

**Filogeografia de *Rhipsalis crispata* e *Rhipsalis oblonga* (Cactaceae) na Mata Atlântica:
análise da interação entre diversificação do clado e distribuição altitudinal^{1,2}**

Valéria Braga França³

RESUMO

Processos microevolutivos têm sido considerados promotores de diversidade biológica. Há evidências de que a adaptação dos organismos as variações altitudinais em pequenas escalas espaciais podem contribuir substancialmente para a diversificação de algumas linhagens de angiospermas. Esta relação entre divergência de linhagens e distribuição geográfica tem sido verificada para algumas espécies chilenas de Cactaceae. Em alguns casos, divergências em caracteres morfológicos e fenológicos podem acompanhar as variações altitudinais e contribuir para o isolamento reprodutivo entre táxons próximos. Considerando a relevância de processos microevolutivos na origem da diversidade biológica, o objetivo deste trabalho é verificar a relação entre diversidade genética em duas espécies irmãs de Cactaceae, *Rhipsalis crispata* (Haw.) Pfeiff. e *Rhipsalis oblonga* Loefgr., e suas distribuições altitudinais. Nossa expectativa é de que diferenças genéticas em pequenas escalas possam ser observadas associadas a variações altitudinais. Tais diferenças genéticas podem ser acompanhadas por modificações morfológicas e fenológicas intraespecíficas. Variações morfológicas e fenológicas associadas a restrita área de sobreposição altitudinal podem ter sido determinantes no isolamento reprodutivo entre tais espécies irmãs. Dentro deste cenário, este estudo filogeográfico contribuirá para rastrear a história demográfica e a diversidade genética destas espécies em função de variações altitudinais e para testar a hipótese de associação da origem e delimitação de linhagens evolutivas no gênero *Rhipsalis* com a altitude.

¹ Orientador: João Miguel de Barros Alexandrino (j.alexandrino@unifesp.br), Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, UNIFESP- Diadema.

² Co-orientadora: Silvana Buzato (sbuzato@usp.br), Departamento de Ecologia, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, IB – USP.

³ Aluna de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da UNIFESP- Diadema, Laboratório de Genética Evolutiva (valeria.braga@unifesp.br).

INTRODUÇÃO

A família Cactaceae compreende cerca de 124 gêneros e 1438 espécies (Hunt *etal.* 2006), sendo predominantemente neotropical. Ocorre em uma grande diversidade de habitats, principalmente em ambientes áridos e semiáridos, entretanto cerca de 220 espécies são adaptadas à vida epifítica e se desenvolvem em florestas tropicais e subtropicais úmidas (Bauer & Weachter 2006). As cactáceas epífitas concentram-se principalmente em duas tribos da subfamília Cactoideae (Hylocereeae e Rhipsalideae), com centros de diversidade nas florestas da América Central e na Mata Atlântica brasileira, onde são mais abundantes na região Sudeste, principalmente nos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Taylor & Zappi 2004). Estudo realizado por Barthlott (1983), que analisou a biogeografia e evolução da subtribo Rhipsalideae nos paleotrópicos, mostrou que há dois centros de riqueza das espécies da tribo, uma ampla área no sudeste do Brasil e outra menor no leste da Bolívia. Estudos baseados em características morfológicas (Korotkova 2011, Calvente *etal.* 2008, Calvente & Andreata 2005, Nyffeler 2002, Lombardi 1995) e mais recentemente em análises moleculares, sustentam o monofiletismo de Cactaceae (Calvente *etal.* 2011, Hernández-Hernández *etal.* 2011, Korotkova *etal.* 2011) mas divergem quanto a sua divisão em três subfamílias, Pereskioideae, Opuntioideae e Cactoideae, ou quatro, com a inclusão da subfamília Maihuenioideae.

A família Cactaceae no Brasil é constituída por 37 gêneros, o que corresponde a 30% de seu total (Taylor & Zappi 2004). O gênero *Rhipsalis* Gärtner (1788) é formado por 35 espécies (Barthlott & Taylor 1995, Taylor & Zappi 2004) e representa o mais abundante em cactáceas epífitas, com cerca de 81% das espécies endêmicas do Brasil (Calvente *etal.* 2011), divididas em 5 subgêneros de acordo com variações em características morfofisiológicas, especialmente no formato dos segmentos e flores. *Phyllarthrorhipsalis* é

o subgênero mais diverso, contém 13 espécies onde a característica predominante é a forma achatada do caule.

