

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

**Análise da história evolutiva de *Leptolobium elegans* Vogel (Leguminosae,  
Papilionoideae) através da integração de dados genéticos, ambientais e morfológicos**

Thabata Leite Brum de Mello Borine

Orientação: Aline Pedroso Lorenz Lemke

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

**Análise da história evolutiva de *Leptolobium elegans* Vogel (Leguminosae,  
Papilionoideae) através da integração de dados genéticos, ambientais e morfológicos**

Thabata Leite Brum de Mello Borine

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
para obtenção do grau de Mestre em Biologia  
Vegetal junto ao Departamento de Biologia do  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Aline Pedroso Lorenz Lemke, por toda a paciência, dedicação, orientação e exemplo;

Aos meus pais e minha irmã, que sempre me apoiaram, mesmo sem entender exatamente o que eu fazia. Pelo amor, carinho e por tudo que vocês me ensinaram, e por sempre estarem presentes;

Ao Wesley Covre, pela amizade durante todos os momentos, incluindo finais de semana no laboratório;

Ao Weg e ao Nicolay, pelas coletas e por não se incomodarem com as minhas dúvidas;

À Priscila e a Camille, pelas horas na frente do computador medindo folhas;

À Thais Guimarães e a professora Rosani Collevatti, pelo auxílio no sequenciamento;

À professora Ângela Sartori, pelo auxílio na identificação das espécies;

À Wanderléia, pela companhia nas coletas e pelo auxílio nos cortes anatômicos, e a professora Edna Scremin Dias, pela utilização do laboratório;

Ao meu namorado Ricardo, por todo carinho, amor e paciência, nos momentos mais difíceis;

Ao Rodrigo, pela amizade e por estar ao meu lado sempre que eu precisei;

Aos meus bons amigos da turma de mestrado, à Ana Paula, Jane, Fábria, Tamires, Carol e Herbert, pelas horas de relaxamento;

À Luciana, Ana Carolina, Ana Letícia, Pedro e todos os outros integrantes do LEBio, que sempre foram prestativos e ótimas companhias;

À Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFMS, a CAPES e ao REUNI, pelo auxílio financeiro.

## RESUMO EM PORTUGUÊS

O Cerrado, reconhecido mundialmente como um *hotspot* de biodiversidade, tem sido estudado quanto aos padrões filogeográficos de diferentes espécies de plantas e animais ao longo de toda sua distribuição. Alguns padrões congruentes já foram identificados, inclusive nas áreas transicionais com outras formações fitogeográficas, como a Mata Atlântica e a Floresta Amazônica. Entretanto, pouco se sabe sobre a dinâmica evolutiva das espécies que ocorrem na região de transição entre o Cerrado e o Pantanal, cuja maior área está no Estado de Mato Grosso do Sul (MS). *Leptolobium elegans* é uma árvore da família Leguminosae cuja distribuição geográfica é adequada para avaliar esta questão. Na região de interesse também ocorre *L. dasycarpum*, uma espécie filogeneticamente e morfológicamente relacionada a *L. elegans* mas com ampla distribuição no Cerrado. Com o objetivo de avaliar os padrões evolutivos da região transicional entre o Cerrado-Pantanal foram realizadas análises genéticas, geográficas e morfológicas ao longo de toda a distribuição de *L. elegans*. O material analisado foi coletado em campo, sendo amostradas folhas jovens para extração de DNA. Foram confeccionadas exsicatas para as análises morfométrica e todas as populações amostradas foram georreferenciadas. Foram amplificadas por PCR as seguintes regiões não codificantes do DNA plastidial: espaçadores intergênicos *trnH-psbA*, *trnF-trnL*, *psbC-trnS<sub>3</sub>* e o íntron do gene *trnL*. Através do software MAXENT foi realizada uma modelagem de distribuição geográfica para o presente e para o Último Máximo Glacial. Além disso, foi realizada uma Análise de Componentes Principais, para comparar os dados ecológicos e morfométricos de *L. elegans* e *L. dasycarpum* a partir de dados de ocorrência e exsicatas de vários herbários brasileiros. A análise das sequências obtidas até o momento não revelou a presença de polimorfismos intraespecíficos nas regiões *trnF-trnL*, *psbC-trnS<sub>3</sub>* e o íntron do gene *trnL*. Foram analisadas sequências de *trnH-psbA* de 17 plantas de nove populações que

possibilitaram a determinação de três haplótipos. Estes foram comparados com um haplótipo de *L. dasycarpum* presente em uma população do norte no MS. Os haplótipos 1 e 2 foram os mais frequentes em *L. elegans* e ocorrem exclusivamente em áreas de Cerrado. Surpreendentemente, a divergência entre estes haplótipos e o haplótipo 3, presente em populações do Pantanal da Nhecolândia e da região de transição com o Cerrado, é maior em relação ao haplótipo de *L. dasycarpum*. Os testes de neutralidade não foram significativos e o AMOVA resultou em uma alta diferenciação entre populações ( $\Phi_{ST} = 0,67$   $p=0,01$ ). Os dados de modelagem indicam que *L. elegans* possuía uma distribuição reduzida no Último Máximo Glacial, concentrada no MS (em especial na região de transição entre Pantanal e Cerrado). As análises ecológicas sugerem que *L. elegans* e *L. dasycarpum* ocorrem em nichos semelhantes, esperado para espécies proximamente relacionadas. As análises morfométricas sugerem que *L. elegans* e *L. dasycarpum* diferem quanto a morfologia, e que alguns indivíduos do MS apresentam características intermediárias o que pode ser um indício de hibridação interespecífica recente. Apesar de incipientes, os dados obtidos começam a traçar a história evolutiva das espécies arbóreas da região. Os dados genéticos e geográficos indicam que, aparentemente, a região transicional possibilitou uma certa estabilidade demográfica para a espécie e a diferenciação de linhagens específicas do Pantanal. A ampliação do número de marcadores analisados e de indivíduos/populações sequenciados certamente auxiliará a compor um cenário mais claro e confiável dos eventos evolutivos ocorridos nesta região.

## RESUMO EM INGLÊS

Cerrado, a biodiversity hotspot worldwide recognized, has been studied about phylogeographical patterns in different plant and animal species throughout its distribution. Some congruent patterns have been identified, including transitional areas phytogeographic with other formations, such as Atlantic Forest and Amazon Rainforest. However, little is known about evolutionary dynamics of species that occur in the transition region between Cerrado and Pantanal, which the largest area is in Mato Grosso do Sul State (MS). *Leptolobium elegans* is a tree from Leguminosae family which geographic distribution is adequate to access this data. In the region of interesting it also occurs *L. dasycarpum*, a morphologically and phylogenetically specie related to *L. elegans*, but with a wide distribution in Cerrado. Aiming to evaluate the evolutionary patterns of the transitional region between Cerrado-Pantanal, this study analyzed genetic, geographical and morphological data throughout *L. elegans* distribution. The analyzed material was collected in field, and young leaves were sampled for DNA extraction. Herbarium specimens were prepared for morphometric analysis and all populations sampled were georeferenced. Non-coding regions of plastid DNA were amplified by PCR: intergenic spacers *trnH-psbA*, *trnL-trnF*, *psbC-trnS<sub>I</sub>* and *trnL* gene intron. Modeling analysis of geographical distribution were performed for the present and the Last Glacial Maximum, through MAXENT software. In addition, to compare ecological and morphological data of both species, *L. elegans* and *L. dasycarpum*, a Principal Component Analysis was realized, from several Brazilian herbaria data. The analysis with the sequences obtained so far has not revealed intraspecific polymorphisms in *trnL-trnF*, *psbC-trnS<sub>I</sub>* and *trnL* gene intron. From nine populations, 17 *trnH-psbA* sequences were analyzed, which enable the determination of three haplotypes. These data were compared to *L. dasycarpum* sequence from a northern MS population. The most frequent haplotypes were one and two,

both occurring in Cerrado areas. Surprisingly, the divergence between these haplotypes and haplotype 3, present in populations from Pantanal of Nhecolândia and transition regions of Cerrado, it is higher when compared to *L. dasycarpum* haplotype. Neutrality tests were not significant and AMOVA resulted in high differentiation among populations ( $\Phi_{ST} = 0,67$   $p=0,01$ ). Modeling data indicate reduced distribution in Last Glacial Maximum for *L. elegans*, concentrated in MS (especially in Pantanal-Cerrado transition region). Environmental analyses suggest that *L. elegans* and *L. dasycarpum* occur in similar niches, expected for close related species. Morphometric analyses suggest that they are both morphologically different, but some individuals exhibit intermediate characteristics in MS State, which may be an indication of recent interspecific hybridization. Although it is early to affirm more, the data begin to trace the evolutionary history of these tree species in the region. Apparently, the genetic and geographic data indicate that transitional region allowed a certain demographic stability for the species and differentiation of Pantanal specific lineages. The increase in analyzed markers and individuals/populations sequenced certainly will help to compose a clear scenario of evolution events occurred in this region.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO EM PORTUGUÊS.....	4
RESUMO EM INGLÊS.....	6
INTRODUÇÃO GERAL.....	11
Origem e evolução do Cerrado.....	11
Origem e caracterização do Pantanal.....	14
Filogeografia de espécies arbóreas e arbustivas da América do Sul .....	17
O grupo de estudo.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
OBJETIVOS.....	35
Objetivos gerais.....	35
Objetivos específicos.....	35
ANÁLISE DA HISTÓRIA EVOLUTIVA DE <i>Leptolobium elegans</i> Vogel (LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE) ATRAVÉS DA INTEGRAÇÃO DE DADOS GENÉTICOS, AMBIENTAIS E MORFOLÓGICOS.....	36
RESUMO.....	36
ABSTRACT.....	37

INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
Coleta de material biológico, extração e amplificação do DNA.....	41
Análise das sequências.....	42
Modelagem de distribuição potencial e análise de nicho ecológico.....	42
Morfometria.....	44
RESULTADOS.....	45
Análises filogeográficas.....	46
Modelagem de distribuição potencial e análise de nicho ecológico.....	47
Análises morfológicas.....	48
DISCUSSÃO.....	49
Integrando dados genéticos e geográficos.....	49
Possível hibridação interespecífica.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
FIGURAS.....	70
TABELAS.....	75
APÊNDICE S1.....	78

APENDICE S2.....	79
APENDICE .....	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
GUIA DO AUTOR – <i>Journal of Biogeography</i> .....	83

## INTRODUÇÃO GERAL

### Origem e evolução do Cerrado

O Cerrado compõe uma das mais diversas e abrangentes fitofisionomias do centro do continente sul-americano, e para compreender sua complexa dinâmica evolutiva é necessário contextualizar a região com as principais alterações paleoclimáticas e geológicas ocorridas na mesma. Entre os principais eventos podemos destacar o soerguimento da Cordilheira dos Andes durante o Mioceno médio e superior (15,9 – 5,3 milhões de anos - Ma) que ocasionou modificações importantes nos sistemas fluviais e de drenagem (Potter, 1997), e a alternância cíclica de estágios glaciais e interglaciais durante o Quaternário (2,5 Ma até o presente, Augustin *et al.*, 2004).

Consideradas anteriormente como um dos principais fatores que influenciaram a diversificação dos grupos atuais, as oscilações climáticas do Quaternário foram reavaliadas através de dados moleculares. Em um trabalho pioneiro, Klicka & Zink (1997) demonstraram que para pássaros, 11 dos 35 pares de espécies irmãs avaliados divergiram no Quaternário. Porém Avise & Walker (1998) concluíram que o Pleistoceno pode não ter sido onde a divergência entre essas espécies de aves se iniciou, mas foi importante para concluir eventos evolutivos anteriores e iniciar a separação de grupos geográficos intraespecíficos. Avise e colaboradores (1998) observaram que para vertebrados, a maior parte das divergências entre espécies irmãs começaram a ocorrer entre o Plioceno (5,3 – 2,5 Ma) e o Pleistoceno (2,5 Ma – 11,7 mil de anos – ka).

Estudos filogenéticos de plantas indicam que, semelhante aos vertebrados, o aumento no número de espécies no planeta ocorreu principalmente entre o Plioceno e o Pleistoceno (Hewitt, 1996). Dada sua importante abundância e distribuição, Leguminosae está entre as principais famílias avaliadas nestes estudos, principalmente através de análises de DNA

plastidial e nuclear (Richardson *et al.*, 2001; Hughes & Eastwood, 2006; Catalano *et al.*, 2008; Saslis-Lagoudakis *et al.*, 2008). Com a distribuição abrangendo o Velho e o Novo Mundo, o clado andino do gênero *Lupinus* (Papilionoideae) apresentou uma das taxas de diversificação mais altas conhecidas em plantas e teve sua idade estimada em 1,18 – 1,76 Ma (Hughes & Eastwood, 2006). Para *Prosopis* (Mimosoideae, Catalano *et al.*, 2008), gênero encontrado em várias regiões áridas e semiáridas do planeta, as diversificações ocorreram desde o Mioceno, aumentando no Plioceno, todavia existem várias espécies originadas no Pleistoceno. Na região neotropical, o mesmo padrão foi encontrado para *Platymiscium* (Papilionoideae; Saslis-Lagoudakis *et al.*, 2008), enquanto no gênero *Inga* (Mimosoideae), as diversificações estão concentradas no Quaternário (Richardson *et al.*, 2001).

No continente sul-americano, Pennington e colaboradores (2004) demonstraram que as diversificações de várias espécies das Florestas Secas Sazonais Neotropicais ocorreram principalmente no Mioceno Médio e no Plioceno. Porém, os autores afirmam que essa diversificação continuou no Pleistoceno, especialmente na América Central, nos casos de espécies derivadas das encontradas na América do Sul. Em revisão bibliográfica sobre a diversificação das formações vegetacionais abertas, Werneck (2011) observou que vários táxons tem suas origens ligadas a tempos mais antigos que o período Quaternário. Portanto, em geral os estudos indicam que os eventos do Terciário influenciaram fortemente eventos macroevolutivos e padrões amplos de diversidade, enquanto as flutuações climáticas do Quaternário alteraram a estrutura das populações, afetando a diversidade genética e a dinâmica de fluxo gênico.

Durante o Quaternário a distribuição das espécies era bastante alterada, enquanto as populações do Hemisfério Norte eram efetivamente afetadas pelo aumento das geleiras próximas ao polo e nas áreas montanhosas, na região tropical as oscilações climáticas levaram

a mudanças entre climas mais frios e secos (eras glaciais) e quentes e úmidos (interglaciais, Hewitt, 2000). Durante esses períodos secos e frios, as savanas e os campos se expandiam, as florestas, por outro lado, diminuía e se fragmentavam (Hewitt, 2000; Behling, 2002).

O cerrado é formado por diversas fitofisionomias, desde florestas e savanas até campos abertos (Eiten, 1972). É predominante no Brasil Central, sendo considerada a segunda maior formação vegetacional brasileira com cerca de dois milhões de quilômetros quadrados (Ratter, 1992). Estudos palinológicos sugerem que no último máximo glacial o Cerrado expandiu ao norte de sua área de ocupação atual, enquanto a porção sul, devido as frequentes geadas da região, foi coberta por campos (Behling & Lichte, 1997). Durante o início do Holoceno, essas áreas de campo foram substituídas por Cerrado, portanto teriam sido maiores e mais contínuas que atualmente (Behling & Hooghiemstra, 2001). Os mesmos autores indicam que no Holoceno médio (por volta de 6 ka), o clima ficou mais quente e úmido, e a distribuição do Cerrado já se assemelhava com a de hoje.

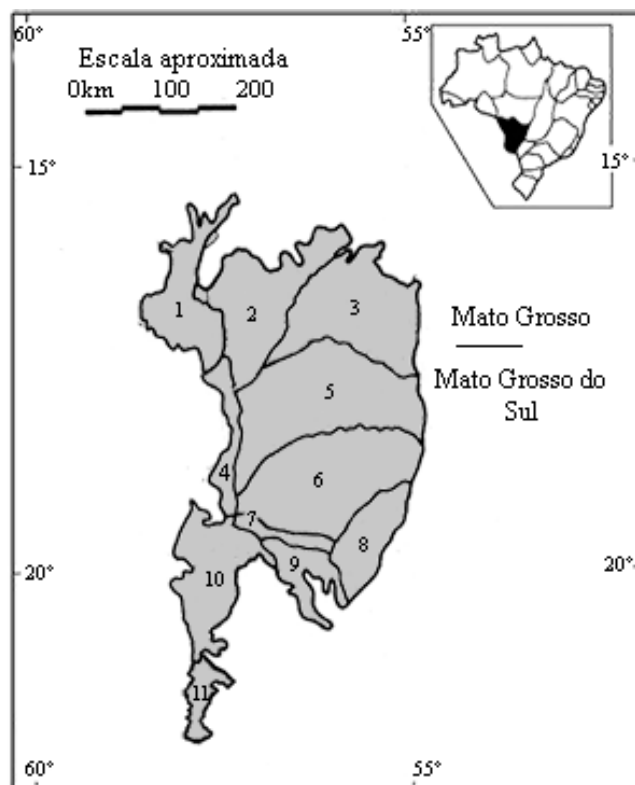
Além das alterações climáticas, outros fatores podem ter influenciado a origem e atual distribuição das espécies do Cerrado. Nas várias teorias propostas, o fogo e o tipo de solo também teriam atuado como fatores na seleção das espécies (Pinheiro & Monteiro, 2010). Outro possível fator de influência é o intercâmbio de espécies das Florestas Atlântica e Amazônica, que teriam estendido suas extensões sobre o domínio do Cerrado nos períodos de temperatura mais elevada, enquanto elementos da Caatinga e do Chaco expandiam seus domínios nos períodos frios e secos (Pennington *et al.*, 2000).

Simon e colaboradores (2009), através de filogenias moleculares com espécies de Leguminosae, estimaram o tempo de divergência de diversas linhagens específicas do Cerrado em menos de 10 Ma, a maioria com quatro Ma ou menos, o que coincide com o período em que as gramíneas C4 dominavam as paisagens no Brasil Central. As gramíneas C4

acumulam biomassa rapidamente nos verões úmidos, e se tornam inflamáveis nos longos invernos secos, propiciando queimadas que podem ter influenciado, como fator de seleção, as adaptações ao fogo das espécies do Cerrado (Simon *et al.*, 2009). Entre as adaptações podemos citar xilopódios subterrâneos, túberos, cortiças grossas, árvores com ramificação esparsa, ervas perenes e fenologias especializadas de floração e frutificação. Esse mesmo trabalho demonstra que as linhagens do Cerrado são relacionadas a linhagens das Florestas Secas Estacionais Neotropicais, da Floresta Amazônica, da Mata Atlântica, do Chaco, da Caatinga e dos campos subtropicais, provavelmente devido a posição central dessa fitofisionomia.

### **Origem e caracterização do Pantanal**

O Pantanal é considerado a maior planície contínua de inundação do planeta, cobrindo cerca de 140,000 km<sup>2</sup> do Centro-Oeste brasileiro (Brasil, 1997). Com relevo plano e baixas declividades, é pobremente drenado ocasionando inundações anuais entre os meses de verão e outono (Janeiro-Maio). É comumente dividido em sub-regiões pelos padrões de drenagem e inundação: Cáceres, Poconé, Barão de Melgaço, Paraguai, Paiaguás, Nhecolândia, Abobral, Aquidauana, Miranda, Nabileque e, para alguns, Porto Murtinho (Silva & Abdon, 1998; Fig. 1).



**Figura 1.** Mapa com as sub-regiões do Pantanal. Adaptado de Silva *et al.* (2000): 1 – Cáceres; 2 – Poconé; 3 – Barão de Melgaço; 4 – Paraguai; 5 – Paiaguás; 6 – Nhecolândia; 7 – Abobral; 8 – Aquidauana; 9 – Miranda; 10 – Nabileque; 11 – Porto Murtinho.

