



**Universidade Federal do Paraná**

**Setor de Ciências Biológicas**

**Pós-graduação em Ecologia e Conservação**



**VARIABILIDADE GENÉTICA E  
HISTÓRIA EVOLUTIVA DE *Rhipsalis*  
*floccosa* (RHIPSALIDEAE, CACTACEAE)**

Discente: Bruna Saviatto Fagundes

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Valéria Cunha Muschner

Curitiba, Fevereiro de 2015.

## Resumo:

A Floresta Atlântica (FA) é um bioma de grande variação latitudinal, altamente rico e espacialmente heterogêneo tanto em relação aos ambientes, à diversidade genética, quanto à riqueza de espécies. As modificações no ambiente que ocorreram ao longo da história de formação da FA afetaram a diversidade, a distribuição geográfica e a variabilidade genética no espaço e no tempo das espécies tropicais. Deste modo, há um grande interesse em estudos que visem reconstruir a história evolutiva das espécies tropicais endêmicas a fim de determinar a origem das linhagens e suas respectivas respostas às alterações geográficas e climáticas do ambiente. A espécie *Rhipsalis floccosa* constitui um interessante modelo para esses estudos pois apresenta ampla distribuição em todo o território da FA. *R. floccosa* é subdividida em cinco subespécies (subsp. *floccosa*, subsp. *pittieri*, subsp. *pulvinigera*, subsp. *hohenauensis*, subsp. *tucumanensis*) as quais apresentam diferentes distribuições geográficas e, dentre essas subespécies, as que possuem distribuição nas áreas da FA são *floccosa*, *pulvinigera* e *hohenauensis*. Existe uma dificuldade na identificação desse táxon em razão da alta similaridade morfológica entre as subespécies, o que torna escasso os trabalhos com subespécies de *Rhipsalis floccosa*. Considerando a história de formação da FA e as características de *R. floccosa*, esse trabalho tem como principais objetivos: 1) determinar a variabilidade genética intraespecífica e a origem das linhagens das três subespécies *R. floccosa* ssp. *floccosa*, *R. floccosa* ssp. *pulvinigera* e *R. floccosa* ssp. *hohenauensis* e suas respectivas relações evolutivas; 2) Determinar se a estrutura genética dentro e entre as populações está associada ao gradiente latitudinal da FA; 3) inserir a história evolutiva das subespécies de *Rhipsalis floccosa* no contexto da distribuição biogeográfica na FA. Para o estudo, serão coletadas amostras vegetais das espécies em diferentes regiões da costa leste do território brasileiro e como ferramenta, serão conduzidas análises moleculares via marcadores microssatélite desenvolvidos a partir de sequências previamente conhecidas de *Rhipsalis dissimilis*. Com os dados gerados, será possível compreender quais os processos evolutivos estão envolvidos na demografia das três subespécies de *Rhipsalis floccosa* e a sua correlação com a variabilidade genética dentro e entre as populações e subespécies, visando gerar dados que subsidiem estudos de conservação e manejo das espécies do bioma ameaçado.

## Introdução

A Floresta Atlântica (FA) possui 150 milhões de hectares, distribuídos na faixa leste da América do Sul, abrangendo desde o Estado do Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, tendo como limite leste a costa Atlântica e limite oeste o Estado do Mato Grosso do Sul (RIBEIRO *et al.*, 2009). Originalmente, 75% do bioma era coberto por formações arbóreas densas com diferentes estruturas e composições como, por exemplo, a Floresta Ombrófila Mista. O restante do território da FA era caracterizado por formações abertas ou secas (MYERS *et al.*, 2000). Atualmente, apenas 7,91% da sua cobertura de vegetação original pode ser encontrada em uma paisagem com fragmentos florestais remanescentes, isolados por extensas áreas agrícolas e centros urbanos (MYERS *et al.*, 2000; SOS MATA ATLÂNTICA INPE).