Considerando a relevância de processos microevolutivos como um mecanismo promotor de diversidade biológica (Schemske 2010, Waser 2001), o objetivo deste trabalho é verificar a relação entre diversidade genética em duas espécies irmãs de Cactaceae, *Rhipsalis crispata* (Haw.) Pfeiff. e *Rhipsalis oblonga* Loefgr., e suas distribuições altitudinais. Nossa expectativa é de que diferenças genéticas em pequenas escalas possam ser associadas a variações altitudinais. Tais diferenças podem estar associadas a modificações morfológicas e fenológicas intraespecíficas. Adicionalmente, a segregação de tais espécies irmãs em altitudes distintas poderiam condicionar barreiras de isolamento reprodutivo entre elas. Dentro deste cenário, este estudo filogeográfico contribuirá para rastrear a história demográfica e a diversidade genética destas espécies em função de variações altitudinais e para testar a hipótese de associação da origem e delimitação de linhagens evolutivas no gênero *Rhipsalis* com a altitude.

OBJETIVOS

Assim, os objetivos específicos deste projeto de pesquisa incluem:

- Descrever como a diversidade genética está estruturada nas espécies, delimitando linhagens evolutivas e inferindo tempos de divergência entre linhagens;
- Realizar inferências sobre a história demográfica das linhagens evolutivas identificadas, que poderão permitir discutir a biogeografia histórica e a diferenciação de populações/linhagens dentro da espécie;
- Investigar se padrões de estruturação genética dentro e entre espécies estão associados a variações altitudinais em pequenas escalas;

- Colocar a história evolutiva das espécie no contexto da história biogeográfica da região sub-tropical.

JUSTIFICATIVA

Apesar de estudos recentes de sistemática, o reconhecimento de alguns táxons de *Rhipsalis* ainda permanece problemática devido à plasticidade dos atributos morfológicos bem como ausência de informação sobre os padrões de variações morfológicas intraespecíficas (Calvente 2010). A compreensão dos padrões de diversificação de algumas espécies do subgênero *Phyllarthrorhipsalis*, por meio de estudos filogeográficos que integrem princípios de biogeografia, filogenia e genética de populações, podem fornecer informações novas capazes de esclarecer as ambiguidades que dificultam um tratamento taxonômico adequado. A análise da variabilidade genética nas populações e sua distribuição entre os indivíduos permite a identificação de linhagens evolutivas e dos centros de origem e diversificação da espécie. Essas informações, entre outras aplicações, são fundamentais para caracterizar a história evolutiva da espécie, estimar o fluxo gênico entre as populações, identificar o nível de endogamia e propor medidas de conservação mais eficazes para espécies raras, endêmicas ou ameaçadas. Nesse contexto, para o desenvolvimento desse trabalho foram escolhidas duas espécies irmãs dentro do grupo de Cactáceas epifíticas: *Rhipsalis crispata* e *R. oblonga*. Apesar de *R. crispata* e *R. oblonga* estarem bem resolvidas filogeneticamente (Korotkova *etal.* 2011), estudos indicam que há elevado grau de polimorfismo nessas espécies com variações interpopulacionais (Calvente *etal.* 2011, Barthlott & Taylor 1995). Além do mais, *Rhipsalis crispata* é uma espécie vulnerável e de acordo com listagens do ICMBio e CITES, necessita de mais estudos, o que corrobora a necessidade de uma análise mais detalhada e abrangente desses táxons.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sistema de Estudo – *Rhipsalis crispata* e *R. oblonga* são epífitas e possuem ramos pendentes que podem alcançar até 2 metros de comprimento. São espécies filogeneticamente aparentadas, endêmicas da Mata Atlântica e sinconopátricas em algumas regiões, sobretudo nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Estas espécies diferem morfológicamente quanto ao tamanho das aréolas e espessura dos segmentos dos cladódios. *Rhipsalis crispata* possui estruturas areolares maiores e os segmentos mais espessos e amplos com as margens acentuadamente crenadas. Além disso, *Rhipsalis crispata* floresce no inverno enquanto *Rhipsalis oblonga* floresce entre primavera-verão (Taylor & Zappi 2004).