A mudança nos padrões de drenagem dos rios do Pantanal altera continuamente a topografia, originando um mosaico de paisagens, de pequenos a grandes rios, lagoas, pântanos, várzeas e áreas florestais que permanecem secas durante o ano todo. As cordilheiras (antigos diques fluviais) apresentam vegetação arbórea mais densa com florestas semidecíduas similares as do Brasil Central (Dubs, 1992).

A flora do Pantanal é um encontro de espécies de ampla distribuição e de várias províncias fitogeográficas, tais como o Cerrado, Florestas Estacionais, Chaco, Amazônia e Mata Atlântica, possuindo apenas sete plantas endêmicas conhecidas até o momento, pertencente as famílias Leguminosae, Boraginaceae, Amaryllidaceae, Asteraceae e Araceae (Pott *et al.*, 2011). Devido às suas condições ambientais peculiares, observa-se que as espécies

de outras formações apresentam características morfofisiológicas e populacionais diferenciadas no Pantanal (Pott & Pott, 1994).

Ussami e colaboradores (1999) constataram que a origem da bacia do Pantanal foi a movimentação e compressão da placa tectônica brasileira, durante o último evento compressivo dos Andes há cerca de 2,5 Ma. A sedimentação do Pantanal pode ter começado no Plioceno, porém uma datação mais precisa ainda não foi realizada (Assine & Soares, 2004). Em pesquisa realizada em um lago no Pantanal boliviano, Whitney e colaboradores (2011) encontraram evidências palinológicas da influência das flutuações climáticas pleistocênicas na distribuição das formações vegetacionais. Constataram que diversas espécies adaptadas a climas secos ocorreram na região durante o último período glacial, além de encontrarem evidências de que a elevação da temperatura durante o Holoceno e a maior quantidade de chuvas, aumentaram os níveis de água no lago, levando ao alagamento da região.

Estudos filogeográficos com populações do Pantanal são raros e, até o momento, realizados apenas com animais. Um estudo filogeográfico realizado com DNA mitocondrial de colhereiro (*Platalea ajaja*), cabeça-seca (*Mycteria americana*) e tuiuiú (*Jabiru mycteria*) indicou expansões populacionais recentes no Pantanal e não encontrou divergências genéticas significativas com populações de outras partes do continente americano (Lopes *et al.*, 2007). Resultado similar foi encontrado para o Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*), que também não apresentou diferenças genéticas com outras populações brasileiras e bolivianas, e experimentou uma rápida expansão populacional recente (28 – 25 ka), período em que as chuvas começaram a aumentar (Marquéz *et al.*, 2006).

## **Filogeografia de espécies arbóreas e arbustivas da América do Sul**

Desde que John Avise e colaboradores (1987) cunharam o termo filogeografia, esta área de estudo tem recontado a história evolutiva das populações num contexto espacial e temporal. Para esse fim, um dos métodos mais utilizados é o sequenciamento de DNA, pois permite avaliar variados níveis taxonômicos através de regiões distintas do genoma com diferentes taxas evolutivas (Avise, 2000). Regiões intergênicas não-codificadoras do DNA plastidial são amplamente estudadas em plantas, pois evoluem rapidamente sem afetar as funções dos genes adjacentes e permitem a análise de diferenças inter e intraespecíficas (Hamilton *et al.*, 2003).

Estudos filogeográficos com plantas aumentaram significativamente a partir do ano 2000, sendo a maior parte das publicações (cerca de 88%) referentes a espécies do Hemisfério Norte (Beheregaray, 2008). Esses estudos realizados no Hemisfério Norte demonstram que as oscilações climáticas do Quaternário influenciaram a atual distribuição das espécies, e que apesar de cada espécie estudada possuir padrões de distribuição da variabilidade genética próprios, é possível distinguir padrões congruentes (Hewitt, 2000).

Com uma biodiversidade maior do que nas áreas temperadas, as regiões tropicais do Hemisfério Sul ainda possuem muitas lacunas a serem preenchidas em especial sobre como as mudanças climáticas ocorridas no Quaternário afetaram a distribuição das diversas fitofisionomias (Dick, 2010). Em revisão sobre os estudos filogeográficos na América do Sul, Turchetto-Zulet e colaboradores (2012a) destacam que para as formações florestais, é possível encontrar um padrão, com essas tendendo a retrair e se fragmentar nos períodos glaciais. Porém, para espécies de vegetações abertas, ainda não é possível definir um padrão geral uma vez que os estudos demonstram respostas variadas às mudanças climáticas do Pleistoceno, tendendo a aumentar, diminuir ou mesmo manter sua distribuição.

Para as Florestas Úmidas das Américas Centrais e do Sul os estudos sugerem que o corredor formado pelo Cerrado e a Caatinga e o soerguimento dos Andes agiram como barreiras naturais para o fluxo gênico (Oliveira *et al.*, 2010; Turchetto-Zolet *et al.*, 2012b). Utilizando sequências de regiões intergênicas do DNA plasmidial (cpDNA) e dos espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal (ITS), Turchetto-Zolet e colaboradores (2012b) encontraram quatro linhagens principais na leguminosa arbórea de ampla distribuição *Schizolobium parahyba*: duas da Floresta Atlântica, uma da Colômbia e América Central, e outra da região amazônica, que apontam para longos períodos de isolamento ancestral. Resultado similar foi encontrado para o arbusto *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae - Oliveira *et al.*, 2010)

Em estudo realizado com populações da Floresta Atlântica, Ribeiro e colaboradores (2011) analisaram as sequências das regiões *trnM-trnV* e íntron *trnL* do cpDNA de *Dalbergia nigra* (Leguminosae). Os resultados obtidos sugerem que as áreas florestais foram reduzidas e fragmentadas durante os períodos glaciais e, possivelmente, substituídas por formações adaptadas a climas mais secos como Florestas semidecíduas, Caatinga e Cerrado.

Analisando dois espaçadores do cpDNA e nove locos de microssatélites de *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae), uma espécie típica das Florestas Secas Sazonais Neotropicais da América do Sul, Caetano e colaboradores (2008) encontraram três grupos de populações (sudoeste, central e nordeste), padrões de isolamento pela distância e as evidências de contato secundário entre as linhagens divergentes. Os dados deste estudo corroboram a teoria do “Arco Pleistocênico” de Prado & Gibbs (1993), que sugere uma distribuição contínua das Florestas Secas Sazonais Neotropicais durante os períodos glaciais do Pleistoceno, e que com o aumento da temperatura e umidade elas ficaram reduzidas a manchas distribuídas por todo o continente.

Um dos estudos pioneiros de filogeografia de plantas no Brasil foi o de Collevatti e colaboradores (2003) com a espécie arbórea típica do Cerrado *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae), conhecida como Pequiizeiro. Através da análise de sequências da região intergênica *trnT-trnF* e de marcadores microsatélites, ambos do cpDNA, Collevatti e colaboradores (2003) detectaram múltiplas linhagens intraespecíficas ao longo da sua distribuição. Os dados sugerem que as populações do sudoeste (oeste de São Paulo) seriam derivadas de populações do Brasil central (Goiás e Mato Grosso), e que, possivelmente houve hibridação entre as populações de *C. brasiliense* ao norte e nordeste do Cerrado com *Caryocar villosum*. Novaes e colaboradores (2010) encontraram resultados semelhantes para a leguminosa arbórea *Plathymenia reticulata*. A análise das sequências das regiões não codificadoras *trnS-trnG*, *trnL-trnF* e íntron *trnL* do cpDNA sugerem que as populações atuais do norte e do sul do Cerrado são derivadas da região central, uma vez que a maior diversidade de haplótipos foi encontrada na mesma (Novaes *et al.*, 2010).

Outras espécies arbóreas analisadas filogeograficamente foram *Hymenaea stigonocarpa* e *H. courbaril* (Leguminosae) (Ramos *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2009). A primeira tem ampla distribuição no Cerrado e a segunda ocorre em regiões de Mata Atlântica e em Matas Ciliares do Cerrado. Utilizando sequências da região *psbC-trnS<sub>3</sub>* do cpDNA, ambas espécies apresentaram três grupos principais: um leste, um central e um do nordeste. Através da análise dos dados, os autores sugerem que durante os períodos glaciais, as populações do sul de ambas espécies se extinguíram, e estas áreas foram posteriormente recolonizadas por populações do norte para *H. stigonocarpa* e do norte e leste para *H. courbaril*. Ambas apresentam semelhanças na estrutura genética intraespecífica, indicando que sofreram os mesmos impactos durante as flutuações climáticas do Pleistoceno. As espécies compartilham haplótipos o que sugere duas possibilidades: retenção de polimorfismo

ancestral pois as espécies divergiram recentemente, ou hibridação interespecífica durante a história evolutiva de ambas.

Estudos no Cerrado rupestre, realizados com o arbusto *Lychnophora ericoides* (Asteraceae; Collevatti *et al.*, 2009) e a árvore *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae; Collevatti *et al.*, 2012) sugerem uma maior distribuição no passado. Ambas espécies possuem distribuição disjunta, grande diferenciação populacional e baixas taxas de fluxo gênico, o que implica vicariância. Os autores de ambos trabalhos apontam que essas espécies, que hoje ocorrem em altitudes mais elevadas onde as condições do solo e clima são favoráveis para o seu desenvolvimento, nos períodos glaciais, com temperatura e umidade mais baixas, ocupavam áreas maiores.

Os estudos filogeográficos de diferentes espécies vegetais do Cerrado citados acima apontam que, apesar de muito ainda a ser feito, dada sua grande biodiversidade, já é possível identificar padrões filogeográficos congruentes. Isto indica que as populações desta ampla formação vegetal estiveram sujeitas à pressões seletivas semelhantes e em resposta, principalmente as alterações climáticas do Quaternário, mudaram sua distribuição geográfica e seus padrões de fluxo gênico interpopulacional levando a diferenciação de diversas linhagens evolutivas.

É possível observar uma estruturação genética que diferencia grupos de populações do norte, do sul e do centro no que é a atual distribuição do Cerrado. Esse padrão indica que, assim como é bem documentado para a Mata Atlântica (Carnaval *et al.*, 2009), o Cerrado também experimentou períodos de expansão e retração de seus domínios, levando ao isolamento entre grupos e a formação de diferentes linhagens intraespecíficas. Também é comum, alguns trabalhos sugerem que ao sul o Cerrado foi substituído por campos nos períodos mais frios e secos sendo recolonizado recentemente, dada sua menor diversidade de

haplótipos e que estes são derivados das populações centrais (Werneck, 2011). Apesar de todos esses estudos, o Cerrado ainda é uma formação vegetal pouco estudada filogenética e filogeograficamente frente à sua biodiversidade (Beheregaray, 2008; Werneck, 2011).

### O grupo de estudo

A família Leguminosae possui uma alta representatividade em diversas formações vegetacionais, sendo uma das principais do Cerrado (Ratter, 1992) e do Pantanal (Pott & Pott, 1994). Lavin e colaboradores (2005) estimaram a origem da família em aproximadamente 59 milhões de anos com subsequente diversificação em subfamílias. Este mesmo trabalho estimou o surgimento da subfamília Papilionoideae em cerca de 45 milhões de anos atrás.

*Leptolobium* Vogel (Leguminosae, Papilionoideae, Sophoreae) é um gênero exclusivamente neotropical, ocorrendo desde o sul do México até o norte da Argentina. Apresenta 12 espécies, das quais 11 ocorrem no Brasil, sendo sete espécies endêmicas do país (Rodrigues & Tozzi, 2012). Compreende árvores ou arbustos, geralmente com as inflorescências terminais, ocasionalmente com racemos axilares. Corola actinomorfa a levemente zigomorfa, com pétalas geralmente brancas, elípticas a ovais, sem uma pétala estandarte bem definida. Os lacínios são maiores que o tubo e os dois lacínios superiores são fusionados acima dos demais e geralmente maiores. As sementes são compressas, com funículo caduco, arilo marginal e embrião com eixo hipocótilo-radícula bulboso, paralelo ao comprimento da semente, raramente oblíquo ou transverso. Por fim, as plântulas em *Leptolobium* apresentam hipocótilo quadrangular, presença de glândulas intercotiledonares e ausência de nictinastia dos cotilédones (Cardoso *et al.*, 2012a; Rodrigues & Tozzi, 2012).

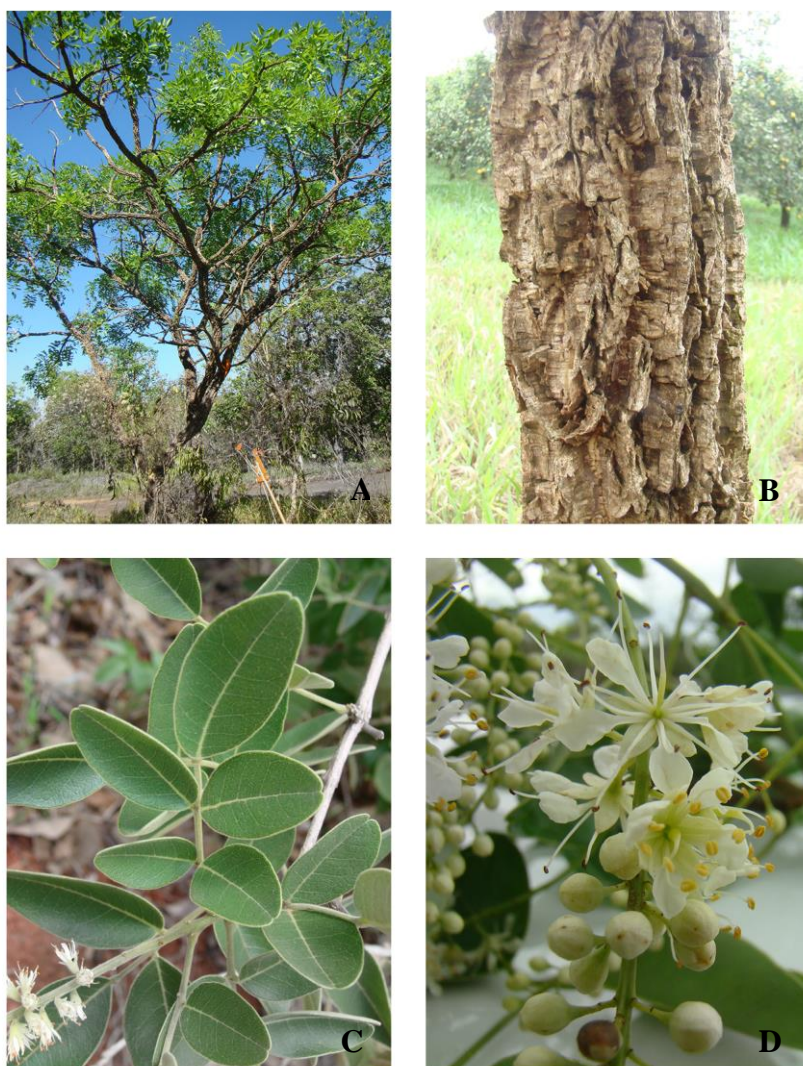
A espécie *Leptolobium elegans* Vogel ocorre na Argentina, Paraguai e Brasil (Fig. 2), em diferentes fitofisionomias do Cerrado, em Mata Ciliar e em florestas baixas Semidecíduas.

No Brasil ocorre nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (Rodrigues & Tozzi, 2012). No Pantanal, geralmente ocorre em fitofisionomias de cerrado, de campos a savanas, em áreas pouco ou não alagáveis, ou em caronais. Foi descrita para mais de uma das sub-regiões pantaneiras, especialmente Nhecolândia e Paiaguás (Pott & Pott, 1994).



**Figura 2.** Mapa da distribuição de *Leptolobium elegans*, adaptado de Rodrigues e Tozzi (2012).

*Leptolobium elegans* é constituída por árvores ou arvoretas de até 18 metros de altura com tronco geralmente tortuoso e ritidoma castanho ou cinza, com profundas fissuras longitudinais (Fig. 3). Possui folíolo elíptico, ovado a lanceolado, glabro a espaçadamente pubescente, base cuneada e ápice emarginado. Corola com pouca diferença entre a pétala adaxial e as demais, ovário glabro, glabrescente a pubescente. Legume samaroide glabro sem ala sutural. Possui uma a três sementes, suborbiculares a ovadas (Rodrigues & Tozzi, 2012). A espécie é polinizada por abelhas e dispersada pelo vento (Ishara & Maimoni-Rodella, 2011).



**Figura 3.** *Leptolobium elegans*. A) Hábito arbóreo; B) ritidoma com profundas fissuras longitudinais, castanho ou cinza; C) folíolo elíptico, ovado a lanceolado, glabro a espaçadamente pubescente, base cuneada e ápice emarginado; e D) flores com pouca diferença entre a pétala adaxial e as demais, ovário glabro, glabrescente a pubescente.

A espécie possui um histórico taxonômico complexo, detalhado por Rodrigues & Tozzi (2008). Foi descrita por Vogel (1837), que a considerou semelhante a *Leptolobium dasycarpum* Vogel, e reconheceu duas variedades: *L. elegans* var. *grandifolia* (espécimes pubescentes) e *L. elegans* var. *parvifolia* (espécimes glabros). Mohlenbrock (1963) as

considerou duas espécies distintas, respectivamente *Sweetia elegans* e *Sweetia subelegans*. Yakovlev (1969) sinonimizou *L. elegans* (*S. elegans*) parte com *Acosmium dasycarpum*, parte com *Acosmium subelegans*. Posteriormente, *L. elegans* (*S. elegans*) deixou de ser sinônimo de *A. dasycarpum* (Bridgewater & Stirton, 1997).

Rodrigues & Tozzi (2008) reestabeleceram como *Leptolobium elegans* como nome da espécie, incluindo tanto indivíduos glabros quanto esparsamente pubescentes. Além de similar a *L. dasycarpum*, *L. elegans* também é descrita como semelhante a *L. stirtonii* (Aymard & V. González) Sch. Rodr. & A.M.G. Azevedo, mas esta não exibe pétala adaxial diferenciada, possui sementes maiores e ocorre no Brasil apenas em Roraima, na Guiana e Venezuela; e a *L. tenuifolium* Vogel, a qual apresenta pulvínulos menores, ritidoma não suberoso e pétala adaxial menor, sendo comum na Floresta Atlântica, nos estados brasileiros do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia.

Em relação à *Leptolobium dasycarpum*, Rodrigues & Tozzi (2012) apontam como diferenças entre ambas que *L. elegans* possui ovário glabro, pulvínulos maiores, tubo do cálice menor e brácteas e bractéolas geralmente menores. Apesar de já terem sido diferenciadas com relação a quantidade de tricomas nas folhas, esse caráter não pode ser usado sozinho como diagnóstico pois é uma das características mais variáveis em toda distribuição de *L. dasycarpum*, que possui folíolos densamente pubescentes e outros glabros na face adaxial (Fig. 4). *L. dasycarpum* ocorre ao longo de todo o Cerrado e em suas áreas transicionais (Rodrigues & Tozzi, 2012).

**Tabela 1:** Principais diferenças diagnósticas entre *Leptolobium elegans* e *Leptolobium dasycarpum*, segundo Rodrigues & Tozzi (2012).

	<i>L. elegans</i>	<i>L. dasycarpum</i>
Pilosidade do ovário	Glabro	Tomentoso
Pulvínulo	3 – 8 mm	0,5 – 3 mm
Tubo de cálice	0,8 – 1,5 mm	1,5 – 2,3 mm
Brácteas	2 – 3 mm	2,5 – 5 mm
Bractéolas	0,8 – 2,2 mm	1,5 – 3 mm

Recentemente, através da análise das sequências dos espaçadores internos transcritos ribossomais (ITS) de dois marcadores do cpDNA (*matK*, *íntron trnL*) e de dados morfológicos, Cardoso e colaboradores (2012b) religaram *Acosmium* Schott. ao clado de legumes dalbergiídeos, enquanto *Leptolobium* se encontra no clado Bowdichia. Estudos específicos sobre Bowdichia, com os mesmos marcadores, apontaram que o clado é monofilético e constituído pelos subclados *Bowdichia*, *Diploptropis* sect. *Diploptropis*, *D.* sect. *Racemosae*, *Guianodendron* e *Leptolobium*, formando um grupo heterogêneo, especialmente em relação à morfologia floral. No mesmo estudo, foi observado um padrão onde as espécies de *Leptolobium* que ocorrem em savanas (*L. elegans*, *L. dasycarpum*, *L. parviflorum*) provavelmente derivam das espécies oriundas das florestas tropicais, mas seriam necessários mais estudos para confirmar essa hipótese (Cardoso *et al.* 2012a).

