0,667	0,702	0.072
<i>Pmac130</i>	24	8	4,2	6,1	0,625	0,760	0.199
<i>Pmac149</i>	23	4	2,2	3,2	0,696	0,542	-0.264
Média	23,8	3,8	2,2	3,2	0,358	0,471	0.011
Ibotirama (IBO2)							
<i>Pmac82</i>	27	3	1,1	2,8	0,074	0,072	-0.010
<i>Pmac84</i>	27	2	1,8	2,0	0,333	0,456	0.287
<i>Pmac102</i>	27	1	1,0	1,0	0,000	0,000	*
<i>Pmac128</i>	26	7	2,8	6,8	0,692	0,645	-0.064
<i>Pmac130</i>	27	9	5,6	8,8	0,889	0,821	-0.064
<i>Pmac149</i>	27	5	2,9	5,0	0,704	0,664	-0.041
Média	26,8	4,5	2,5	4,4	0,382	0,519	0.004
Oliveira dos Brejinhos (OLB1)							
<i>Pmac82</i>	28	3	1,5	3,0	0,429	0,357	-0.182
<i>Pmac84</i>	27	3	1,8	2,8	0,333	0,442	0.264
<i>Pmac102</i>	28	2	1,2	2,0	0,214	0,191	-0.102
<i>Pmac128</i>	28	5	4,1	5,0	0,750	0,755	0.032
<i>Pmac130</i>	28	8	5,4	7,8	0,964	0,816	-0.165
<i>Pmac149</i>	24	3	2,3	3,0	0,750	0,565	-0.070
Média	27,2	4	2,7	3,9	0,499	0,553	-0.082
Oliveira dos Brejinhos (OLB2)							
<i>Pmac82</i>	12	2	1,2	2,0	0,167	0,153	-0.048
<i>Pmac84</i>	12	4	1,9	3,9	0,583	0,451	-0.252
<i>Pmac102</i>	12	3	1,4	3,0	0,167	0,292	0.463
<i>Pmac128</i>	12	6	4,0	5,1	0,833	0,747	-0.073
<i>Pmac130</i>	11	7	4,8	6,7	1,000	0,789	-0.222
<i>Pmac149</i>	11	4	2,1	3,4	0,364	0,533	0.360
Média	11,7	4,3	2,6	4,0	0,519	0,494	-0.005

*loco monomófico, F_{IS} não calculado.