A variação latitudinal da FA, 3° ao 31° Sul, resultou em uma floresta bastante heterogênea com um grande número de espécies, sendo conhecidas 526 espécies de vertebrados endêmicos e cerca de 8000 espécies de plantas endêmicas (MYERS *et al.*, 2000). Todo o território da FA sofre influência dessa variação latitudinal associada a fatores climáticos, como: temperatura, precipitação e luminosidade. Essas modificações no ambiente, associadas aos fatores históricos, influenciam diretamente a diversificação das espécies (WIENS, 2007). Existem duas hipóteses para explicar essa alta diversidade de espécies e endemismos na FA. Uma infere sobre a elevação da costa leste do Brasil durante o Terciário, o que resultou em alterações na geografia e no clima do bioma e, consequentemente, fragmentou a floresta, isolando a fauna e flora regionais (SIMPSON, 1979). A outra hipótese está relacionada à ocorrência de ciclos glaciais do Pleistoceno, o que resultou na vicariância das populações em refúgios ao longo de toda a extensão da FA e no isolamento de populações em ilhas continentais em razão das alterações climáticas induzidas pelas mudanças no nível do mar (CARNAVAL e BATES, 2007).

Outro fator considerado determinístico na diversificação da FA é a zona de segregação que existe na região do Rio Doce, no Estado do Espírito Santo, a qual divide a FA em duas áreas latitudinalmente (CARNAVAL e MORITZ, 2009, THOMÉ *et al.*, 2010). Alguns estudos mostram que a maior diversidade genética ocorre nas regiões do norte da FA, acima do Rio Doce, porém, nas florestas do sul da FA, há uma alta taxa de endemismo, indicando que não há um modelo único de diversificação (CARNAVAL *et al.*, 2009). Essas modificações no ambiente que ocorreram ao longo da história evolutiva da FA afetaram a diversidade e a distribuição geográfica no espaço e no

tempo das espécies tropicais (CARNAVAL *et al.*, 2014). Além disso, a distribuição da variabilidade genética entre as populações também foi influenciada pelos fatores ambientais e históricos (CARNAVAL *et al.*, 2009).

As populações naturais de plantas são fortemente influenciadas pelos padrões de trocas genéticas dentro e entre as populações. As variações na reprodução das espécies e na história de vida podem afetar esses padrões e, como consequência, ocorre a estruturação genética das populações naturais (AVISE, 2000). A genética de populações descreve a estruturação das populações e assume que a atual estrutura genética reflete o equilíbrio entre deriva genética e fluxo gênico (WRIGHT, 1978). Porém, o fluxo gênico entre as populações de plantas pode ser restringido em razão da ampla distribuição geográfica da espécie e dispersão de pólen e sementes, sendo que esses fatores influenciam diretamente a variabilidade genética das populações, alterando a história evolutiva da espécie (AVISE, 2000).

Os estudos de genética de populações associados à filogenia da espécie permitem investigar as relações entre os processos micro e macroevolutivos (AVISE, 2000). Essa associação é conhecida como filogeografia, a qual possibilita compreender como os eventos históricos (*e.g.* extinção, recolonização, efeito gargalo e efeito fundador) influenciaram na distribuição geográfica atual dos genes, das populações e das espécies (AVISE, 2000). Neste contexto, é possível avaliar a influência dos fatores históricos na distribuição da biodiversidade. Assim, a filogeografia abrange padrões de tempo (relações evolutivas) e espaço (distribuição geográfica), contribuindo para o conhecimento das relações evolutivas entre populações e espécies intimamente relacionadas (AVISE, 2000). Dentre as ferramentas utilizadas em estudos de filogeografia, estão as técnicas moleculares que envolvem marcadores de DNA (RAFALSKI *et al.*, 1996; FREELAND, 2005). Essas técnicas permitem avaliar os níveis de fluxo gênico e a distribuição do padrão genético entre as populações por polimorfismo ancestral ou atual, identificando os haplótipos e suas relações genealógicas (SCHALL, *et al.*, 1998) e diferenciando as linhagens genéticas entre populações historicamente isoladas (AVISE, 2000). Deste modo, há um grande interesse em reconstruir a história evolutiva das espécies tropicais endêmicas a fim de determinar suas origens e respostas a alterações geográficas e climáticas do ambiente.