O estudo filogeográfico de *Leptolobium elegans* traz uma nova perspectiva sobre a história evolutiva do Cerrado-Pantanal, pois a distribuição espacial-temporal da diversidade genética de populações naturais que ocorrem nas áreas transicionais entre estas fitofisionomias é uma das grandes lacunas no conhecimento da biodiversidade brasileira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Assine, M. & Soares, P. (2004) Quaternary of the Pantanal, west-central Brazil. *Quaternary International*, **114**, 23–34.
- Augustin, L.; Barbante, C.; Barnes, P.R.F. *et al.* (EPICA community members) (2004) Eight glacial cycles from an Antarctic ice core. *Nature*, **429**, 623–628.
- Avise, J.C. & Walker, D. (1998) Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proceedings of the Royal Society B*, **265**, 457–463.
- Avise, J.C. (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, London.
- Avise, J.C.; Arnold, J.; Ball, R.M. *et al.* (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 489–522.
- Avise, J.C.; Walker, D. & Johns, G.C. (1998) Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society B*, **265**, 1707–1712.
- Beheregaray, L.B. (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, **17**, 3754–3774.
- Behling, H. & Hooghiemstra, H. (2001) Neotropical Savanna Environments in Space and Time: Late Quaternary. *Interhemispheric climate linkages* (ed. by V. Markgraf), pp. 307–323. Academic Press, Oxford.
- Behling, H. & Lichte, M. (1997) Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical southeastern Brazil. *Quaternary Research*, **48**, 348–358.

- Behling, H. (2002) South and southeast Brazilian grasslands during late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **177**, 19–27.
- Brasil (1997) *Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai, PCBAP*. PNMA, Brasília.
- Bridgewater, S.G.M. & Stirton, C.H. (1997) A morphological and biogeographic study of the *Acosmium dasycarpum* complex (Leguminosae: Papilionoideae: Sophoreae). *Kew Bulletin*, **52**, 471–475.
- Caetano, S.; Prado, D.; Pennington, R.T.; Beck, S.; Oliveira-Filho, A.T.; Spichiger, R. & Naciri, Y. (2008) The history of seasonally dry tropical forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). *Molecular Ecology*, **17**, 3147–3159.
- Cardoso, D.L.; Cavalcante, H.; Rodrigues, R.S.; Queiroz, L.P.; Pennington, R.T. & Lavin, M. (2012a) The Bowdichia clade of Genistoid legumes: Phylogenetic analysis of combined molecular and morphological data and a recircumscription of *Diploptropis*. *Taxon*, **61**(5), 1074–1087.
- Cardoso, D.L.; Cavalcante, H.; Rodrigues, R.S.; De Queiroz, L.P.; Pennington, R. T & Lavin, M. (2012b) The realignment of *Acosmium sensu stricto* with the Dalbergioid clade (Leguminosae: Papilionoideae) reveals a proneness for independent evolution of radial floral symmetry among early-branching papilionoid legumes. *Taxon*, **61**(5), 1057–1073.

- 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.
- Catalano, S.A.; Vilardi, J.C.; Tosto, D. & Saidman, B.O. (2008) Molecular phylogeny and diversification history of *Prosopis* (Fabaceae: Mimosoideae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **93**, 621–640.
- Collevatti, R.G.; Castro, T.G.; Lima, J.S. & Telles, M.P.C. (2012) Phylogeography of *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae), an endangered tree species from rocky savannas, suggests bidirectional expansion due to climate cooling in the Pleistocene. *Ecology and Evolution*, **2**(5), 1024–1035.
- Collevatti, R.G.; Grattapaglia, D. & Hay, J.D. (2003) Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. *Molecular Ecology*, **12**, 105–115.
- Collevatti, R.G.; Rabelo, S.G. & Vieira R.F. (2009) Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae) an endangered cerrado shrub species. *Annals of Botany*, **104**, 655-664.
- Dick, C.W. (2010). Phylogeography and population structure of tropical trees. *Tropical Plant Biology*, **3**(1), 1-3.
- Dubs, B. (1992) Observations on the differentiation of woodland and wet savanna habitats in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Nature and dynamics of forest-savanna*

- boundaries* (ed by Furley, P.A.; Proctor, J. and Ratter, J.A.), pp. 431-449. Chapman & Hall, Londres.
- Eiten, G. (1972) The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Reviews*, **38**, 201-341.
- Hamilton, M.B.; Braverman, J.M. & Soria-Hernanz, D.F. (2003) Patterns and relative rates of nucleotide and insertions/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in New World species of the Lecythidaceae. *Molecular Biology and Evolution*, **20**, 1710-1721.
- Hewitt, G.M. (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 247–276.
- Hewitt, G.M. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.
- Hughes, C. & Eastwood, R. (2006). Island radiation on a continental scale: exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(27), 10334-10339.
- Ishara, K.L. & Maimoni-Rodella, R.C.S. (2011) Pollination and Dispersal Systems in a Cerrado Remnant (Brazilian Savanna) in Southeastern Brazil. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, **54**(3), 629-642.
- Klicka, J. & Zink, R.M. (1997) The importance of recent Ice Ages in speciation: a failed paradigm. *Science*, **277**, 1666-1669.
- Lavin, M.; Herendeen, P.S & Wojciechowski, M.F. (2005) Evolutionary Rates Analysis of Leguminosae Implicates a Rapid Diversification of Lineages during the Tertiary. *Systematic Biology*, **54** (4), 575–594.

- Lopes, I.F.; Miño, C.I. & Del Lama, S.N. (2007) Genetic diversity and evidence of recent demographic expansion in waterbird populations from the Brazilian Pantanal. *Brazilian Journal of Biology*, **67**(4), 849-857.
- Marquéz, A.; Maldonado, J.E.; Gonzalez, S.; Beccaceci, M.D.; Garcia J.E. & Duarte, J.M.B. (2006) Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from the Río de la Plata Basin. *Conservation Genetics*, **7** (4), 563-575.
- Mohlenbrock, R.H. (1963) A revision of the leguminous genus *Sweetia*. *Webbia*, **17**, 223–263.
- Novaes, R.M.L.; Lemos-Filho, J.P.; Ribeiro, R.A. & Lovato, M.B. (2010) Phylogeography of *Phathymenia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology*, **95**, 985-998.
- Oliveira, L.O.; Rossi, A.A.B.; Martins, E.R.; Batista, F.R.C. & Silva, R.S. (2010) Molecular phylogeography of *Carapichea ipecacuanha*, an amphitropical shrub that occurs in the understory of both semideciduous and evergreen forests. *Molecular Ecology*, **19**, 1410–1422.
- Pennington, T.R.; Prado, D.E. & Pendry, C.A. (2000). Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography*, **27**(2), 261-273.
- Pennington, R.T.; Lavin, M.; Prado, D.E.; Pendry, C.A.; Pell, S.K. & Butterworth, C.A. (2004) Historical climate change and speciation: neotropical seasonally dry forest

- plants show patterns of both Tertiary and Quaternary diversification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **359**, 515–537.
- Pinheiro, M.H.O. & Monteiro, R. (2010) Contribution to the discussions on the origin of the cerrado biome: Brazilian savanna. *Brazilian Journal of Biology*, **70**, 95-102.
- Pott, A. & Pott, V.J. (1994) Plantas do Pantanal, p. 421. Embrapa, Brasília.
- Pott, A.; Oliveira, A.; Damasceno-Junior, G. & Silva, J. (2011) Plant diversity of the Pantanal wetland. *Brazilian journal of biology*, **71**, 265–273.
- Potter, P.E. (1997) The mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: a natural history. *Journal of South American Earth Sciences*, **10**, 331-344.
- Prado, D.E. & Gibbs, P.E. (1993) Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **80**, 902–927.
- Ramos, A.C.S.; Lemos-Filho, J.P.; Ribeiro, R.A.; Santos, F.R. & Lovato, M.B. (2007) Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of Quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. *Annals of Botany*, **100**, 1219–1228.
- Ramos, A.C.S.R.; Lemos-Filho, J.P. & Lovato, M.B. (2009) Phylogeographical structure of the neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. *Journal of Heredity*, **100**, 2, 206-216.

- Ratter, J.A. (1992) Transition between cerrado and forest vegetation in Brazil. *Nature and dynamics of forest savanna boundaries* (ed by Furley, Pa., Proctor, J. and Ratter, J.A.), pp. 417-430. Chapman and Hall, Londres.
- Ribeiro, R.A.; Lemos-Filho, J.P.; Ramos, A.C.S. & Lovato, M.B. (2011) Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, **106**, 46–57.
- Richardson, J.E.; Pennington, R.T.; Pennington, T.D. & Hollingsworth, P.M. (2001) Rapid Diversification of a Species-Rich Genus of Neotropical Rain Forest Trees. *Science*, **293**, 2242-2245.
- Rodrigues, R.S. & Tozzi, A.M.G.A. (2008) Reinstatement of the name *Leptolobium* Vogel (Leguminosae, Papilionoideae, Sophoreae). *Taxon*, **57**(3), 980-984.
- Rodrigues, R.S. & Tozzi, A.M.G.A. (2012) Revisão taxonômica de *Leptolobium* (Papilionoideae; Leguminosae). *Acta Botânica Brasilica*, **26**(1), 146-164.
- Saslis-Lagoudakis, C.; Chase, M.W.; Robinson, D.N.; Russell, S.J. & Klitgaard, B.B. (2008) Phylogenetics of Neotropical *Platymiscium* (Leguminosae: Dalbergieae): Systematics, Divergence Times, And Biogeography Inferred From Nuclear Ribosomal And Plastid Dna Sequence Data. *American Journal of Botany*, **95**(10), 1270–1286.
- Silva, J.S.V. & Abdon, M.M. (1998) Delimitação do Pantanal Brasileiro e suas sub-regiões. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **33**, 1703-1711.
- Silva, M.P.; Mauro, R.; Mourão G. & Coutinho, M. (2000) Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. *Revista Brasileira de Botânica*, **23**, 143–152.

- Simon, M.F.; Grether, R.; Queiroz, L.P.; Skema, C.; Pennington, R.T. & Hughes, C.E. (2009) Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 20359–20364.
- Turchetto-Zolet, A. C.; Pinheiro, F.P; Salgueiro, F. & Palma-Silva, C. (2012a) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular ecology* (online version).
- Turchetto-Zolet, A.C.; Cruz, F.; Vendramin, G.G.; Simon, M.F.; Salgueiro, F.; Margis-Pinheiro, M. & Margis, R. (2012b) Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **65**, 174–182.
- Ussami, N.; Shiraiwa, S. & Dominguez, J.M.L. (1999) Basement reactivation in a sub-Andean foreland flexural bulge: the Pantanal wetland, SW Brazil. *Tectonics*, **18**(1), 25-39.
- Vogel, T. (1837) *Caesalpinieis Brasiliae*. *Linnaea*, **11**, 381–416.
- Werneck, F.P. (2011) The diversification of eastern South American open vegetation biomes - Historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Reviews*, **30**, 1630-1648.
- Whitney, B.S.; Mayle, F.E.; Punyasena, S.W.; Fitzpatrick, K.A.; Burn, M.J.; Guillen, R.; Chavez, E.; Mann, D.; Pennington, R.T. & Metcalfe, S.E. (2011) A 45 kyr palaeoclimate record from the lowland interior of tropical South America. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **307**, 177–192.

Yakovlev, G.P. (1969) A review of *Sweetia* and *Acosmium*. *Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh*, **29**, 347–355.

## OBJETIVOS

### Objetivos Gerais

Estudar os padrões filogeográficos de populações de *Leptolobium elegans* do Cerrado e do Pantanal, contribuindo assim para a melhor compreensão dos padrões e processos relacionados à origem, evolução e manutenção da biodiversidade destas formações.

### Objetivos Específicos

- Estudar a estrutura genética e filogeográfica de *L. elegans* no Brasil Central através da análise de sequências de DNA plastidial (espaçadores intergênicos *trnH-psbA*, *trnL-trnF*, *psbC-trnS<sub>I</sub>* e íntron *trnL*).
- Relacionar a estrutura genética e filogeográfica a eventos históricos, para contribuir para a melhor compreensão da história evolutiva do Cerrado-Pantanal.
- Auxiliar na distinção entre *L. elegans* e *L. dasycarpum*, espécie filogeneticamente relacionada com ampla distribuição no Cerrado, através de dados morfológicos e ambientais.

**Análise da história evolutiva de *Leptolobium elegans* Vogel (Leguminosae, Papilionoideae) através da integração de dados genéticos, ambientais e morfológicos**

T.L.B.M. Borine<sup>1</sup>; P. M. S. L. LOPES<sup>1</sup>, C. S. de SOUZA<sup>1</sup>, W. S. FAVA<sup>1</sup>; A.P. LORENZ-LEMKE<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Evolução e Biodiversidade, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. CP 549, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brazil.

E-mail: thabataborine@gmail.com

**RESUMO**

**Objetivos:** Avaliar a história evolutiva de *Leptolobium elegans* através de análises genéticas, geográficas e morfológicas.

**Local:** Brasil Central, região de transição entre o Cerrado e o Pantanal.

**Métodos:** Análises genéticas: coleta de material em campo, extração de DNA a partir de folhas jovens e amplificação de regiões não codificantes do DNA plastidial (espaçadores intergênicos *trnH-psbA*, *trnF-trnL*, *psbC-trnS<sub>I</sub>* e o íntron do gene *trnL*). Análises geográficas: modelagem de distribuição geográfica, através do software MAXENT para o presente e para o Último Máximo Glacial (UMG). Além disso, foi realizada uma Análise de Componentes Principais, para comparar os dados ecológicos e morfométricos de *L. elegans* e *L. dasycarpum*, espécie relacionada e típica de Cerrado, a partir de dados de ocorrência e exsicatas de vários herbários brasileiros.

**Resultados:** De quatro marcadores testados, *trnH-psbA* foi o único que apresentou variação intraespecífica. Foram analisadas sequências de *trnH-psbA* de 48 plantas de 15 populações que possibilitaram a determinação de quatro haplótipos. Estes foram comparados com um haplótipo de *L. dasycarpum*. Surpreendentemente, a divergência entre os haplótipos mais frequentes de *L. elegans* e um haplótipo presente em populações do Pantanal da Nhecolândia e da região de transição com o Cerrado foi maior em relação à divergência ao haplótipo de *L. dasycarpum*. Os testes de neutralidade não foram significativos e o AMOVA resultou em uma alta diferenciação entre populações. Os dados de modelagem indicam que *L. elegans* possuía uma distribuição reduzida no Último Máximo Glacial, concentrada na região de transição entre o Pantanal e o Cerrado. As análises ecológicas e as morfométricas de *L. elegans* e *L. dasycarpum* sugerem que é possível diferenciá-las pela morfologia dos caracteres vegetativos,

entretanto, alguns indivíduos da região de contato apresentam características intermediárias o que sugere hibridação interespecífica recente.

**Conclusões principais:** Apesar de incipientes, os dados obtidos começam a traçar a história evolutiva das espécies arbóreas da região. Os dados genéticos e geográficos indicam que, aparentemente, a região transicional possibilitou uma certa estabilidade demográfica para a espécie e a diferenciação de linhagens específicas do Pantanal.

**Palavras-chave:** Fabaceae; Cerrado; Pantanal; filogeografia; morfometria; modelagem de distribuição.

## ABSTRACT

**Aim:** To assess the evolutionary history of *Leptolobium elegans* through genetic, geographic and morphological analyzes.

**Location:** Central Brasil, transition region between Cerrado and Pantanal.

**Methods:** Genetic analysis: field sample collection, extraction of DNA from young leaves and amplification of non-coding regions from plastid DNA (intergenic spacers *trnH-psbA*, *trnL-trnF*, *PSBC-trnS1* and *trnL* gene *intron*). Geographical analysis: geographic distribution modeling via MAXENT software for the present and the Last Glacial Maximum (LGM). In addition, Principal Component Analysis was performed, to compare ecological and morphometric data of *L. elegans* and *L. dasycarpum*, related specie typical from Cerrado, using occurrence data and specimens from several Brazilian herbaria.

**Results:** Between four tested markers, *trnH-psbA* was the only one that showed intraspecific variation, in 48 sequences analyzed from 15 populations, enabling the determination of four haplotypes. These were compared to one *L. dasycarpum* haplotype. Surprisingly, the divergence between the most frequent haplotypes of *L. elegans* and the haplotype of populations from Pantanal of Nhecolândia and the transition region of Cerrado was higher compared to *L. dasycarpum* haplotype divergence. Neutrality tests were not significant and AMOVA resulted in a high differentiation among populations. The modeling data indicate that *L. elegans* had a reduced distribution in Last Glacial Maximum, concentrated in Cerrado-Pantanal transition region. Environmental and morphometric analyses suggest that it is possible to differentiate them with vegetative characters morphology. However, some individuals in the contact region have intermediate characteristics, suggesting recent interspecific hybridization.

**Main conclusions:** Although it is soon to affirm, the data begin to trace the evolutionary history of tree species in the region. The genetic and geographic data indicate that, apparently,

the transitional region allowed a certain demographic stability for the species and differentiation of Pantanal specific lineages.

**Key words:** Fabaceae; Cerrado; Pantanal; phylogeography; morphometrics; distribution modeling.

## INTRODUÇÃO

O Cerrado compõe uma das mais diversas e abrangentes formações vegetacionais do centro do continente sul-americano, predominante no Brasil Central (cerca de dois milhões de quilômetros quadrados; Ratter, 1992). É formado por diversas fitofisionomias, desde florestas e savanas até campos abertos (Eiten, 1972). Assim como é bem documentado para outras formações vegetacionais, a distribuição das espécies de Cerrado foi bastante alterada durante as oscilações climáticas que ocorrem durante o período Quaternário (Behling, 2002).

Estudos palinológicos sugerem que no último máximo glacial o Cerrado expandiu ao norte de sua área de ocupação atual, enquanto a porção sul, devido às frequentes geadas da região, foi coberta por campos (Behling & Lichte, 1997). Já durante o início do Holoceno (11,7 mil anos atrás - ka), a área de ocupação do Cerrado teria sido maior e mais contínua que atualmente (Behling & Hooghiemstra, 2001). Os mesmos autores sugerem que, ao final desse mesmo período, a distribuição do Cerrado já era parecida com a de hoje. Além das alterações climáticas, outros fatores podem ter influenciado a origem e a atual distribuição das espécies do Cerrado. Nas várias teorias propostas, o fogo e o tipo de solo também teriam atuado como fatores na seleção das espécies (Pinheiro & Monteiro, 2010). Outro possível fator de influência é o intercâmbio de espécies das Florestas Atlântica e Amazônica, que teriam estendido suas extensões sobre o domínio do Cerrado nos períodos de temperatura mais elevada, enquanto elementos da Caatinga e do Chaco expandiam seus domínios nos períodos frios e secos (Pennington *et al.*, 2000).

Em todo o mundo, a filogeografia tem recontado a história evolutiva de diversas espécies num contexto espacial e temporal (Avice, 2009), sendo possível, nas regiões melhores estudadas, estabelecer um panorama claro da influência das alterações ambientais sobre a diversidade genética das populações (Beheregaray, 2008). Entre os estudos filogeográficos realizados com espécies arbóreas e arbustivas do Cerrado podemos destacar os trabalhos com *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae; Collevatti *et al.*, 2003); *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae, Leguminosae; Novaes *et al.*, 2010); *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae, Caesalpinioideae; Ramos *et al.*, 2007); *Hymenaea courbaril* (Ramos *et al.*, 2009), *Lychnophora ericoides* (Asteraceae; Collevatti *et al.*, 2009); *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae; Collevatti *et al.*, 2012a). Os estudos filogeográficos de diferentes espécies vegetais do Cerrado citados acima apontam que, apesar de muito ainda a ser feito, dada sua grande biodiversidade, já é possível identificar padrões filogeográficos congruentes. Isto indica que as populações desta ampla formação vegetal estiveram sujeitas à pressões seletivas semelhantes e em resposta, principalmente as alterações climáticas do Quaternário, mudaram sua distribuição geográfica e seus padrões de fluxo gênico interpopulacional levando a diferenciação de diversas linhagens evolutivas.

É possível observar uma estruturação genética que diferencia grupos de populações do norte, do sul e do centro no que é a atual distribuição do Cerrado. Esse padrão indica que, assim como é bem documentado para a Mata Atlântica (Carnaval *et al.*, 2009), o Cerrado também experimentou períodos de expansão e retração de seus domínios, levando ao isolamento entre grupos e a formação de diferentes linhagens intraespecíficas. Também em comum, alguns trabalhos sugerem que ao sul o Cerrado foi substituído por campos nos períodos mais frios e secos, sendo recolonizado recentemente, dada sua menor diversidade de haplótipos e que estes são derivados das populações centrais (Werneck, 2011). Apesar de

116 todos esses estudos, o Cerrado ainda é uma formação vegetal pouco conhecida  
117 filogeograficamente, frente à sua biodiversidade (Beheregaray, 2008; Werneck, 2011),  
118 especialmente em relação a região transicional com o Pantanal.

119 O Pantanal tem distribuição adjacente ao Cerrado e é considerado a maior planície  
120 contínua de inundação do planeta, cobrindo cerca de 140.000 km<sup>2</sup> do Centro-Oeste brasileiro  
121 (Brasil, 1997). A flora do Pantanal agrega espécies de ampla distribuição e de províncias  
122 fitogeográficas, tais como o Cerrado, florestas estacionais, Chaco, Amazônia e Mata  
123 Atlântica, possuindo apenas sete plantas endêmicas, pertencente as famílias Leguminosae,  
124 Boraginaceae, Amaryllidaceae, Asteraceae e Araceae (Pott *et al.*, 2011). Assim como para o  
125 Cerrado, há evidências palinológicas da influência das flutuações climáticas pleistocênicas  
126 sobre a distribuição das espécies vegetais do Pantanal (Whitney *et al.* 2011). Whitney e  
127 colaboradores (2011) constataram que diversas espécies adaptadas a climas secos ocorreram  
128 na região durante o último período glacial, e encontraram evidências de que a elevação da  
129 temperatura e a maior quantidade de chuvas durante o Holoceno aumentaram os níveis da  
130 água do lago analisado, levando ao alagamento da região. Estudos filogeográficos para o  
131 Pantanal são ainda mais raros, e apenas com animais. Estes estudos demonstram que as  
132 populações do Pantanal não apresentam divergências genéticas significativas com populações  
133 de outras partes do continente americano (Marquéz *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2007).

134 *Leptolobium elegans* Vogel. (Leguminosae, Papilionoideae) é uma espécie arbórea  
135 cuja distribuição é adequada para avaliar a dinâmica evolutiva das espécies ocorrentes na  
136 região de transição entre o Cerrado e o Pantanal. Esta espécie ocorre em diferentes  
137 fitofisionomias do Cerrado, de campos a savanas (Rodrigues & Tozzi, 2012), e em áreas  
138 pouco ou não alagáveis do Pantanal (Pott & Pott, 1994). Sua distribuição geográfica inclui o  
139 nordeste da Argentina, sudeste do Paraguai e centro do Brasil, nesse último nos estados de

140 Goiás (GO), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), São Paulo  
141 (SP) e Paraná (PR; Rodrigues & Tozzi, 2012). *Leptolobium elegans* possui história  
142 taxonômica complexa, especialmente no que se refere à sua distinção morfológica de  
143 *Leptolobium dasycarpum* Vogel, espécie de ampla distribuição no Cerrado (Rodrigues &  
144 Tozzi, 2012).

145 Com o objetivo de auxiliar na compreensão da história evolutiva das espécies que  
146 ocorrem na região de transição Cerrado-Pantanal, esse estudo avaliou a estrutura  
147 filogeográfica de *Leptolobium elegans* e comparou os padrões morfológicos e ambientais  
148 desta espécie com *L. dasycarpum*, espécie filogeneticamente relacionada com ampla  
149 distribuição pelo Cerrado.

150

## 151 MATERIAIS E MÉTODOS

### 152 Coleta de material biológico, extração e amplificação do DNA

153 As populações de *Leptolobium elegans* estudadas foram amostradas em áreas de  
154 Cerrado e Pantanal, dando ênfase as regiões transicionais entre estas formações vegetacionais.  
155 De cada indivíduo foram coletadas folhas para as análises genéticas, as quais foram  
156 armazenadas em sílica gel para dessecamento. Para a extração de DNA foi utilizado CTAB  
157 (brometo de cetiltrimetilamônio) e um protocolo adaptado de Roy (1992). O DNA extraído  
158 foi avaliado através da eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com GelRed™  
159 e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

160 Foram amplificados por PCR as seguintes regiões não codificantes do DNA plastidial:  
161 espaçadores intergênicos *trnH-psbA* (Hamilton, 1999), *psbC-trnS<sub>I</sub>* (Demesure *et al.*, 1995),  
162 *trnF-trnL* e íntron do gene *trnL* (Taberlet *et al.*, 1991). Nas amplificações dos quatro  
163 marcadores foram utilizadas as seguintes condições: 10 ng de DNA molde; tampão 1X

(Invitrogen); 200  $\mu$ M dNTP; 0,2  $\mu$ M de cada *primer*; 2  $\mu$ M de cloreto de magnésio; 1 unidade de *Taq* polimerase (Invitrogen). As amplificações foram realizadas em termociclador automático Eppendorf, sendo a desnaturação inicial de 95°C por 2min, seguida de 30 ciclos de 95°C por um minuto, 55° (*trnH-psbA*), 56°C (*trnL-trnF* e *psbC-trnS<sub>I</sub>*) e 58° (*íntron trnL*) por 1 min, 72°C por um minuto e a extensão final de 72°C por 5 min.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com GelRed<sup>TM</sup> e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta, para quantificação com *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados com a enzima ExoSAP-IT (USB). O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI PRISM 3100 (*Applied Biosystems*) conforme os protocolos do fabricante.

#### *Análise das sequências*

As sequências foram alinhadas manualmente utilizando o programa MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011). Os haplótipos gerados foram determinados através do programa DnaSP 5.10.1 (Librado & Rozas, 2009). Os cálculos dos índices de diversidade e a análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) foram realizados através do *software* Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer, 2010), assim como os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e  $F_S$  de Fu (Fu, 1997). Para fins de comparação, foi utilizada uma sequência de *Leptolobium dasycarpum* produzida por nosso grupo de pesquisa. Todas as sequências obtidas serão depositadas no GenBank.

#### *Modelagem de distribuição potencial e análise de nicho ecológico*

Para estimar os padrões de ocorrência de *L. elegans* ao longo do tempo, durante as principais alterações climáticas recentes, foram feitas análises de distribuição potencial atual e

189 durante o Último Máximo Glacial (UMG – ca. 21 ka). Para tanto, foram utilizadas  
190 coordenadas das populações amostradas neste estudo e de registros de ocorrência disponíveis  
191 no sítio *Specieslink* (<http://splink.cria.org.br/>). Para esta análise foram considerados 126 dados  
192 de presença de *L. elegans* (Apêndice S1), sendo 33 desses pontos relativos as coletas do  
193 presente trabalho.

194 Foram utilizados os dados climáticos do BIOCLIM (*Bioclimatic Variables*), que  
195 constituem 19 variáveis climáticas (Apêndice S2), disponíveis no *WorldClim* (Hijmans *et al.*,  
196 2005; [http:// worldclim.org](http://worldclim.org)). O cenário criado para os dados do presente foram então  
197 extrapolados para as condições climáticas do passado, para modelar a distribuição potencial  
198 através dos cenários MIROC (*Model for Interdisciplinary Research on Climate*; Hasumi &  
199 Emori, 2004) e CCSM (*Community Climate System Model*; Shin *et al.*, 2003). As 19 variáveis  
200 climáticas nesses dois cenários também foram retiradas do *Worldclim* (Hijmans *et al.*, 2005).  
201 Foram desenvolvidos três modelos de distribuição geográfica de *L. elegans*: um do presente,  
202 um para CCSM e um para MIROC. Ambos os modelos são bastante utilizados em  
203 modelagens do UMG (Alba-Sánchez *et al.*, 2010; Quiroga *et al.*, 2012).

204 Os modelos foram gerados pelo software MAXENT 3.3.3k (Phillips *et al.*, 2006), que  
205 utiliza o método da Máxima Entropia (Jaynes, 1957). O programa foi escolhido por funcionar  
206 bem com poucos dados de presença, utilizar apenas registros de ocorrência, por combinar  
207 variáveis contínuas e categóricas e por controlar ajustamentos excessivos da distribuição  
208 (Quiroga *et al.*, 2012).

209 Foram realizadas 100 simulações no MAXENT, para obter um melhor ajuste do  
210 modelo. Dos dados de presença, 30% foram utilizados para validação interna e o restante,  
211 para construção do modelo. Para criar os dados binários de presença e ausência extrapolados  
212 pelo programa, foi estabelecido um limiar onde 90% dos dados seriam necessários para

definir um habitat que pode ser utilizado pela espécie. Não existe uma regra de como optar por um valor de limiar, dependendo da confiabilidade dos dados de presença utilizados (Liu *et al.*, 2005). No caso do presente trabalho, o alto valor de limiar foi para garantir uma distribuição potencial mais confiável.

A forma de avaliação dos modelos foi a análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) através da área abaixo da curva (*Area Under De Curve* - AUC), realizada pelo próprio MAXENT. O AUC varia de zero a um, sendo que os valores próximos a um indicam alto desempenho do modelo (Hanley & McNeil, 1982).

Os dados ecológicos obtidos a partir do pacote BIOCLIM foram utilizados como mais uma ferramenta para auxiliar na compreensão dos padrões espaciais e das diferenças entre *L. elegans* e *L. dasycarpum*. Foram extraídos os valores de altitude e 19 variáveis climáticas das mesmas coordenadas geográficas utilizadas na modelagem de distribuição atual de *L. elegans* e *L. dasycarpum* através do programa Diva GIS 7.5.0 (<http://www.diva-gis.org/>).

Uma Análise de Componentes Principais (PCA; Pearson, 1991) foi realizada com essa matriz de dados, baseada numa matriz de correlação com o método de Spearman (Spearman, 1904), pois as medidas são em unidades distintas, no software R (R Development Core Team, 2010). Os dois primeiros componentes principais gerados foram plotados em um gráfico e a variação entre eles comparada. O intuito dessa análise é determinar se as espécies diferem quanto ao nicho ecológico que ocupam.

### *Morfometria*

A complexa taxonomia de *Leptolobium elegans* e *L. dasycarpum* já indica que há grande variação intraespecífica ao longo das suas áreas de ocorrência e que, para alguns autores, elas são difíceis de diferenciar morfologicamente (Rodrigues & Tozzi, 2012). Para

auxiliar na compreensão destes padrões foram realizadas análises de dados morfométricos com exsicatas de ambas as espécies. As exsicatas utilizadas foram obtidas pelo presente projeto e através de empréstimos dos seguintes herbários: CGMS, CPAP (MS), MBML (ES), FLOR, FURB (SC), HCF (PA), SPFS (SP), EAC (CE). Para tanto, as exsicatas foram digitalizadas através do scanner HP Scanjet G4050 com resolução de 300 dpi.

Foram medidas a área, o perímetro, a altura e a largura da lâmina dos folíolos, a forma do folíolo, além do comprimento do peciólulo de todos os folíolos que se encontravam completamente visíveis nas exsicatas, sem distinção de posição, no programa *ImageJ* (Abramoff *et al.*, 2004). A forma dos folíolos foi calculada como o perímetro sobre a raiz quadrada da área, chamada de Índice de Dessecação (Kincaid & Schneider, 1983). Esses caracteres foram selecionados baseados na descrição das espécies de Rodrigues & Tozzi (2012), como caracteres vegetativos que ajudam a distinguir as duas espécies. Os caracteres reprodutivos não foram utilizados nas análises devido ao número reduzido de flores e frutos presentes nas exsicatas utilizadas.

Para cada indivíduo foi calculada a média das medidas para cada uma das características, utilizando-se todos os folíolos em boas condições de cada exsicata. Com os valores médios das medidas por indivíduo, das seis características selecionadas, foi realizada uma PCA (Pearson, 1991) com correlação de Spearman (Spearman, 1904), no software R (R Development Core Team, 2010).

## RESULTADOS

As coletas ocorreram entre julho de 2011 e junho de 2012. Durante este período, observou-se que as plantas perdem as folhas no final da estação seca, entre agosto e outubro. Foram amostradas 353 plantas em 33 populações nos Estados de MS, GO e SP, das quais

foram analisados 48 indivíduos de 15 populações (Fig. 1, Tab. 1). Entre duas e 26 plantas foram amostradas por localidade.

#### *Análises filogeográficas*

Foram obtidas 13 sequências do espaçador *psbC-trnS<sub>I</sub>*, 11 do íntron *trnL* e seis do *trnL-trnF*. Para o marcador *trnH-psbA* foram obtidas 48 sequências de *L. elegans* e uma de *L. dasycarpum*. As informações gerais sobre as sequências geradas estão na Tabela 2.

Até o momento foi detectada variação intraespecífica apenas na região *trnH-psbA*, que apresentou o comprimento total de 316 pb. Foram encontrados três sítios polimórficos: uma região Poli A/T, entre os sítios 134 e 145, com oito, nove, 10 ou 12 repetições; uma transversão no sítio 244; e uma duplicação de sete nucleotídeos que se inicia no sítio 247. Uma transição no sítio 237 foi encontrada na comparação entre as sequências de *L. elegans* e *L. dasycarpum*.

Estes polimorfismos detectaram cinco haplótipos. Os haplótipos 1 e 2 foram os mais comuns, ambos ocorrendo em quatro populações do Cerrado. O haplótipo 3 ocorreu apenas na população 6, que é de Aquidauana. O haplótipo 4 ocorreu no Pantanal da Nhecolândia e na região de transição e o haplótipo 5 pertence a *L. dasycarpum* (Fig. 2). O haplótipo 5 apresenta apenas uma transição que o diferencia das sequências de *L. elegans*, enquanto o haplótipo 4 pois possui diferenças na região poli A/T, na região de duplicação além de uma transversão em relação aos haplótipos 1, 2 e 3.

Os testes de neutralidade D de Tajima e  $F_S$  de Fu não foram significativos e portanto, com os dados obtidos até o momento, não há indícios de expansão populacional recente em *L. elegans*. A AMOVA revelou que 67,01% da variação encontrada entre as sequências

correspondem à variação entre as populações ( $\Phi_{ST} = 0,67$   $p=0,01$ ), enquanto que 32,99% são relativos à variação intrapopulacional.

### *Modelagem de distribuição potencial e análise de nicho ecológico*

Foram gerados modelos de distribuição geográfica potencial atual e no UMG para *L. elegans* (Fig. 3). Os modelos apresentaram altos valores de AUC (0,994), e a variável mais importante foi a precipitação do trimestre mais quente (média de 21,6%).

A distribuição atual estimada para *L. elegans* incluiu os Estados de MS, MT, MG, SP, GO, PR, ES (Espírito Santo) e RJ (Rio de Janeiro), além de partes do Paraguai, onde ocorre principalmente na porção sul do Cerrado. Algumas regiões do Pantanal, próximas a borda de transição com o Cerrado também foram incluídas. A distribuição potencial avançou para a Mata Atlântica, pois alguns pontos de ocorrência foram coletados no que é considerado área atual desse domínio.

A distribuição encontrada para o cenário MIROC foi mais ampla e contínua no UMG. O cenário não incluiu o Pantanal como região de possível ocorrência. Partes da área da atual Mata Atlântica também são incluídas no cenário. Já para o CCSM, a distribuição se concentrou no MS, incluindo o Pantanal. A distribuição foi descontínua, com pequenas manchas nas regiões sul e sudeste do Cerrado, e na região do que é a atual Floresta Atlântica.

Como visto acima, os mapas dos cenários CCSM e MIROC não foram completamente congruentes. Em comum, podemos destacar que ambos modelos apresentam uma parte da região leste e central do estado de MS como local onde *L. elegans* poderia ter ocorrido no UMG, em especial a região de transição entre o Pantanal e o Cerrado. A região sudoeste do estado de GO e manchas no estado de Minas Gerais também foram congruentes em ambos cenários.

A PCA realizada com os dados climáticos do BIOCLIM revelou uma sobreposição no nicho fundamental de ambas espécies (Fig. 4), porém não totalmente. Os dois primeiros componentes da análise de PCA totalizaram 72,10% da variação, sendo o primeiro responsável por 43,71% desta.

As espécies apresentaram valores semelhantes para os 19 dados climáticos do pacote BIOCLIM. Porém, para BIO18 – precipitação no trimestre mais quente – e BIO19 – precipitação no trimestre mais frio – esses valores foram discrepantes. As médias para *L. elegans* foram de 531 mm para BIO18 e 153 mm para BIO19; e para *L. dasycarpum*, 376 mm para BIO18 e 123 mm para BIO19.

#### *Análises morfológicas*

Para a análise de morfometria foram utilizadas 91 exsiccatas, 39 de *L. elegans* e 51 *L. dasycarpum*, sendo mensurados de 4 e 39 folíolos em cada uma (Apêndice S3). O Estado de MS foi identificado com a principal região de contato entre as duas espécies, onde foram encontradas populações próximas e, inclusive, possíveis híbridos com características morfológicas intermediárias (população 5, Aquidauana/MS). Sequências oriundas de indivíduos dessa população serão integradas nas análises futuramente. Apesar de haver populações próximas, não foram observados indivíduos de ambas espécies juntos, sendo a distância mínima entre eles de 3 km (população 5).

A análise de PCA demonstrou que na maior parte dos indivíduos analisados há diferenças claras nos caracteres vegetativos de *L. elegans* e *L. dasycarpum*, mas que alguns deles apresentam sobreposição destes caracteres o que pode dificultar a identificação (Fig. 5). Os dois primeiros componentes totalizaram 89,25% da variação, sendo que o primeiro explicou 68,1% da mesma. O peso de cada variação no componente 1 da PCA foi dominado,

em ordem decrescente, pela forma do folíolo (65,55%), seguido pelo comprimento do pecíolulo (27,95%), pelo comprimento (2,57%), perímetro (2,48%), a largura (00,86%) e a área (00,59%) dos folíolos. Já o PC 2 foi a área (23,68%), o perímetro (23,61%), o comprimento (23,08%), a largura (23,02%), sendo todos esses referentes aos folíolos, o comprimento do pecíolulo (6,58%) e a forma do folíolo (0,03%). Isso significa que, entre os caracteres vegetativos, o formato do folíolo e o comprimento do pecíolulo constituem as características que melhor distinguiu as espécies. Os dados também indicam que *L. dasycarpum* tem uma maior variação de formato nos folíolos.

Os indivíduos sobrepostos no centro do gráfico (Fig. 5) são todos do MS. Dois indivíduos de *L. elegans*, também do MS, ficaram entre os indivíduos de *L. dasycarpum*, e um indivíduo de *L. dasycarpum*, do Espítito Santo, ficou entre os de *L. elegans*.

## DISCUSSÃO

### *Integrando dados genéticos e geográficos*

Poucas sequências foram obtidas até o momento, e será necessário um maior número de indivíduos e de populações analisadas para que se possa estabelecer a estrutura filogeográfica de *Leptolobium elegans*. Entretanto, foi possível detectar que a região *trnH-psbA* mostrou ter variabilidade genética adequada para o estudo de *L. elegans* ao longo da sua distribuição. Este marcador está entre os mais utilizados em estudos filogeográficos de plantas, pois apresenta variação intraespecífica em espécies de famílias distintas, como *Lynchnophora ericoides* (Asteraceae; Collevatti *et al.*, 2009), *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae; Collevatti *et al.* 2012a), *Tabebuia impetiginosa* (Bignoniaceae; Collevatti *et al.*, 2012b), e a leguminosa *Schizolobium parahyba* (Caesalpinioideae; Turchetto-Zolet *et al.*, 2012).