A espécie *Rhipsalis floccosa* constitui um interessante modelo para o estudo da história evolutiva e da estrutura genética de populações naturais, visando compreender os processos de diversificação do bioma. Essa espécie pertence à família Cactaceae,

subfamília Rhipsalideae e apresenta uma ampla distribuição geográfica em todo o território da FA, desde o litoral até altitudes de 1500 metros (TAYLOR, 1997; CALVENTE, 2011a; GIOVANONI, 2014). A subfamília Rhipsalideae é monofilética e, embora os clados do táxon sejam bem suportados por dados moleculares, há uma convergência entre os caracteres morfológicos utilizados na identificação e classificação das espécies do gênero *Rhipsalis* (CALVENTE *et al.*, 2011a; CALVENTE *et al.*, 2011b; KOROTKOVA *et al.*, 2011). As espécies de *Rhipsalis* apresentam alta representatividade na FA e, segundo Calvente (2011a), essas espécies possuem uma proximidade filogenética bastante alta e forte associação morfológica. *R. floccosa* é a espécie mais representativas do gênero na FA e ocorre desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul (BARTHLOTT E TAYLOR, 1995; CALVENTE, 2011b). *R. floccosa* é subdividida em cinco subespécies (subsp. *floccosa*, subsp. *pittieri*, subsp. *pulvinigera*, subsp. *hohenauensis*, subsp. *tucumanensis*) que apresentam diferentes distribuições geográficas e bastante restritas (BARTHLOTT E TAYLOR, 1995). Dentre essas subespécies, *floccosa*, *pulvinigera* e *hohenauensis* são endêmicas na FA (BARTHLOTT E TAYLOR, 1995). Apesar da representatividade da espécie na FA, não se conhece sobre seus padrões de variabilidade genética intraespecífica e diversificação das linhagens evolutivas que habitam este bioma. As subespécies de *Rhipsalis floccosa* compartilham características morfológicas (CALVENTE, 2011b) e tal similaridade pode ser explicada pela pressão de seleção nas populações, que pode estar relacionada aos processos de formação da FA. Assim, sugere-se que as populações de *R. floccosa* passaram por processos de diferenciação, possivelmente originando as subespécies conhecidas atualmente.

Considerando a história de formação da FA e as características de *R. floccosa*, esse trabalho tem como objetivo determinar a variabilidade genética e história evolutiva da espécie compreendendo a origem das linhagens das três subespécies *R. floccosa* ssp. *floccosa*, *R. floccosa* ssp. *pulvinigera* e *R. floccosa* ssp. *hohenauensis* e suas respectivas relações evolutivas.

## **Objetivo Geral**

Determinar o papel relativo da história evolutiva na estruturação espacial e diversificação de *Rhipsalis floccosa* na Floresta Atlântica.

## **Objetivos específicos**

- 1) Descrever a variabilidade intraespecífica e estrutura genética de *R. floccosa* ssp. *floccosa*, *R. floccosa* ssp. *pulvinigera* e *R. floccosa* ssp. *hohenauensis*, delimitando as linhagens evolutivas e o tempo de divergência entre as linhagens;
- 2) Inferir sobre a história demográfica das linhagens evolutivas identificadas que permitirão identificar a diferenciação das populações e das linhagens da espécie;
- 3) Determinar se a estrutura genética dentro e entre as populações está associada às variações latitudinais em pequenas escalas;
- 4) Inserir a história evolutiva das subespécies de *Rhipsalis floccosa* no contexto da distribuição biogeográfica na Floresta Atlântica.