Apesar de não ter sido encontrada variação para *L. elegans*, os outros marcadores testados já foram utilizados em trabalhos de filogeografia, incluindo membros da família Leguminosae: *trnL-trnF* com *Plathymenia reticulata* (Leguminosae - Mimosoideae; Novaes *et al.*, 2010) e *Schizolobium parahyba* (Leguminosae - Caesalpinioideae; Turchetto-Zolet *et al.*, 2012); *íntron* do *trnL* com *Dalbergia nigra* (Leguminosae - Papilionoideae; Ribeiro *et al.*, 2010); e *psbC-trnS* com *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae; Ramos *et al.*, 2007) e *H. courbaril* (Ramos *et al.*, 2009). Como poucos indivíduos/populações de *L. elegans* foram sequenciados para estes marcadores, somente seis para *trnL-trnF*, por exemplo, não podemos afirmar se a ausência de variação intraespecífica é devida as baixas taxas evolutivas destas regiões genômicas nesta espécie ou a pequena amostragem analisada.

A modelagem para o presente concordou com a distribuição descrita por Rodrigues & Tozzi (2012) e com a maioria dos dados de coleta de *Leptolobium elegans*. A ausência da espécie em SP, na área próxima ao MS, era esperada, pois ali não foram encontrados indivíduos durante as coletas, nem nos dados de ocorrência utilizados, além de não pertencer ao domínio do Cerrado. As regiões ao sul do MS e ao norte e noroeste do Pantanal também não foram incluídas, corroborando com as coletas realizadas, pois não foram encontrados indivíduos entre a cidade de Dourados (população 18) e a divisa com o PR, e entre as cidades Miranda (população 22) e Corumbá/MS.

Os modelos, presente e do UMG, fizeram algumas previsões superestimadas de distribuição, incluindo áreas onde *Leptolobium elegans* não foi coletada, como ES e RJ. Segundo Carnaval & Moritz (2008), isso não deve ser considerado um desempenho ruim, visto que foi levado em consideração apenas variáveis climáticas, não incluindo outros fatores que influenciam a distribuição de espécies como o solo e a capacidade de dispersão.

As discrepâncias entre as distribuições estimadas pelos modelos MIROC e CCSM já foram encontradas tanto em trabalhos que se propõem a comparar os modelos, como o de Otto-Bliesner e colaboradores (2007), quanto em trabalhos que utilizam mais de um modelo em suas análises (Beatty & Provan, 2011). Estes modelos apresentam diferentes valores para as condições atmosféricas e oceânicas no UMG. Um exemplo disso está na temperatura anual, que para MIROC varia entre 5°C e 2°C graus a menos que a atual, e a de CCSM é entre 2,5°C e 2°C a menos, para a região tropical (Otto-Bliesner *et al.*, 2006; Sueyoshi *et al.*, 2012). O modelo MIROC costuma extrapolar mais os dados quando comparado ao CCSM, resultando em distribuições mais amplas (Otto-Bliesner *et al.*, 2007; Beatty & Provan, 2011; Quironga *et al.*, 2012). Modelos de distribuição costumam variar muito quando extrapolados para cenários do passado ou futuro, por isso é necessário utilizar mais de um método integrado para predições (Thuiller, 2004; Araújo & New, 2007; Carnaval & Moritz, 2008)

Alguns dos pontos de coleta utilizados estão na região da Floresta Atlântica, o que condiz com o descrito por Rodrigues & Tozzi (2012), onde *L. elegans* ocorre também em Floresta Semidecídua. Oliveira-Filho & Fontes (2000) encontraram que a flora arbórea do Cerrado apresenta 55% de semelhança com a Floresta Atlântica, sendo mais relacionada com as florestas semidecíduas que com as florestas úmidas. Nos períodos glaciais, a Floresta Atlântica reduzia, tendo partes do que é a sua área atual invadida por vegetações xeromórficas, como savanas (Behling, 1995; Behling, 2002; Ledru, 2002), o que explicaria a ocorrência da espécie nesse domínio durante o UMG. Dados filogeográficos para a espécie de Floresta Atlântica *Dalbergia nigra* sugerem que a sua área de ocorrência diminuía nesses mesmos períodos, podendo ter sido substituída por Cerrado em alguns pontos (Ribeiro *et al.*, 2011).

Apesar de diferentes, ambos modelos apontam o MS como principal local de ocorrência da espécie. Werneck e colaboradores (2012) obtiveram mapas da área de ocupação do Cerrado em diversos períodos, incluindo o UMG. Apesar de, nesse período, as áreas de Cerrado se expandirem ao norte, é possível distinguir uma região estável de Cerrado (refúgio) no MS que corrobora as estimativas, em ambos cenários, de distribuição de *Leptolobium elegans*.

Entre os haplótipos encontrados nas sequências de *trnH-psbA* observa-se que, o haplótipo 2 é compartilhado pelas populações 2, 4, 13, 32 e 33 do MS e as populações 23 e 33 do SP. A junção desses dados com os dois cenários de modelagem de distribuição sugerem que o centro do MS tenha sido um refúgio para a espécie, onde foi encontrado uma maior diversidade de haplótipos. Como nos estados de SP, MG e PR, *Leptolobium elegans* parece ter ocorrido apenas em pequenas manchas, em ambos modelos, pode-se, com o aumento da amostragem, encontrar evidências de que as populações destas regiões sejam derivadas das populações centrais, como as do MS. Essa padrão de populações do sudeste terem sido recolonizadas por populações do centro-oeste após o UMG já foi encontrado para outras espécies arbóreas do Cerrado como *Caryocar brasiliensis* (Collevatti *et al.*, 2003), *Hymenaea stigonocarpa* (Ramos *et al.*, 2007) e *Plathymenia reticulata* (Novaes *et al.*, 2010).

Estudos palinológicos na região sudeste do país indicam que as temperaturas no local eram 5-7°C mais baixas que no presente, além de possuírem períodos de secas mais longos, e geadas no frio (Behling & Lichte, 1997). Como a precipitação se demonstrou um fator importante para *Leptolobium elegans*, períodos longos de seca seriam limitantes para sua ocorrência. Vale salientar que os dados obtidos até agora são incipientes, e que, com o aumento de dados de sequências, outros padrões poderão surgir.

Os locais de ocorrência atual de *Leptolobium elegans* no Pantanal são regiões de Cerrado, pouco ou não alagáveis, segundo Silva e colaboradores (2000). No UMG, a distribuição de *L. elegans* no Pantanal era relativamente menor que a atual segundo CCSM, e ausente em MIROC. Como no UMG a região do Pantanal era mais seca, atingida por geadas e dominada por gramíneas (Whitney *et al.*, 2011), é possível que a área não fosse favorável à sobrevivência da espécie.

O haplótipo 4 de *trnH-psbA* foi encontrado em plantas do Pantanal da Nhecolândia e em áreas transicionais. Este haplótipo diferenciado (é mais divergente em relação as demais sequências de *Leptolobium elegans* do que o haplótipo de *L. dasycarpum*) pode indicar um período de isolamento. Segundo o modelo CCSM, *L. elegans* ocorria no Pantanal no UMG. Se com a adição de novas sequências este padrão se confirmar, será um dado inédito para região, pois para outros estudos filogeográficos, as espécies apresentaram expansão populacional recente no Pantanal e não apresentam genótipos diferenciados em relação as demais regiões analisadas (Marquéz *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2007).

A AMOVA revelou variação interpoblacional alta e significativa. Como o genoma plastidial é haplóide, o tamanho efetivo populacional é menor que quando considerado o genoma nuclear, o que acelera os processos de deriva genética. Então, o cpDNA pode apresentar diferenciação entre populações ou linhagens divergentes mais rapidamente (Hamilton *et al.*, 2003). Petit e colaboradores (2005) demonstraram que marcadores de DNA de herança materna, cujo fluxo gênico é mediado exclusivamente via a dispersão por sementes, apresentam maior estruturação populacional que os biparentais. A variação entre populações para espécies com dispersão pelo vento, como *Leptolobium elegans*, depende do tamanho da semente, velocidade do vento, características da asa e altura do lançamento, logo espécies com sementes relativamente maiores estariam mais suscetíveis à deriva genética. No

caso de *L. elegans*, a semente possui em torno de 5 mm (Rodrigues & Tozzi, 2012), e não há estudos sobre o alcance da sua dispersão.

#### *Possível hibridação interespecífica*

Nas análises das variáveis ambientais foi possível observar uma sobreposição de nicho entre *Leptolobium elegans* e *L. dasycarpum*. Segundo Webb *et al.* (2002), espécies relacionadas possuem uma grande chance de apresentarem características ecológicas similares. Apesar de ocorrerem em locais similares, durante as coletas, foram encontrados indivíduos de *L. dasycarpum* e *L. elegans* em locais próximos (mínimo 3 km de distância), mas nunca coexistindo lado a lado. Em estudo com comunidades de plantas em florestas da Flórida, foi observado que, quando são utilizadas escalas maiores, aparecem agregações de táxons. Porém, quando observadas em escalas menores, linhagens próximas tendem a se excluir mutuamente (Cavender-Bares *et al.*, 2009), o que pode ser o caso dessas duas espécies de *Leptolobium*.

*Leptolobium elegans* ocorre em uma gama mais variável de climas, segundo a PCA para os dados ambientais (Fig. 4), apesar de *L. dasycarpum* ter a maior distribuição entre as espécies do gênero (Rodrigues & Tozzi, 2012). Isso pode ter relação com a ocorrência de *L. elegans* no Pantanal e até mesmo em alguns pontos transicionais entre o Cerrado e a Mata Atlântica, enquanto *L. dasycarpum* é uma espécie típica de Cerrado.

A análise morfométrica confirmou que os folíolos podem ser utilizados para distinguir *Leptolobium elegans* de *L. dasycarpum*, como descrito por Rodrigues & Tozzi (2012). A morfologia da folha é um dos caracteres mais usados para definir grupos taxonômicos, e a morfometria geométrica tem contribuído nesse ramo (Viscosi & Cardini, 2011). Para as espécies de carvalhos *Quercus affinis* e *Q. laurina* (Fagaceae), por exemplo, dados foliares

474 podem ser usados para avaliar plasticidade fenotípica, além de definir as espécies e seus  
475 híbridos (González-rodríguez & Oyama, 2005). No caso de *L. elegans* de *L. dasycarpum*,  
476 alguns indivíduos ficaram sobrepostos nas análises morfométricas, sendo todos eles do MS,  
477 região de contato entre as espécies. Também foram encontrados indivíduos com  
478 características de ambas espécies durante as coletas, o que podem ser indícios de hibridação.  
479 Hibridações interespecíficas são comuns entre plantas, e geralmente, os híbridos de primeiras  
480 gerações apresentam características de ambas espécies ou intermediárias (Rieseberg &  
481 Ellstrand, 1993; Riesenbergs & Carney, 1998).

482        Possíveis eventos de hibridação interespecífica já foram detectados em outras espécies  
483 de leguminosas arbóreas. Para *Hymenaea stigonocarpa* e *H. courbaril* foi encontrado  
484 compartilhamento entre haplótipos, mas os autores não puderam determinar com precisão se  
485 isto se deve recente divergência entre as espécies ou a hibridação (Ramos *et al.*, 2009). No  
486 gênero *Leucaena* (Leguminosae, Mimosoideae) foram encontradas diversas evidências de  
487 hibridação através de pseudogenes (Hughes *et al.*, 2002). Além de mais sequências de ambas  
488 espécies, a inclusão de marcadores nucleares (de herança biparental) será fundamental para  
489 confirmar a hibridação entre *L. elegans* e *L. dasycarpum* e o quanto isto pode ter influenciado  
490 a história evolutiva de ambas.

491        Dois indivíduos de *Leptolobium elegans* ficaram incluídos no agrupamento de *L.*  
492 *dasycarpum* nas análises morfométricas. Ambos indivíduos possuíam pecíolos curtos quando  
493 comparados aos demais indivíduos da espécie. Porém, ambos possuíam formato dos folíolos  
494 semelhante ao descrito por Rodrigues & Tozzi (2012) para *L. elegans*. O indivíduo de *L.*  
495 *dasycarpum* que foi incluído com *L. elegans* apresentou uma problemática parecida, peciólulo  
496 ligeiramente mais comprido, porém formato dos folíolos coerente com *L. dasycarpum*.

Além das similaridades nos caracteres vegetativos, as flores de *Leptolobium elegans* e *L. dasycarpum* também são semelhantes, com pequenas diferenças no tipo de tricomas do ovário e tamanho das bractéolas (Rodrigues & Tozzi, 2012), sendo ambas são polinizadas por abelhas (Ishara & Maimoni-Rodella, 2011). A floração ocorre em períodos similares, com *L. elegans* florescendo de setembro a fevereiro, e em abril, junho e julho, e *L. dasycarpum* em julho e de outubro a abril (Rodrigues & Tozzi, 2012). Em estudos sobre hibridação, foram encontradas ligações entre a morfologia floral, animais polinizadores e a ocorrência de híbridos (Kimball, 2008).

A baixa diferenciação entre os haplótipos de *L. elegans* e *L. dasycarpum* pode indicar divergência recente entre as duas espécies. A proximidade filogenética entre *Leptolobium elegans* e *L. dasycarpum*, indicada também pela similaridade morfológica, foi confirmada no estudo do clado Bowdichia, onde o gênero se encontra. Este grupo foi analisado através das sequências dos espaçadores internos transcritos ribossomais (ITS), de dois marcadores do cpDNA (*matK*, íntron *trnL*) e de dados morfológicos (Cardoso *et al.*, 2012). Os autores demonstraram que as espécies do gênero que ocorrem em savanas ficaram próximas, com *L. parvifolium* como grupo-irmão de *L. dasycarpum*, e *L. elegans* como grupo irmão de ambas. *L. parviflorum* é semelhante morfológicamente a *L. dasycarpum*, e ocorre apenas no Piauí e Ceará, na Caatinga e na região de transição com o Cerrado (Rodrigues & Tozzi, 2012). Com o aumento da amostragem no número de sequências de *L. elegans* e *L. dasycarpum*, será possível avaliar se há o compartilhamento de haplótipos entre as espécies, e correlacionar este padrão com hibridação ou a retenção de polimorfismo ancestral (Funk & Omland, 2003).

A região de transição entre o Cerrado e o Pantanal parece ter um importante papel na história evolutiva de *Leptolobium elegans*. A grande maioria dos modelos propostos para conservação da biodiversidade prioriza *hotspots*, regiões com alto número de endemismos,

normalmente não incluindo as regiões de transição (Brooks *et al.*, 2006). Entretanto, espécies que possuem populações ocorrendo em vários habitats, podem ter adaptações as diferentes condições ambientais, e não seriam adequadamente protegidas quando conservadas apenas em um tipo de habitat puro (Moritz, 2001). Além disso, áreas transicionais são de grande importância em processos de especiação, pois grande parte da variação adaptativa está concentrada nestas regiões (Smith *et al.*, 2001).

A história evolutiva de *Leptolobium elegans* se associa a biogeografia do Cerrado e do Pantanal, onde, no cenário filogeográfico sul-americano, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas. Apesar de incipientes, os dados obtidos começam a traçar a história evolutiva das espécies arbóreas da região de transição Cerrado-Pantanal. A inclusão de sequencias de mais indivíduos e populações de diferentes localidades, além de novos marcadores, será fundamental para desvendar os padrões genético-espaciais desta região transicional marcante onde ocorrem grandes transformações sazonais da paisagem.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdi, H. & Williams, L.J. (2010). Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, **2**(4), 433-459.
- Abramoff, M.D.; Magalhães, P.J. & Ram, S.J. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**, 36–42. [Disponível em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>]
- Alba-Sánchez, F.; López-Sáez, J.A.; Pando, B.B.; Linares, J.C.; Nieto-Lugilde, D. & López-Merino, L. (2010) Past and present potential distribution of the Iberian *Abies* species: a phytogeographic approach using fossil pollen data and species distribution models. *Diversity and Distributions*, **16**, 214–228.

- 544 Araújo, M.B. & New, M. (2007) Ensemble forecasting of species distributions. *Trends in*  
 545 *Ecology & Evolution*, **22**, 42–47.
- 546 Avise, J.C. (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, **36**, 3-  
 547 15.
- 548 Beatty, G.E. & Provan, J. (2011) Phylogeographic analysis of North American populations of  
 549 the parasitic herbaceous plant *Monotropa hypopitys* L. reveals a complex history of  
 550 range expansion from multiple late glacial refugia. *Journal of Biogeography*, **38**,  
 551 1585–1599.
- 552 Beheregaray, L.B. (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the  
 553 challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular ecology*, **17**, 3754–74.
- 554 Behling, H. & Hooghiemstra, H. (2001) Neotropical Savanna Environments in Space and  
 555 Time: Late Quaternary. *Interhemispheric climate linkages* (ed. by V. Markgraf), pp.  
 556 307–323. Academic Press, Oxford.
- 557 Behling, H. & Lichte, M. (1997) Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times  
 558 in tropical southeastern Brazil. *Quaternary Research*, **48**, 348–358.
- 559 Behling, H. (1995) A high resolution Holocene pollen record from Lago do Pires, SE Brazil:  
 560 vegetation, climate and fire history. *Journal of Paleolimnology*, **14**(3), 253–268.
- 561 Behling, H. (2002) South and southeast Brazilian grasslands during late Quaternary times: a  
 562 synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **177**, 19–27.
- 563 Borchert, R.; Rivera, G. & Hagnauer, W. (2002) Modification of vegetative phenology in a  
 564 tropical semi-deciduous forest by abnormal drought and rain. *Biotropica*, **34**(1), 27–39.

- 565 Brasil (1997) *Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal*,  
 566 *Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai, PCBAP*. PNMA, Brasília.
- 567 Brooks, T.M.; Mittermeier, R.A.; da Fonseca, G.A.; Gerlach, J.; Hoffmann, M.; Lamoreux, J.  
 568 F.; Mittermeier, C.G. & Rodrigues, A. S. (2006) Global biodiversity conservation  
 569 priorities. *Science*, **313**(5783), 58-61.
- 570 Cardoso, D.L.; Cavalcante, H.; Rodrigues, R.S.; De Queiroz, L.P.; Pennington, R. T. & Lavin,  
 571 M.(2012) The Bowdichia clade of Genistoid legumes: Phylogenetic analysis of  
 572 combined molecular and morphological data and a recircumscription of *Diploptropis*.  
 573 *Taxon*, **61**(5), 1074–1087.
- 574 Carnaval, A.C. & Moritz, C. (2008) Historical climate modelling predicts patterns of current  
 575 biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, **35**, 1187–1201.
- 576 Carnaval, A.C.; Hickerson, M.J.; Haddad, C.F.B.; Rodrigues, M.T. & Moritz, C. (2009)  
 577 Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science*,  
 578 **323**, 785-789.
- 579 Cavender-Bares, J.; Keen, A. & Miles, B. (2006) Phylogenetic structure of Floridian plant  
 580 communities depends on taxonomic and spatial scale. *Ecology*, **87**(7), 109-122.
- 581 Collevatti, R.G.; Castro, T.G.; Lima, J.S. & Telles, M.P.C. (2012a) Phylogeography of  
 582 *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae), an endangered tree species  
 583 from rocky savannas, suggests bidirectional expansion due to climatecooling in the  
 584 Pleistocene. *Ecology and Evolution*, **2**(5), 1024–1035.
- 585 Collevatti, R.G.; Grattapaglia, D. & Hay, J.D. (2003) Evidences for multiple maternal  
 586 lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the

- 587 analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation.  
588 *Molecular Ecology*, **12**, 105–115.
- 589 Collevatti, R.G.; Rabelo, S.G. & Vieira R.F. (2009) Phylogeography and disjunct distribution  
590 in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae) an endangered cerrado shrub species. *Annals of*  
591 *Botany*, **104**, 655-664.
- 592 Collevatti, R.G.; Terribile, L.C.; Lima-Ribeiro, M.S.; Nabout, J.C.; Oliveira, G.; Rangel, T.F.;  
593 Suelen G.R. & Diniz-Filho, J.A. (2012b). A coupled phylogeographical and species  
594 distribution modelling approach recovers the demographical history of a Neotropical  
595 seasonally dry forest tree species. *Molecular ecology*, **21**(23), 5845-5863.
- 596 Demesure, B.; Sodzi, N. & Petit, R.J. (1995) A set of universal primers for amplification of  
597 polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants.  
598 *Molecular Ecology*, **4**, 129–131.
- 599 Eiten, G. (1972) The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Reviews*, **38**, 201:341.
- 600 Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to  
601 perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology*  
602 *Resources*, **10**, 564-567.
- 603 Excoffier, L.; Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred  
604 from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial  
605 restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- 606 Fu, Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth,  
607 hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**(2), 915-925.