## **Hipóteses**

- 1) Os padrões biogeográficos de estruturação da Floresta Atlântica formaram as linhagens consideradas subespécies de *R. floccosa*.
- 2) Em cada subespécie de *R. floccosa* existe um forte estrutura genética espacial.
- 3) Existe uma resposta demográfica das subespécies de *R. floccosa* ao gradiente latitudinal da Floresta Atlântica, independente da escala espacial.

## Coleta de dados

Para este trabalho, serão coletadas amostras de caule de 20 indivíduos de cada população de *Rhipsalis floccosa* ssp. *floccosa*, *R. floccosa* ssp. *pulvinigera* e *R. floccosa* ssp. *hohenauensis* nas regiões de distribuição geográfica na Floresta Atlântica. As coletas serão definidas com base nos registros de ocorrência provenientes de referências bibliográficas e banco de dados digital (SPECIESLINK). Os locais de coleta para cada espécie, estão detalhados na tabela 1.

Tabela 1 – Localização dos pontos de coleta para cada população das subespécies de *R. floccosa* (BARTHOLOTT E TAYLOR, 1995; SPECIESLINK).

| Local de Coleta |                                                                   | Subespécie de <i>Rhipsalis floccosa</i> |                    |                     |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|---------------------|
| Estado          | Município / Local                                                 | <i>floccosa</i>                         | <i>pulvinigera</i> | <i>hohenauensis</i> |
| BA              | Ilhéus / Mata da Esperança                                        | X                                       |                    |                     |
| MG              | Lima Duarte / Parque Estadual do Ibitipoca                        | X                                       |                    |                     |
| ES              | Guarapari / Parque Estadual Paulo César Vinha                     | X                                       |                    |                     |
| RJ              | Rio de Janeiro / Parque Nacional da Tijuca                        | X                                       | X                  | X                   |
| SP              | Santo André / Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba | X                                       | X                  | X                   |
| PR              | Ponta Grossa / Parque Nacional de Vila Velha                      | X                                       | X                  |                     |
| PR              | Piraquara/ Mananciais da Serra, Parque Estadual do Marumbi        | X                                       | X                  |                     |
| PR              | Tibagi/ Parque Estadual do Guartelá                               | X                                       | X                  |                     |
| SC              | Florianópolis / Parque Nacional Lagoinha do Leste                 |                                         | X                  |                     |
| SC              | Paulo Lopes / Parque Estadual Serra do Tabuleiro                  |                                         | X                  |                     |
| RS              | Porto Alegre / Jardim Botânico                                    |                                         | X                  |                     |
| RS              | Passo Fundo / Floresta Nacional de Passo Fundo                    |                                         | X                  |                     |

A extração de DNA será realizada por meio do protocolo CTAB modificado (DOYLE e DOYLE, 1987). As análises moleculares serão conduzidas com marcadores microsatélites (SSR) (RAFALSKI *et al.*, 1996; FREELAND, 2005). O nosso grupo de pesquisa possui uma biblioteca genômica rica em regiões SSR de *Rhipsalis dissimilis*. Como não existem marcadores SSR desenvolvidos para *R. floccosa*, a amplificação heteróloga de SSR entre espécies relacionadas que pertencem à um mesmo gênero ou família compreende uma importante ferramenta para estudos de genética de populações e história evolutiva (MORAES *et al.*, 2012). Assim, serão construídos *primers* SSR com a biblioteca genômica de *R. dissimilis*, e estes serão utilizados em *R. floccosa*, pois ambas as espécies pertencem ao “Clado *floccosa*” e possuem uma estreita relação

filogenética (CALVENTE *et al.*, 2011b). Essa abordagem de transferibilidade de marcador SSR facilita os estudos genéticos de grande escala de estrutura de populações, sistemática e história evolutiva para estudos comparativos do grupo de subespécies de *R. floccosa*.

Para a identificação das regiões de SSR nas sequências, será utilizada a ferramenta de busca Webtroll disponível na página <<http://wsmartins.net/websat/>>. Após a seleção das sequências de SSR, o programa SeqMan – Lasergene (DNASTar Inc.) será utilizado para avaliar o nível de redundância entre elas, sendo que apenas os marcadores que aparecerem em apenas uma sequência serão utilizados. Os *primers* direto (*forward*) e reverso (*reverse*) de cada SSR serão desenhados com o programa Primer3 e então, sintetizados para análise via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) das populações das subespécies estudadas.

### **Análise de dados**

Os alelos de cada marcador serão definidos através de eletroforese em um sequenciador automático de DNA, e em seguida visualizados no programa GeneMapper v.3.7 (*Applied Biosystems*). Através deste programa os indivíduos serão genotipados com base nos tamanhos (pb) dos alelos de microsatélite amplificados. Com esses dados, será possível analisar a variabilidade genética, estrutura genética espacial (EGE), autocorrelação espacial e estatística *Sp*. Essas análises possibilitarão a comparação da EGE entre as diferentes populações e a avaliação dos níveis do coeficiente de ancestralidade multiloco entre as amostras (VEKEMANS e HARDY, 2004). A variabilidade genética será estimada através do software GENEALX 6 (PEAKALL e SMOUSE, 2006), que calculará a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), número de alelos por *loco* ( $A$ ) e índice de fixação ( $F$ ). O programa Structure v.2.3.3 (FALUSH; STEPHENS; PRITCHARD, 2007) será utilizado para avaliar a estrutura genética entre as populações a partir da análise Bayesiana e estatística K com uma abordagem hierárquica entre os agrupamentos (BONATELLI *et al.*, 2014). Para compreender a relação entre distribuição geográfica e estrutura populacional das subespécies de *R. floccosa*, será realizado o teste de Mantel entre as distâncias genéticas e geográficas utilizando o programa GENALEX6 (PEAKALL e SMOUSE, 2006). As taxas de migração serão estimadas entre os pares de populações com BAYESASSv3.0.1 (WILSON e RANNALA, 2003).



## Produtos esperados

Relativamente, existem poucos marcadores SSR desenvolvidos para espécies da família Cactaceae, em comparação com outras famílias de plantas. Na literatura, existem marcadores SSR desenvolvidos para 10 espécies de cactos e com um sucesso na amplificação heteróloga em outras 48 espécies (HUGHES *et al.*, 2008; SOLORZANO *et al.*, 2009; ARAKAKI *et al.*, 2010; BUTTERWORTH, 2011; PEREZ *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2012). Os marcadores SSR de *R. dissimilis* que serão desenvolvidos nesse projeto contribuirão para estudos com espécies do “Clado *floccosa*” e para o conhecimento da relação genética e sua conformidade com os limites taxonômicos entre as subespécies. Os dados obtidos sobre a estrutura genética das populações de *R. floccosa* ssp. *floccosa*, *R. floccosa* ssp. *pulvinigera* e *R. floccosa* ssp. *hohenauensis* poderão contribuir para a compreensão das variações climáticas ocorridas nos últimos anos na composição e diversidade de espécies neotrópicas.

Com as hipóteses que serão testadas nesse trabalho, espera-se que períodos de *bottleneck* identificados nas análises de demografia evolutiva sejam similares com os eventos de vicariância já conhecidos da FA. Além disso, espera-se que em cada linhagem identificada nas subespécies de *R. floccosa* exista um baixo fluxo gênico em razão da distribuição geográfica e espera-se que as variações da estrutura populacional sejam estruturadas latitudinalmente, tanto entre as subespécies, quando dentro de cada subespécie.

Esses resultados serão apresentados à comunidade científica por meio de manuscritos a serem submetidos em revistas especializadas e sob a forma de apresentações em encontros, simpósios e congressos nacionais e internacionais. Os dados gerados serão publicados em, pelos menos, dois manuscritos científicos, sendo um relacionado à amplificação heteróloga de marcadores SSR de *R. dissimilis* em subespécies de *R. floccosa* e outro manuscrito com os dados de variabilidade genética intraespecífica e estrutura genética de *R. floccosa* em escalas local e regional.