- 608 Funk, D.J. & Omland, K.E. (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes,  
609 and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of*  
610 *Ecology and Systematics*, **34**, 397–423.
- 611 González-Rodríguez, A. & Oyama, K.E.N. (2005) Leaf morphometric variation in *Quercus*  
612 *affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two hybridizing Mexican red oaks. *Botanical*  
613 *Journal of the Linnean Society*, **147**, 427–435.
- 614 Hamilton, M.B. (1999) Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic  
615 regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, **8**, 521–523.
- 616 Hamilton, M.B.; Braveman, J.M. & Soria-Hernanz, D.F. (2003) Patterns and relative rates of  
617 nucleotide and insertions/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in  
618 New World species of the Lecythidaceae. *Molecular Biology and Evolution*, **20**, 1710-  
619 1721.
- 620 Hanley, J.A. & McNeil, B.J. (1982) The meaning and use of the area under a receiver  
621 operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*, **143**, 29–36.
- 622 Hasumi, H. & Emori, S. (2004) K-1 coupled gcm (miroc) description. *K-1 Model Developers*  
623 *Technical Report*, **1**, 34.
- 624 Hijmans, R.J.; Cameron, S.E.; Parra, J.L.; Jones, P.G. & Jarvis, A. (2005) Very high  
625 resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. Journal of*  
626 *Climatology*, **25**, 1965–1978. [Disponível em: <http://www.worldclim.org>].
- 627 Hughes, C.E.; Bailey, C.D. & Harris, S.A. (2002) Divergent and reticulate species  
628 relationships in *Leucaena* (Fabaceae) inferred from multiple data sources: insights into

- 629 polyploid origins and nrDNA polymorphism. *American Journal of Botany*, **89**(7),  
630 1057-1073.
- 631 Ishara, K.L. & Maimoni-Rodella, R.C.S. (2011) Pollination and Dispersal Systems in a  
632 Cerrado Remnant (Brazilian Savanna) in Southeastern Brazil. *Brazilian Archives Of*  
633 *Biology And Technology*, **54**(3), 629-642.
- 634 Jaynes, E.T. (1957) Information theory and statistical mechanics. *Physical review*, **106**, 620-  
635 630.
- 636 Kimball, S. (2008) Links between floral morphology and floral visitors along an elevational  
637 gradient in a *Penstemon* hybrid zone. *Oikos*, **117**, 1064–1074.
- 638 Kincaid, D.T. & Schneider, R.B. (1983) Quantification of leaf shape with a microcomputer  
639 and Fourier transform. *Canadian Journal of Botany*, **61**, 2333–2342.
- 640 Ledru, M.P. (2002) Late Quaternary history and evolution of the cerradões as revealed by  
641 palynological records. *The cerrado of Brazil: ecology and natural history of a*  
642 *Neotropical savanna* (Ed by Oliveira, P.S. & Marquis, R.J.), pp 33-50. Columbia  
643 University Press, New York.
- 644 Librado, P. & Rozas, J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA  
645 polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- 646 Liu, C.; Berry, P.M.; Dawson, T.P. & Pearson, R.G. (2005) Selecting thresholds of  
647 occurrence in the prediction of species distributions. *Ecography*, **28**(3), 385-393.
- 648 Lopes, I.F.; Miño, C.I. & Del Lama, S.N. (2007) Genetic diversity and evidence of recent  
649 demographic expansion in waterbird populations from the Brazilian Pantanal.  
650 *Brazilian Journal of Biology*, **67**, 849-857.

- 651 Loveless, M.D. & Hamrick, J.L. (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant  
652 populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **15**, 65-95.
- 653 Loveless, M.D. (1992). Isozyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization.  
654 *New Forests*, **6**(1), 67-94.
- 655 Marquéz, A.; Maldonado, J.E.; Gonzalez, S.; Beccaceci, M.D.; Garcia J.E. & Duarte, J.M.B.  
656 (2006) Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered marsh  
657 deer (*Blastocerus dichotomus*) from the Río de la Plata Basin. *Conservation Genetics*,  
658 **7** (4), 563-575.
- 659 Moritz, C. (2001). Biodiversity hotspots and beyond: the need for preserving environmental  
660 transitions. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**(8), 431.
- 661 Novaes, R.M.L.; Lemos-Filho, J.P.; Ribeiro, R.A. & Lovato, M.B. (2010) Phylogeography of  
662 *Phathymenia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion  
663 towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America.  
664 *Molecular Ecology*, **95**, 985-998.
- 665 Oliveira, L.O.; Rossi, A.A.B.; Martins, E.R.; Batista, F.R.C. & Silva, R.S. (2010) Molecular  
666 phylogeography of *Carapichea ipecacuanha*, an amphitropical shrub that occurs in the  
667 understory of both semideciduous and evergreen forests. *Molecular Ecology*, **19**,  
668 1410–1422.
- 669 Oliveira-Filho, A.T. & Fontes, M.A.L. (2000) Patterns of floristic differentiation among  
670 Atlantic forests in southeastern Brazil, and the influence of climate. *Biotropica*,  
671 **32**(4b), 793-810.

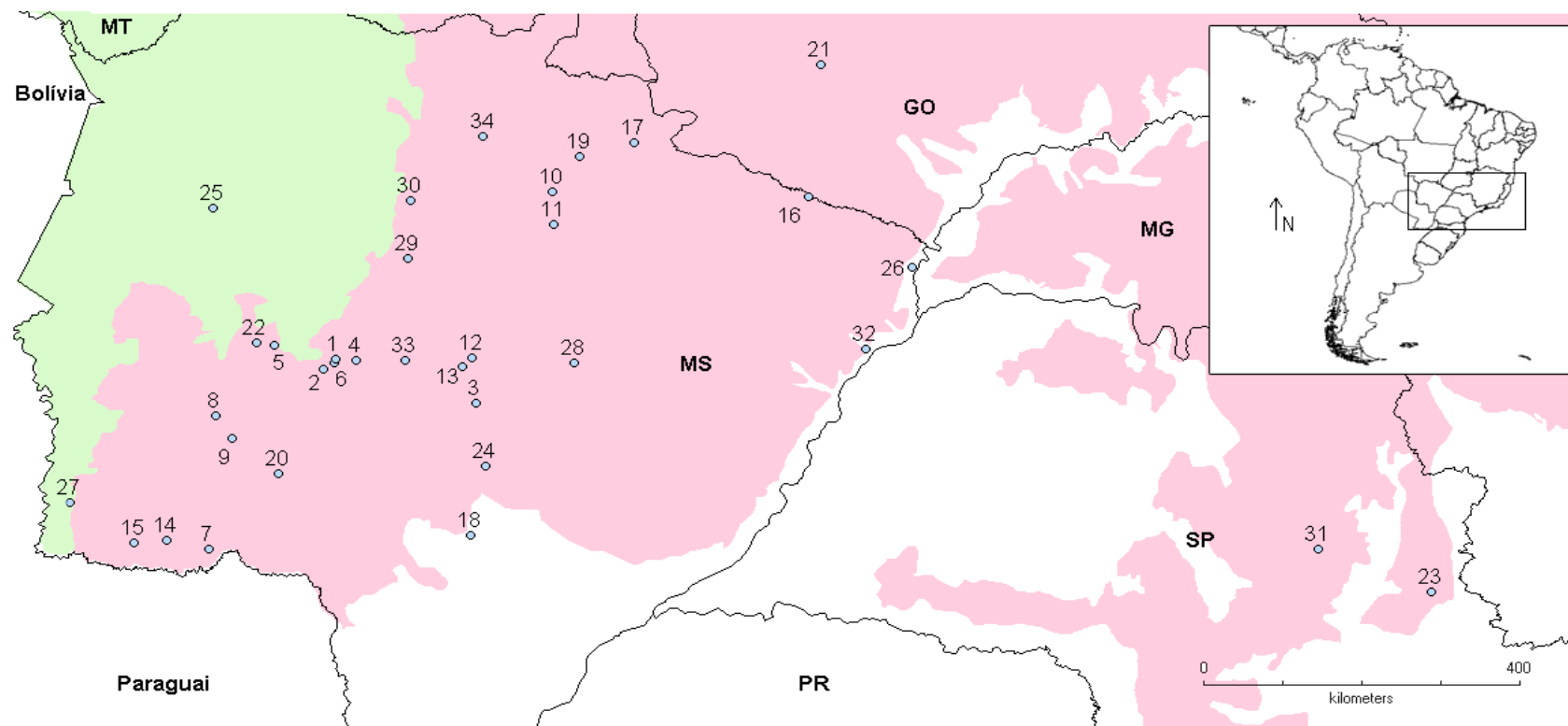
- 672 Otto-Bliesner, B.L.; Brady, E.C.; Clauzet, G.; Tomas, R.; Levis, S. & Kothavala, Z. (2006)  
 673 Last Glacial Maximum and Holocene Climate in CCSM3. *Journal of Climate*, **19**,  
 674 2526–2544.
- 675 Otto-Bliesner, B.L.; Hewitt, C.D.; Marchitto, T.M.; Brady, E.; Abe-Ouchi, A.; Crucifix, M.;  
 676 Murakami, S. & Weber, S.L. (2007). Last Glacial Maximum ocean thermohaline  
 677 circulation: PMIP2 model intercomparisons and data constraints. *Geophysical*  
 678 *research letters*, **34**(12), L12706.
- 679 Pearson, K. (1991) On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space.  
 680 *Philosophical Magazine*, **2**(11): 559–572.
- 681 Pennington, T.R.; Prado, D.E. & Pendry, C.A. (2000). Neotropical seasonally dry forests and  
 682 Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography*, **27**(2), 261-273.
- 683 Phillips, S.J.; Anderson, R.P. & Schapire, R.E. (2006) Maximum entropy modeling of species  
 684 geographic distributions. *Ecological Modeling*, **190**, 231-259.
- 685 Pinheiro, M.H.O. & Monteiro, R. (2010) Contribution to the discussions on the origin of the  
 686 cerrado biome: Brazilian savanna. *Brazilian Journal of Biology*, **70**, 95-102.
- 687 Pott, A. & Pott, V.J. (1994) *Plantas do Pantanal*. Embrapa, Brasília.
- 688 Pott, A.; Oliveira, A.; Damasceno-Junior, G. & Silva, J. (2011) Plant diversity of the Pantanal  
 689 wetland. *Brazilian journal of biology*, **71**, 265–273.
- 690 Quiroga, M.P.; Pacheco, S.; Malizia, L.R., & Premoli, A.C. (2012) Shrinking forests under  
 691 warming: evidence of *Podocarpus parlatorei* (pino del cerro) from the subtropical  
 692 Andes. *The Journal of heredity*, **103**, 682–91.

- 693 R Development Core Team (2010) *R: a language and environment for statistical computing*.  
694 R Foundation for Statistical Computing, Vienna. [disponível em: [http://www.R-](http://www.R-project.org)  
695 [project.org](http://www.R-project.org)].
- 696 Ramos, A.C.S.; Lemos-Filho, J.P.; Ribeiro, R.A.; Santos, F.R. & Lovato, M.B. (2007)  
697 Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and  
698 the influence of Quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. *Annals of*  
699 *Botany*, **100**, 1219–1228.
- 700 Ramos, A.C.S.R.; Lemos-Filho, J.P. & Lovato, M.B. (2009) Phylogeographical structure of  
701 the neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and  
702 its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. *Journal of*  
703 *Heredity*, **100**, 2, 206-216.
- 704 Ratter, J.A. (1992) Transition between cerrado and forest vegetation in Brazil. *Nature and*  
705 *dynamics of forest savanna boundaries* (ed by Furley, Pa., Proctor, J. and Ratter, J.A.),  
706 pp. 417-430. Chapman and Hall, Londres.
- 707 Ribeiro, R.A.; Lemos-Filho, J.P.; Ramos, A.C.S. & Lovato, M.B. (2011) Phylogeography of  
708 the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary  
709 history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, **106**, 46–57.
- 710 Rieseberg, L. & Ellstrand, N.C. (1993) What can molecular and morphological markers tell us  
711 about plant hybridization? *Critical reviews in plants sciences*, **12**, 213–241.
- 712 Rieseberg, L.H. & Carney, S.E. (1998). Plant hybridization. *New Phytologist*, **140**(4), 599-  
713 624.

- Rodrigues, R.S. & Tozzi, A.M.G.A. (2012) Revisão taxonômica de *Leptolobium* (Papilionoideae; Leguminosae). *Acta Botânica Brasilica*, **26**, 146-164.
- Roy, A.; Frascaria, N.; Mackay, J. & Bousquet, J. (1992) Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theoretical and Applied genetics*, **85**, 173-180.
- Shin, S.I.; Liu, Z.; Otto-Bliesner, B.; Brady, E.; Kutzbach, J. & Harrison, S. (2003) A simulation of the Last Glacial Maximum climate using the NCAR-CCSM. *Climate Dynamics*, **20**(2), 127-151.
- Silva, M.P.; Mauro, R.; Mourão G. & Coutinho, M. (2000) Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. *Revista Brasileira de Botânica*, **23**, 143–152.
- Smith, T.B.; Kark, S., Schneider, C.J. & Wayne, R.K. (2001) Biodiversity hotspots and beyond: the need for preserving environmental transitions. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 431.
- Spearman, C. (1904) The proof and measurement of association between two things. *The American Journal Of Psychology*, **15**(1), 72-101.
- Sueyoshi, T.; Ohgaito, R.; Yamamoto, A.; Chikamoto, M.O.; Hajima, T.; Okajima, H.; Yoshimori, M.; Abe, M.; O'ishi, R.; Saito, F.; Watanabe, S.; Kawamiya, M. & Abe-Ouchi, A. (2012) Setup of the PMIP3 paleoclimate experiments conducted using an Earth System Model, MIROC-ESM. *Geoscientific Model Development Discussions*, **5**, 2527–2569.

- 735 Taberlet, P.; Gielly, L.; Pautou, G. & Bouvet, J. (1991) Universal primers for amplification of  
 736 three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**, 1105–  
 737 1109.
- 738 Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA  
 739 polymorphism. *Genetics*, **123**(3), 585-595.
- 740 Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5:  
 741 molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary  
 742 distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, **28**(10),  
 743 2731-2739.
- 744 Thuiller, W. (2004) Patterns and uncertainties of species range shifts under climate change.  
 745 *Global Change Biology*, **10**, 2020–2027.
- 746 Turchetto-Zolet, A.C.; Cruz, F.; Vendramin, G.G.; Simon, M.F.; Salgueiro, F.; Margis-  
 747 Pinheiro, M. & Margis, R. (2012) Large-scale phylogeography of the disjunct  
 748 Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinioideae).  
 749 *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **65**, 174–182.
- 750 Viscosi, V. & Cardini, A. (2011) Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics:  
 751 a simplified protocol for beginners. *PloS one*, **6**(10), e25630.
- 752 Webb, C.O.; Ackerly, D.D.; McPeck, M.A. & Donoghue, M.J. (2002). Phylogenies and  
 753 community ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 475-505.
- 754 Werneck, F. (2011) The diversification of eastern South American open vegetation biomes:  
 755 historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Reviews*, **30**, 1630–  
 756 1648.

- 757 Werneck, F.P.; Nogueira, C.; Colli, G.R.; Sites, J.W. & Costa, G.C. (2012). Climatic stability  
758 in the Brazilian Cerrado: implications for biogeographical connections of South  
759 American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot.  
760 *Journal of Biogeography*, **39**, 1695-1706.
- 761 Whitney, B.S.; Mayle, F.E.; Punyasena, S.W.; Fitzpatrick, K.A.; Burn, M.J.; Guillen, R.;  
762 Chavez, E.; Mann, D.; Pennington, R.T. & Metcalfe, S.E. (2011) A 45  
763 kyrpalaeoclimate record from the lowland interior of tropical South America.  
764 *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **307**, 177–192.