## Cronograma semestral

[illegible]

## **Viabilidade financeira**

O projeto pode ser considerado como financeiramente viável tendo em vista a não necessidade de aquisição de instrumentos necessários para a prática molecular uma vez que o laboratório está estruturado com equipamentos e reagentes que serão utilizados no projeto. O custeio das incursões ao campo para as coletas de material vegetal, síntese de marcadores microssatélites (SSR) será realizado com financiamento próprio do Laboratório de Ecologia Molecular Vegetal, do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, a qual é destinada aos projetos vinculados ao mesmo. Além disso, há convênio com grupos de pesquisa da área de outras universidades localizadas nas regiões de ocorrência das subespécies o que permitirá o acesso aos locais de coleta.

## Referências-chave

- ARAKAKI, M.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P. S.; SPERANZA, P. R. Characterization of polymorphic microsatellite loci in *Haageocereus* (Trichocereae, Cactaceae). *Am J Bot* .97:e17–e19. 2010.
- AVISE, J. C. *Phylogeography: The history and formation of species*. London: Harvard University Press, 2000.
- BARTHLOTT, W. e TAYLOR, N. P. *Notes towards a monograph of Rhipsalideae* (Cactaceae). Yearbook of the British Cactus and Succulent Society. 13: 43-79. 1995.
- BONATELLI, I. A. S.; PEREZ, M. F.; PETERSON, T.; TAYLOR, N. P.; ZAPPI, D. C.; MACHADO, M. C.; KOCH, I.; PIRES, A. H. C.; MORAES, E. M. Interglacial microrefugia and diversification of a cactus species complex: phylogeography and palaeodistributional reconstructions for *Pilosocereus aurisetus* and allies. *Molecular Ecology*. 23: 3044-3063.
- BUTTERWORTH, C. A. Isolation and characterization of 10 polymorphic microsatellite loci in *Coryphantha robustispina* ssp. *robustispina*. *Conserv Genet Resour*. 3:247–249. 2011.
- CALVENTE, A.; ZAPPI, D. C.; FOREST, F. e LOHMANN, L. G. Molecular phylogeny, evolution, and biogeography of South American epiphytic cacti. *International Journal of Plant Sciences*, n.172, p. 902-914, 2011a.
- CALVENTE, A.; ZAPPI, D. C.; FOREST, F.; LOHMANN, L. G. Molecular phylogeny of tribe Rhipsalideae (CACTACEAE) and taxonomic implications for Schlumbergera and Hatiora. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. n.58, p. 456-468, 2011b.
- CARNAVAL, A. C. e BATES, J. M. Amphibian DNA shows marked genetic structure and tracks Pleistocene climate change in northeastern Brazil. *Evolution*. 61: 2942-2957. 2007.
- CARNAVAL, A. C., HICKERSON, M. J., HADDAD, C. F., RODRIGUES, M. T. e MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*. 323 (5915): 785-9. 2009.
- CARNAVAL, A. C.; WALTARI, E.; RODRIGUES, M. T.; ROSAUER, D.; VANDERWAL, J.; DAMASCENO, R.; PRATES, I.; STRANGAS, M.; SPANOS, Z.; RIVERA, D.; Pie, M. R.; FIRKOWSKI, C. R.; BORNSCHIEIN, M. R.; Ribeiro, L. F.; MORITZ, C. Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proceedings - Royal Society. Biological Sciences*. 281: 20141461-20141461. 2014.
- DOYLE, J. J. e DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull*. n. 19, p. 11-15, 1987.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, n. 7, p. 574–578, 2007.
- FREELAND, J. *Molecular Ecology*. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltda. 2005.
- GIOVANONI, S. S. Caracterização Genética de Populações de *Rhipsalis dissimilis* K. Schum. (CACTACEAE) no Estado do Paraná. Dissertação de Mestrado (Ecologia e Conservação) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- HUGHES, S. L.; RODRIGUEZ, V. M.; HARDESTY, B. D.; BARCENAS LUNA, R. T.; HERNANDEZ, H. M.; ROBSON, R. M.; HAWKINS, J. A. Characterization of microsatellite loci for the critically endangered cactus *Ariocarpus bravoanus*. *Molecular Ecology Resource*. 8:1068–1070. 2008.
- KOROTKOVA, N., Borsch, T., Quandt, D., Taylor, N.P., Müller, K.F. e Barthlott, W. What does it take to resolve relationship and to identify species with molecular markers? An example from the epiphytic Rhipsalideae (Cactaceae). *American Journal of Botany*. 98 (9): 1549-1572. 2011.

- MORAES, E. M.; PEREZ, M. F.; TÉO, M. F.; ZAPPI, D. C.; TAYLOR, N. P.; MACHADO, M. C. Cross-species amplification of microsatellites reveals incongruence in the molecular variation and taxonomic limits of the *Pilosocereus aurisetus* group (Cactaceae). *Genetica*. 140: 277-285. 2012.
- MYERS, N., MITTERMEIR, R. A., MITTERMEIR, C. G., FONSECA, G. A. e J. KENT. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403: 853-858. 2000.
- PEAKALL, R. O. D.; SMOUSE, P. E. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288–295. 2006.
- PEREZ, M. F.; TEO, M. F.; ZAPPI, D. C.; TAYLOR, N. P.; MORAES, E. M. Isolation, characterization, and cross-species amplification of polymorphic microsatellite markers for *Pilosocereus machrisii* (Cactaceae). *American Journal of Botany*. 98, e204–e206. 2011.
- RAFALSKI, J. A.; MORGANTI, M.; POWELL, W.; VOGEL, J.M.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIERREN, B. et al. (Ed.). *Analysis of non-mammalian genomes: a practical guide*. New York: Academia Press, p.75-134, 1996.
- RIBEIRO, M.C., METZGER, J.P., MARTENSEN, A.C., PONZONI, F., HIROTA, M.M. Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? *Implications for conservation. Biological Conservation*. 142: 1141–1153. 2009.
- SCHALL, B. A.; HAYWORTH, D. A.; OLSEN, K. M.; RAUSCHER, J. T. e SMITH, W. A. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, v. 7, p. 465-474, 1998.
- SIMPSON, B. B. Quaternary biogeography of the high montane regions of South America. *The South American herpetofauna: its origin, evolution, and dispersal* (ed. W.E. Duellman), pp. 157–188. Monographs of the Museum of Natural History University of Kansas, no. 7. 1979.
- SPECIES LINK. Electronic Database. 2008. Acesso em <http://splink.cria.org.br>. Mapa gerado em 10 Junho, 2014.
- SOLOZANO, S.; CORTES – PALOMEC, A. C.; IBARRA, A.; DAVILA, P.; OYAMA, K. Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite loci in the threatened endemic *Mammillaria crucigera* (Cactaceae). *Molecular Ecology Resource*. 9:156–158. 2009.
- SOS MATA ATLÂNTICA/INPE. Atlas dos remanescentes florestais da Mata 285 Atlântica, período 2005–2008. Fundação SOS Mata Atlântica & INPE. São Paulo. 2008.
- TAYLOR, N. P. Cactaceae. In *Cactus and Succulent Plants. Status Survey and Conservation Action Plan*. Compiled by Sara Oldfield. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 1997.
- THOMÉ M. T., ZAMUDIO, K., GIOVANELLI, J., HADDAD, C. F. B., BALDISSERA, F. JR. e ALEXANDRINO, J. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic forest. *Mol Phylogenet Evol*. 55: 1018–1031. 2010.
- VEKEMANS, X. & HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*. n.13, p. 921-935, 2004.
- WIENS, J. J. Global patterns of diversification and species richness in amphibians. *The American naturalist*. 170: S86-106. 2007.
- WILSON, G; RANNALA, B. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*. 163:1177–1191. 2003.
- WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations. Chicago: University of Chicago. 580p. 1978.