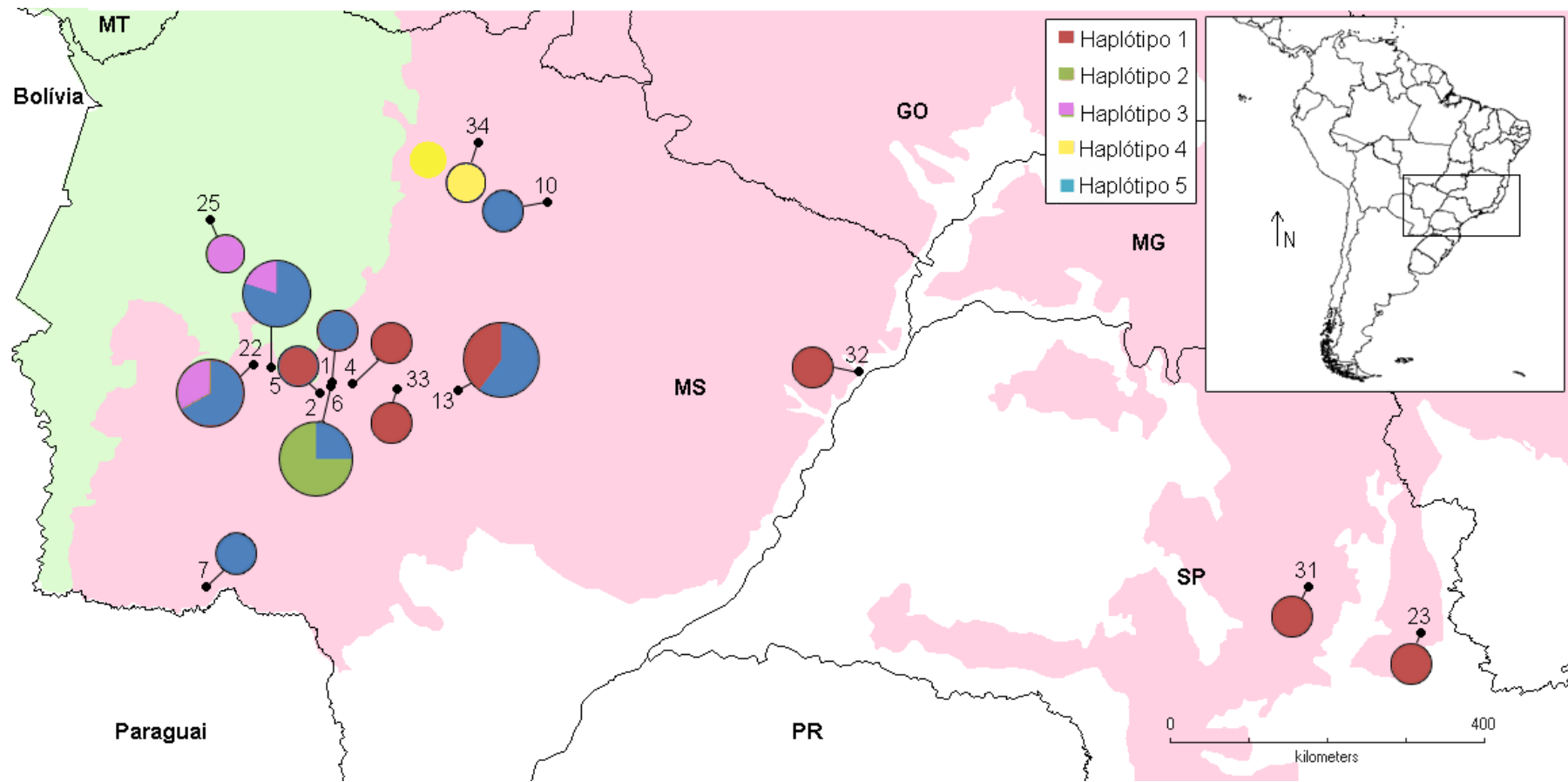
765 **FIGURAS**

766

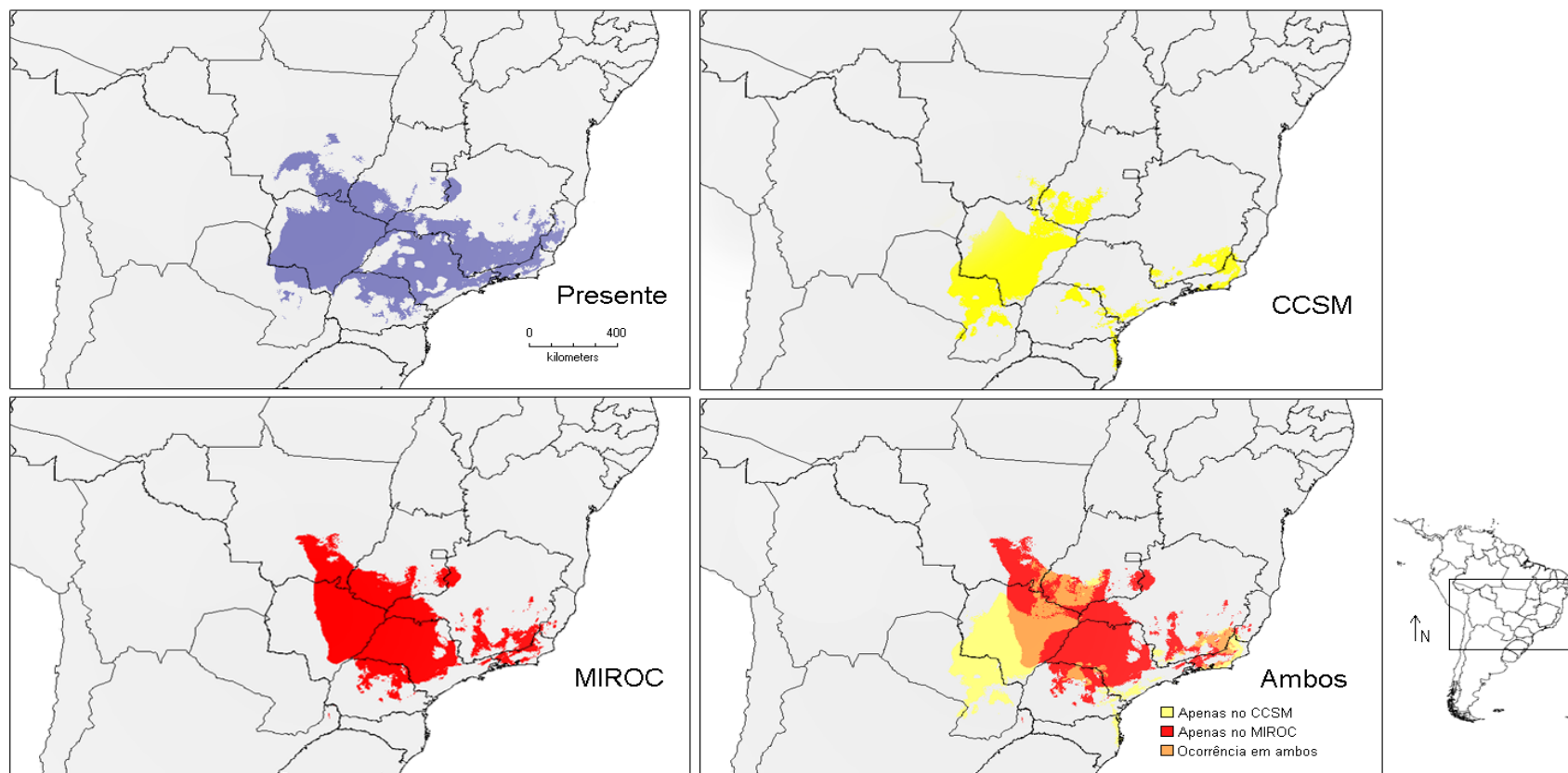
767 **Figura 1.** Mapa com os pontos de coleta de *Leptolobium elegans*. A área rosa corresponde ao Cerrado, e a verde ao Pantanal. Os Estados

768 são: GO – Goiás; MT – Mato Grosso; MS – Mato Grosso do Sul; MG – Minas Gerais; PR – Paraná; SP – São Paulo. Os números são

769 correspondentes as populações da Tabela 2.



**Figura 2.** Distribuição dos haplótipos de *trnH-psbA* nas populações coletadas de *Leptolobium elegans*.



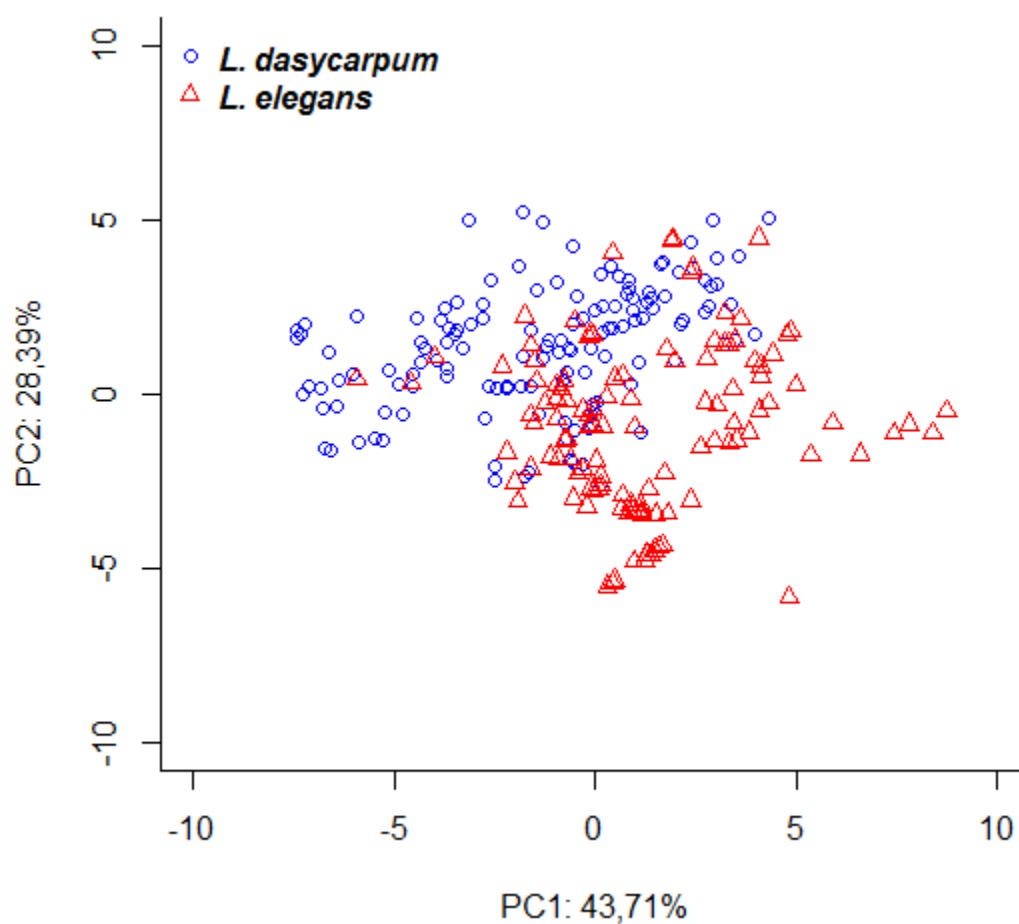
772

773 **Figura 3.** Modelo de distribuição de *Leptolobium elegans* gerado a partir do MAXENT, para o Último Máximo Glacial (UMG).

774 AUC=0,994. Demonstra as distribuições previstas com os dados do presente através de 19 variáveis climáticas do pacote BIOCLIM, e nos

775 modelos CCSM e MIROC, para o Último Máximo Glacial. O último mapa faz a comparação da distribuição prevista em ambos modelos

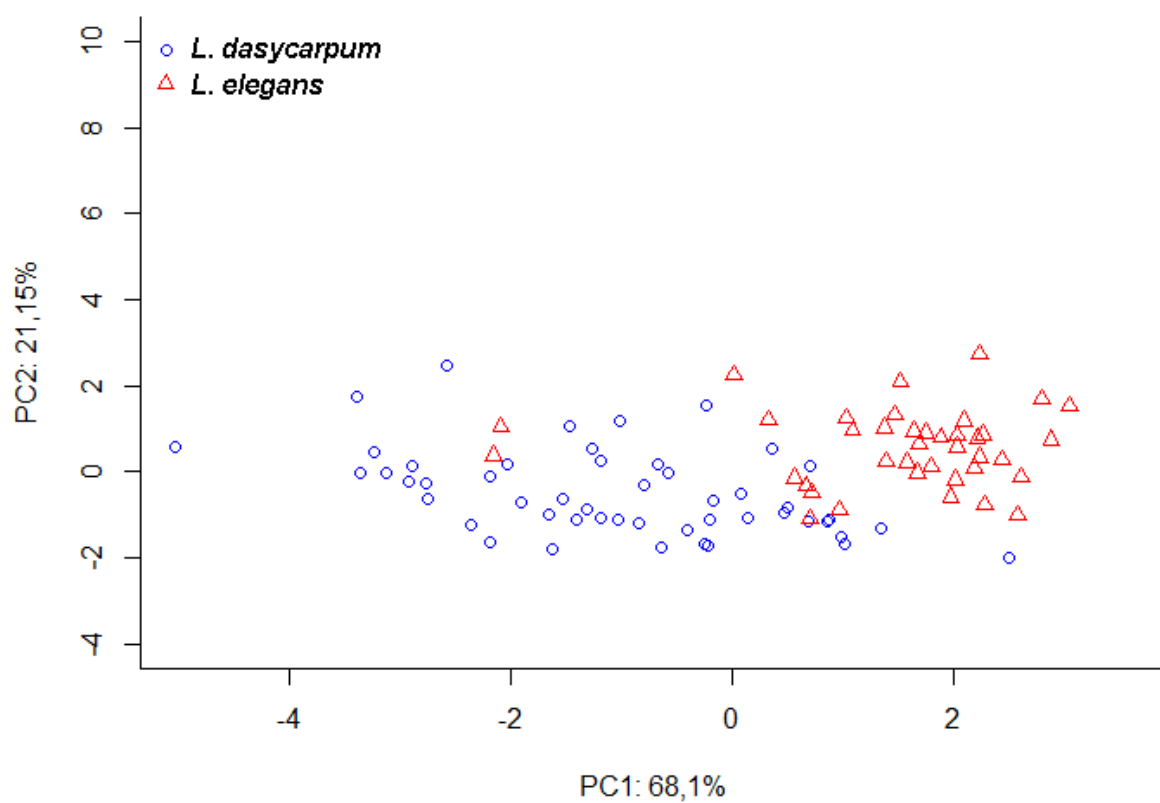
776 do passado.



777

778 **Figura 4.** Análise de Componentes Principais com base na altitude e nos dados climáticos do  
 779 pacote BIOCLIM. É possível observar uma sobreposição de nicho fundamental entre  
 780 *Leptolobium elegans* e *L. dasycarpum*. Os componentes gerados não foram capazes de  
 781 diferenciar as duas espécies através das 19 variáveis climáticas utilizadas, porém a BIO 18 –  
 782 precipitação no trimestre mais quente – foi a que mais influenciou.

783



784

785 **Figura 5.** Análise dos Componentes Principais realizada com as medidas das características  
 786 morfológicas vegetativas (área, perímetro, comprimento, largura e forma das folhas,  
 787 comprimento do pecíolo) de *Leptolobium elegans* e *L. dasycarpum*. As duas variáveis que  
 788 mais influenciaram foram a forma das folhas e o comprimento do pecíolo, no Componente  
 789 Principal 1 (PC1).

790 **TABELAS**

791 **Tabela 1.** Detalhes das populações de *Leptolobium elegans* amostradas. NIC = Número de indivíduos coletados; NIS = Número de  
 792 indivíduos sequenciados para a região do pDNA *trnH-psbA*. A população 34 refere-se a um indivíduo de *L. dasycarpum* utilizado para  
 793 comparação.

Pop.	Local de coleta	Coordenadas geográficas/altitude	NIC	NIS	Voucher
1	Anastácio/MS	20° 30' 07" S / 55° 45' 17" W / 209m	6	2	
2	Anastácio/MS	20° 31' 43" S / 55° 43' 16" W / 171m	15	1	CGMS 36858
3	Anhanduí/MS	54° 30' 52" S / 20° 49' 38" W / 514m	12	--	CGMS 36854
4	Aquidauana/MS	20° 26' 25" S / 55° 37' 25" W / 192m	19	3	CGMS 36859
5	Aquidauana/MS	20° 19' 33" S / 56° 06' 32" W / 179m	10	--	CGMS 36841
6	Aquidauana/MS	20° 27' 05" S / 55° 28' 21" W / 493m	8	1	CGMS 36857
7	Bela Vista/MS	21° 46' 53" S / 56° 15' 00" W / 244m	13	--	
8	Bodoquena/MS	22° 04' 19" S / 56° 30' 58" W / 499m	10	--	
9	Bonito/MS	21° 04' 28" S / 56° 22' 49" W / 319m	8	--	CGMS 36839
10	Camapuã/MS	19° 00' 31" S / 53° 54' 22" W / 418m	12	--	CGMS 36836
11	Camapuã/MS	19° 17' 08" S / 53° 53' 19" W / 319m	16	--	CGMS 36849
12	Campo Grande/MS	20° 27' 19" S / 54° 33' 03" W / 654m	15	--	CGMS 36852
13	Campo Grande/MS	20° 30' 29" S / 54° 36' 50" W / 548m	23	1	CGMS 36840
14	Caracol/MS	21° 45' 04" S / 57° 08' 20" W / 275m	12	--	CGMS 36846
15	Caracol/MS	22° 00' 58" S / 57° 13' 16" W / 211m	10	--	
16	Cassilândia/MS	19° 02' 59" S / 51° 52' 16" W / 521m	10	--	CGMS 36853
17	Chapadão do Sul/MS	18° 35' 12" S / 53° 15' 35" W / 582m	2	--	CGMS 36835
18	Dourados/MS	21° 56' 55" S / 54° 31' 45" W / 291m	8	--	CGMS 36851
19	Figueirão/MS	18° 42' 17" S / 53° 41' 15" W / 424m	2	--	CGMS 36834
20	Jardim/MS	21° 25' 29" S / 56° 04' 09" W / 282m	10	--	
21	Jataí/GO	17° 54' 56" S / 51° 46' 22" W / 685m	1	--	CGMS 36850
22	Miranda/MS	20° 17' 50" S / 56° 14' 39" W / 197m	15	3	
23	Mogi Mirim/SP	22° 25' 57" S / 46° 56' 36" W / 644m	11	1	CGMS 36843

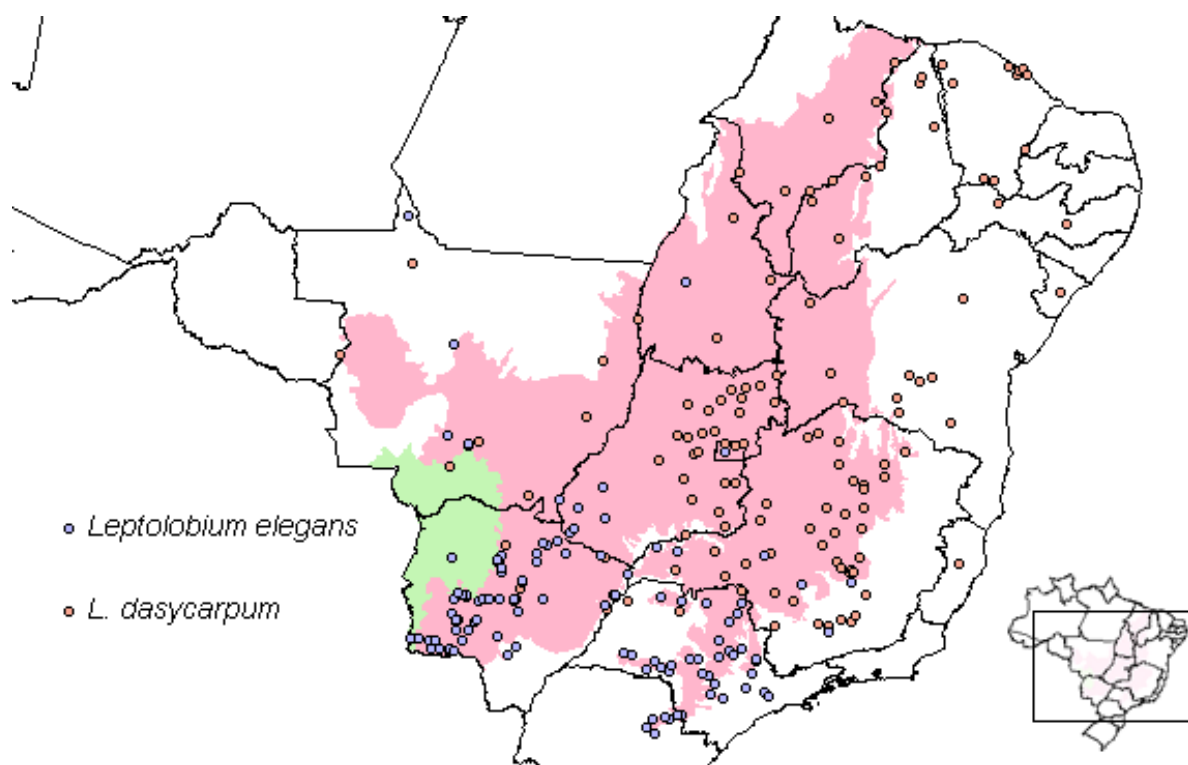
794 **Tab. 1.** Cont.

Pop.	Local de coleta	Coordenadas geográficas/altitude	NIC	NIS	Voucher
24	Nova Alvorada/MS	21° 21' 29" S / 54° 25' 55" W / 486m	7	--	CGMS 36848
25	Pantanal da Nhecolândia/MS	19° 08' 41" S / 56° 35' 30" W / 104m	15	4	CGMS 36844
26	Paranaíba/MS	19° 39' 27" S / 51° 03' 12" W / 373m	1	--	
27	Porto Murtinho/MS	21° 40' 33" S / 57° 43' 10" W / 95m	26	--	CGMS 36845
28	Ribas do Rio Pardo/MS	20° 21' 06" S / 51° 25' 44" W / 388m	19	--	
29	Rio Negro/MS	19° 34' 31" S / 55° 02' 42" W / 316m	2	--	
30	Rio Verde de Mato Grosso/MS	19° 10' 33" S / 55° 08' 23" W / 445m	2	--	CGMS 36842
31	São Carlos/SP	22° 04' 25" S / 47° 50' 26" W / 820m	10	--	CGMS 36838
32	Selvíria/MS	20° 26' 33" S / 55° 04' 43" W / 369m	18	--	CGMS 36856
33	Terenos/MS	21° 21' 29" S / 54° 25' 55" W / 486m	14	--	CGMS 36833
34	Rio Verde do Mato Grosso/MS	18° 43' 51" S / 55° 04' 43" W / 522m	1	1	CGMS 33495

795 **Tabela 2.** Informações sobre as sequências obtidas de *Leptolobium elegans*.

	Regiões não-codificantes de cpDNA			
	<i>trnH-psbA</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>íntron trnL</i>	<i>psbC-trnS<sub>L</sub></i>
Nº plantas analisadas	48	6	14	13
Nº haplótipos	4	1	1	1
Pops analisadas	15	3	6	7
Indels	2	--	--	--
Substituições	1	--	--	--
Diversidade nucleotídica	0.6933 <sup>0.0319</sup>	--	--	--
Diversidade haplotípica	0.005283 <sup>0.003505</sup>	--	--	--
% CG	21,78%	27,81%	34,79%	47,52%
Tamanho do alinhamento (pb)	316	348	497	398
D de Tajima	0.51734 <sup>0.81300</sup>	--	--	--
F <sub>S</sub> de Fu	2.46770 <sup>0.87100</sup>	--	--	--

## 796 APÊNDICE S1



797

798 Pontos de presença de *Leptolobium elegans* utilizados na modelagem de distribuição e para a  
799 Análise de Componentes Principais com dados ecológicos. Os pontos de *L. dasycarpum*  
800 foram utilizados apenas na PCA com dados ambientais. A área rosa do mapa corresponde ao  
801 Cerrado, e a verde, ao Pantanal.

## 802 APÊNDICE S2

803 Variáveis climáticas do BIOCLIM usadas para a modelagem de distribuição atual utilizando  
 804 os pontos de ocorrência descritos para *Leptolobium elegans* e *Leptolobium dasycarpum*.

Variáveis	Medida correspondente
BIO 01	Temperatura média anual
BIO 02	Temperatura média mensal
BIO 03	Média diurna/ temperatura anual
BIO 04	Sazonalidade de temperatura
BIO 05	Temperatura máxima no mês mais quente
BIO 06	Temperatura mínima no mês mais frio
BIO 07	Faixa de temperatura anual
BIO 08	Temperatura média no trimestre mais chuvoso
BIO 09	Temperatura média do trimestre mais seco
BIO 10	Temperatura média do trimestre mais quente
BIO 11	Temperatura média do trimestre mais frio
BIO 12	A precipitação anual
BIO 13	Precipitação do mês mais chuvoso
BIO 14	Precipitação do mês mais seco
BIO 15	Sazonalidade Precipitação
BIO 16	Precipitação do trimestre mais chuvoso
BIO 17	Precipitação do trimestre mais seco
BIO18	Precipitação do trimestre mais quente
BIO 19	Precipitação do trimestre mais frio

805

806

807 **APENDICE S3**

808 Lista de exsicatas utilizadas para a Análise da Morfometria dos folíolos e peciólulos de  
 809 *Leptolobium elegans* e *Leptolobium dasycarpum*.

Espécie	Herbário	Nº de Herbário	Espécie	Herbário	Nº de Herbário
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	13939	<i>L. dasycarpum</i>	EAC	8247
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	14251	<i>L. dasycarpum</i>	EAC	9064
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	14481	<i>L. dasycarpum</i>	EAC	9113
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	14946	<i>L. dasycarpum</i>	EAC	13993
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	17437	<i>L. dasycarpum</i>	EAC	2514
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	2073	<i>L. dasycarpum</i>	FLOR	28039
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	23163	<i>L. dasycarpum</i>	FLOR	28771
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	24924	<i>L. dasycarpum</i>	FURB	3014
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	2513	<i>L. dasycarpum</i>	HCF	6135
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	33495	<i>L. dasycarpum</i>	MBML	28872
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	33643	<i>L. dasycarpum</i>	SPFS	15090
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	33644	<i>L. dasycarpum</i>	SPFS	22049
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	33645	<i>L. dasycarpum</i>	SPFS	2732
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	33646	<i>L. dasycarpum</i>	SPFS	36747
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	33647	<i>L. dasycarpum</i>	SPFS	3759
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	33648	<i>L. dasycarpum</i>	SPSF	3391
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	34703	<i>L. elegans</i>	CGMS	10000
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	34704	<i>L. elegans</i>	CGMS	15418
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	34705	<i>L. elegans</i>	CGMS	17344
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	34706	<i>L. elegans</i>	CGMS	17991
<i>L. dasycarpum</i>	CGMS	4118	<i>L. elegans</i>	CGMS	18043
<i>L. dasycarpum</i>	CPAP	330	<i>L. elegans</i>	CGMS	18185

810

811

812 Cont.

Espécie	Herbário	Nº de Herbário
<i>L. elegans</i>	CGMS	19062
<i>L. elegans</i>	CGMS	2347
<i>L. elegans</i>	CGMS	24116
<i>L. elegans</i>	CGMS	24723
<i>L. elegans</i>	CGMS	9994
<i>L. elegans</i>	FLOR	24013
<i>L. elegans</i>	FLOR	26072
<i>L. elegans</i>	FLOR	27649
<i>L. elegans</i>	FURB	4872
<i>L. elegans</i>	FURB	8609

813

814

## 815    **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

816            Ao relacionar os padrões filogeográficos e a história evolutiva de *Leptolobium elegans*  
817    será possível elucidar como eventos climáticos e paleogeográficos influenciaram a  
818    biodiversidade do Cerrado e o Pantanal, principalmente na região transicional. Porém, para  
819    que isso realmente ocorra, é preciso um maior número de sequências e marcadores, que estão  
820    sendo obtidas.

821            Outros estudos nessas linhas de pesquisa, com diversas espécies, poderão ajudar a  
822    desvendar os padrões filogeográficos das formações vegetacionais do Estado de Mato Grosso  
823    do Sul, pois poucos são os dados disponíveis atualmente.

## 824 **GUIA DO AUTOR - JOURNAL OF BIOGEOGRAPHY**

825

### 826 **Instructions for Authors**

827 Papers dealing with all aspects of spatial, ecological and historical biogeography are considered for publication in the Journal  
 828 of Biogeography. The mission of the Journal is to contribute to the growth and societal relevance of the discipline of  
 829 biogeography through its role in the dissemination of biogeographical research. To that end, the editorial policy is that the  
 830 Journal seeks to be representative of the discipline of biogeography, to be global in scope, and to be inclusive of major  
 831 traditions and viewpoints in the discipline. Authors are particularly encouraged to submit concise, clearly written papers  
 832 focused on precisely framed questions or hypotheses of broad interest to the wide international readership of the journal.

833 The Journal was established in 1974 and is published in 12 issues a year.

### 834 **Original Articles and Syntheses**

835 Standard research papers appear under the strapline Original Article. Papers that have the character of a theoretical  
 836 synthesis/review, even if incorporating an element of original analysis within them, should use the strapline Synthesis. For  
 837 Original Articles, authors should limit the overall length of their manuscript so that, when published, the article will comprise  
 838 not more than 10 to 12 published pages. One page of the journal can carry one of the following: (1) the article title, author  
 839 list, abstract, and keywords; (2) about 1000 words of text (including subheadings); (3) about 30 references. For a typical  
 840 Original Article, in which illustrative material (Tables and Figures) occupies about 3 pages of the journal when printed at  
 841 final journal sizing, the text, inclusive of abstract and reference list, should not exceed 7000 words. Submissions to the  
 842 Synthesis section may be of up to 10,000 words providing such length is fully justified. In all cases, the word count, inclusive  
 843 of references and abstract, should be stated on p1 of the manuscript.

844

845 Manuscripts should be presented in the following order: title page, giving the article type: Original Article or Synthesis,  
 846 article title, author names, author research addresses, correspondence author's name, address and e-mail, and short running  
 847 head (maximum of 8 words); a structured abstract (as detailed below); 6–10 keywords; main text; references (using the  
 848 standard referencing system of the journal); biosketch (see below); tables with their legends above; list of figure legends; and  
 849 embedded figures. For an example of an Original Article, click [here](#), and for an example of a Synthesis paper, click [here](#).

850

851 **Structured abstracts.** Abstracts should be of no more than 300 words, presented as a series of factual statements under the  
 852 following headings: Aim, Location, Methods, Results, and Main conclusions. The Aim should give a clear statement of the  
 853 principal research question(s) or hypotheses, the Methods should give details of materials/sampling/methods of analysis, and  
 854 the Main conclusions should give the main take-home message.

855

856 **Biosketch/Biosketches.** A short Biosketch/Biosketches entry (30–100 words for one author/150 words for the first three  
 857 authors, respectively) describing the research interests of the author(s) should be provided. For papers with four or more  
 858 authors, biosketch details should be supplied for the first author only and/or a general statement of the focus of the research  
 859 team (which may include a link to a group web page) plus, in all cases, a statement of author contributions, e.g. Author  
 860 contributions: A.S. and K.J. conceived the ideas; K.J. and R.L.M. collected the data; R.L.M. and P.A.K. analysed the data;  
 861 and A.S. and K.J. led the writing.

862

### 863 **Pre-submission English language editing**

864 Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission  
 865 to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found  
 866 at [www.blackwellpublishing.com/bauthor/english\\_language.asp](http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp). Japanese authors can also find a list of local English  
 867 improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the  
 868 author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

869

### 870 **Submission**

871 Submission to the *Journal of Biogeography* is via an online submission process at <http://mc.manuscriptcentral.com/jbi>. It is  
 872 strongly recommended that before submission authors download and then complete our Author Checklist, which is intended  
 873 to assist authors in preparing a potentially successful submission. It is available from the ScholarOne Manuscripts site, where  
 874 it can be found in the tab 'Instructions and Forms' at the top right hand corner of the main screen.

875

876 When submitting, authors should upload a single word file (.doc, .docx or .rtf) containing in sequence the text, tables with  
 877 legends above, list of figure legends, and embedded figures. If the paper has Supporting Information (for online publication  
 878 only), this material should be uploaded as separate editable files or, preferably, as one combined file, with embedded figures  
 879 if applicable. Any explanatory notes, companion papers etc. for the attention of reviewers should be uploaded under  
 880 'Comments to reviewers'. Once the files have been uploaded, the system automatically creates a single PDF file for review  
 881 purposes, combining the files designated as being for review. An optional cover letter for the editor may be uploaded  
 882 separately.

Full instructions and support for authors can be found on the ScholarOne Manuscripts site. To use the site you will need a user ID and password. Go to the Journal's submission homepage (<http://mc.manuscriptcentral.com/jbi>) and click 'New user' if you have not registered as an author before. If you require technical assistance with ScholarOne Manuscripts, you will find details of how to contact ScholarOne Support directly by clicking the GET HELP NOW link that appears at the top of every ScholarOne Manuscripts page. Alternatively, please contact the Editorial Office by e-mail.

#### **The text**

Manuscripts should bear the title of the contribution, names of the authors and complete addresses of the place(s) where the work was carried out. The full postal and e-mail address of the author who will receive correspondence and check the proofs should also be included, as well as the present address of any author if different from the place where the work was carried out. The title page should state the word count for the abstract and also for the main body of the text (inclusive of the abstract and references).

**Manuscripts must be written in English (using UK spellings please); where this is not the author's first language they should be carefully checked by a scientifically competent English speaker before submission.**

Manuscripts should be formatted as A4 with ample margins and double line spacing with line numbers. All pages should be numbered in the top right hand corner. A range of three different headings levels may be used and authors should indicate the level of each heading by formatting them as bold–capital, bold–lower case or italics–lower case for main, second and third level heading, respectively.

The correct nomenclatural authorities for the main study species must be given on their first mention in the main body of text, or reference must be made to an appropriate nomenclatural source reference covering the taxa mentioned in the paper. Where specific equipment or software is mentioned, please give the manufacturer/company's name, town and country.

#### **Conflict of Interest**

*Journal of Biogeography* requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the manuscript (under the Acknowledgment section) and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Corresponding authors will be asked to confirm whether or not a conflict of interest exists as part of the submission process.

*Journal of Biogeography* is a member of and subscribes to the principles of the Committee on Publication Ethics.

#### **Abbreviations and units**

SI units (m, km<sup>2</sup>, kg, etc.) are preferred. Statistics and measurements should always be given in figures, i.e. 10 km, except where the number begins the paragraph. When the number does not refer to a unit of measurement, it is spelt out (e.g. three samples), except where the number is greater than or equal to 10 (e.g. 25 samples). Use: negative exponents (e.g. t year<sup>-1</sup>, not t/year); L for litres; 24 hour clock format (e.g. 10.00 h); and format dates as 31 March 1999. The word 'Figure' should be abbreviated in the text, e.g. Fig. 1, Figs 2 & 3. All acronyms/abbreviations should be given in full at first mention.

#### **Tables**

Tables should be cited consecutively in the text and included in the file at the end of the paper with the legends above. They should be editable and constructed using 'tabs' (not spaces or software options). Legends should be explicit and informative and should 'stand alone' from the main text, giving the study organism and study location where applicable. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses. All abbreviations should be defined.

#### **Figures**

Please ensure that figures are prepared such that, after reduction to print size, all lettering and symbols will be clear and easily read, and such that each figure makes effective use of space.

For review purposes, figures should be embedded at the end of the text file. All illustrations (including photographs and maps) are classified as figures and they should be numbered consecutively as first cited in the text. Panels should be labelled (a), (b), (c), etc. rather than (A), (B), (C) etc. and referred to in the text as, for example, Fig. 1a. Figure legends should be listed at the end of the paper before the embedded figures. Legends should be explicit and informative and should 'stand alone' from the main text, giving the study organism and study location where applicable. All abbreviations should be defined.

Bar scales for maps and photographs are preferred to numerical scales and must be given on all such items. Maps that display area data and organism distribution at a continental, hemispheric, or world scale must always use an **equal-area map projection** (e.g. Mollweide or Aitoffs). Note especially that Mercator's projection is not acceptable for such data. Please indicate the precise projection employed in the caption. On these maps, the equatorial scale should be indicated, while **scale information should be provided**, preferably as a scale bar within the figure, for all maps of whatever size and area; use 'km' or 'kilometres', not 'kilometers'. Maps should include adequate geo-referencing information.

If and when your paper is accepted for publication, the editorial office will request you to upload your figures as separate files in the format(s) specified below. When supplying these files, use the following naming convention: manuscript number, figure number and then the appropriate file extension e.g. 'JBI-08-0500\_Fig1.tif'.

Photographic figures should be saved in .tif format at 300 d.p.i. (or failing that in .jpg format with low compression). Line figures should be saved as vector graphics (i.e. composed of lines, curves, points and fonts) in .eps or .pdf format, as this enhances their display when published online. Combination figures (those composed of vector and pixel/raster elements) should also be saved in .eps or .pdf format where possible. If line figures and combination figures cannot be saved in vector graphics format, they should be saved in .tif format at high resolution (i.e. 600–800 d.p.i.) (do not save them in .jpg format). If you are unsure about the resolution of your .tif files, please zoom in and check that fonts, curves and diagonal lines are smooth-edged and do not appear blocky. Note that .tif files are downsampled for online publication and so authors should preferentially opt for vector graphic formats for line and combination figures (full resolution .tif files are used for print publication). Colour figures should be saved in CYMK rather than RGB. Full artwork guidelines are given [here](#).

### Cover images

Authors are encouraged to submit potential cover illustrations. These should be scanned to be 300 d.p.i. when enlarged/reduced to reproduction size (typically 11 x 16 cm).

### References

Authors must use the system illustrated below. Unpublished data, works in preparation and papers submitted but not yet accepted may be cited in the text, giving the author's initials and surname, but should not be included in the reference list. It is the author's responsibility to obtain permission from colleagues to include their work as a personal communication. Please add the person's initials, surname and institute for personal communications.

In the text, references should be made by giving the author's name with the year of publication, as follows: (Bush & Rivera, 1998). When reference is made to a work by three or more authors the first name followed by *et al.*, is used on all occasions. If several papers by the same author and from the same year are cited, a, b, c, etc. should be put after the year of publication, as follows (Schoener & Schoener, 1983a,b). When citing a list of papers, place them in date order (alphabetically when within a year) and separate them with semi-colons as follows (Schoener & Schoener, 1983a,b; Bush & Rivera, 1998, 2003; Collins, 1998, 2002; Whittaker *et al.*, 2007).

In the list, references should be sorted alphabetically by first author, then by number of authors (one, two, three or more), then chronologically within the one-author group, alphabetically within the two-author group, and chronologically within the ≥ three-author group. For multi-authored works with more than 20 authors, list only the first three authors followed by *et al.* Page extents of single-volume works are not required. **Titles of journals should be given in full.** Check the Journal for reference style. Some examples are given below:

Prentice, I.C., Guiot, J., Huntley, B., Jolly, D. & Cheddadi, R. (1996) Reconstructing biomes from palaeoecological data; a general method and its application to European pollen data at 0 and 6 ka. *Climate Dynamics*, **12**, 185-194.

Cox, C. B. & Moore, P. D. (1999) *Biogeography: an ecological and evolutionary approach*, 6th edn. Blackwell Science Ltd, Oxford.

Guo, Q. (1994) *Dynamic desert Puccinellia maritima plant community ecology: changes in space and time*. PhD Thesis, University of New Mexico, Albuquerque.

May, R.M. (1994) The effects of spatial scale on ecological questions and answers. *Large-scale ecology and conservation biology* (ed. by P.J. Edwards, R.M. May and N.R. Webb), pp. 1-17. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

StatSoft Inc. (2003) *STATISTICA (data analysis software system), version 6.1*. StatSoft, Inc., Tulsa, OK.

### Appendices and Supporting Information

Appendices may be provided for important primary data, which needs to be included in the paper. **Appendices that do not need to be included in the main paper, or that are extensive, should be prepared as online Supporting Information.** No more than three supplementary appendices should be supplied (labelled Appendix S1–S3). Such supporting information should be referred to in the text as, for example, 'see Appendix S1 in Supporting Information' (where S denotes supplementary); subsequent mention should be in the form 'see Appendix S2'. Authors should then include a 'Supporting Information' section immediately after their References section, which should be in the following form:

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Appendix S1** Short title here.

**Appendix S2** Short title here.

As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

For reasons of space, only short titles to Supporting Information should be given in this section; full titles (if different) can be given with the Supporting Information itself; full titles can include a fuller description of content, definition of abbreviations, etc.

Supporting Information files are hosted by the Publisher in the format supplied by the author and are not copy-edited by the Publisher. **It is the responsibility of the author to supply Supporting Information in an appropriate file format and to ensure that it is accurate and correct. Authors should therefore prepare Supporting Information with the same rigour as their main paper, including adhesion to journal style (e.g. formatting of references).** Sources cited only in the Supporting Information should be listed in a reference section within the supplementary files and not with the main paper. Supporting Information can be provided as separate editable files or, preferably, as one combined file. Authors are discouraged from supplying very large files or files in non-standard file formats, both of which may reduce their use to the readership. Files should be prepared without line numbers or wide line spacing, and with all track-change edits accepted.

At proof correction stage authors will be given access to their Supporting Information (via the web) and should check it for accuracy and updates. If changes are required, corrected versions of the files that were received with the proof must be emailed to the Production Editor, with a brief description of the changes made. Supporting Information **must be checked alongside the main proof** and corrections for both returned to the Production Editor at the same time.

### Policy on the use of RAPD markers

The appropriateness of RAPD markers for population genetic inference is increasingly questioned by our reviewers and editors because of concerns about reproducibility, dominance, and homology. Given these worries, and the ready availability of other kinds of markers that do not suffer from all of these problems, studies based primarily on RAPDs only rarely pass the scrutiny of peer review in the *Journal of Biogeography*. Of course, there may be situations in which RAPDs are appropriate, such as in genetic mapping studies or in searches for diagnostic markers for a given species or trait. These latter kinds of studies will continue to be reviewed by the journal.

### Policy on molecular sequences and vouchers

It is a condition of publication that papers using new molecular sequences must place the sequences in an appropriate database (e.g. GenBank). Relevant accession numbers should be provided in the final manuscript. Accession numbers are required for all sequences used in analyses, including existing sequences in databases. Museum voucher numbers should also be provided where this information could be of real value to future researchers.