Rhipsalis crispata é preferencialmente epífita e elemento de florestas úmidas e matas de brejo, mas nas regiões costeiras pode ocorrer em dunas e restingas, crescendo como litófito. A distribuição geográfica desta espécie é disjunta e ocorrerem em altitudes que variam do nível do mar até 900 metros. No estado de Pernambuco está frequentemente associada com matas de brejo e agreste; no Rio de Janeiro, Santa Catarina e Bahia habita as região litorânea, e em São Paulo, a espécie pode ocorrer nas matas costeiras ou em matas estacionais de planalto (Figura 1, Zappi *etal.* 2007, Taylor & Zappi 2004).

Rhipsalis oblonga é uma espécie que ocorre no leste do Brasil, da Bahia até São Paulo, em ambientes úmidos e sombreados, em matas de encosta, cordões arenosos e restinga. Se estabelecem preferencialmente em baixas elevações, até os 400 metros, entretanto Barthlott e Taylor (1995) registraram uma população variante com frutos vermelhos que ocorre na Serra dos Órgãos, no Rio de Janeiro, a 1.300 metros de altitude.

Área de Estudo – As áreas de coleta do presente trabalho compreendem a Mata Atlântica brasileira nas regiões costeiras e de planalto, entre Pernambuco e Santa Catarina, em

altitudes que vão desde o nível do mar até altitudes superiores a 1.500 m em localidades como as da Serra dos Órgãos (RJ). Ao longo da área de ocorrência das espécies procuraremos evitar que as coletas sejam feitas em áreas sujeitas a alteração antrópica, uma vez que tais alterações contemporâneas podem alterar fluxo gênico entre indivíduos e espécies (Riesenberg *etal.* 1996), com consequências para os resultados das análises moleculares. As coletas serão definidas com base nos registros de ocorrência oriundos de referências bibliográficas e bancos de dados digitais (*GBIF*, *SPECIESLINK*, *JABOT*). A partir destes registros, áreas com altas chances de ocorrência serão vistoriadas e na presença da espécie em campo, a coleta de material será feita.

Metodologia – Os trabalhos de campo ocorrerão entre os meses de outubro a dezembro de 2012. As populações para a análise serão escolhidas por amostragem e ao longo da área de distribuição de *R. crispata* e *R. oblonga* será coletada epiderme dos cladódios e segmentos da ponta de raízes adventícias de 10 indivíduos por ponto georreferenciado para a extração de DNA genômico e amostras da planta para o preparo de exsicatas de material testemunho . As análises genéticas serão feitas após a coleta do material, sendo o término destas análises previsto para final do primeiro semestre de 2013 (vide cronograma). Protocolos de extração e manipulação do material genético dessas espécies seguirão procedimentos empregados em outros estudos filogenéticos da família Cactaceae (vide Anexo, Korotkova 2011). As sequências de marcadores escolhidos são baseadas em experiências prévias em estudos similares em plantas (filogenia e filogeografia) bem como no sucesso destes marcadores para grupos de Cactaceae (Gonzáles *etal.* 2009, Taberlet *etal.* 2007). Serão utilizadas regiões de plastídios sujeitas a variações temporais rápidas, *trnK/matK*, *trnS-G*, *rps3-rpl16*, *rpl16* intron bem como os marcadores nucleares ITS e *phyC* (Hernández-Hernández *etal.* 2011,

Korotkova 2011, Edwards *etal.* 2005). Redes de haplótipos com boa resolução foram obtidas nos espaçadores *rps3-rpl16* e *rpl16* intron para resolver os padrões de distribuição de *R. baccifera* (Korotkova 2011) e podem ser indicados para análises filogeográficas em *Rhipsalis crispata* e *R. oblonga*.



Figura 1: Distribuição de *Rhipsalis crispata* e *R. oblonga* no Brasil. Note a distribuição predominantemente associada a Mata Atlântica de encosta – **Fonte:** T.C. Giannini, dados não publicados.

Obtenção do DNA genômico - O material genético será extraído de tecidos ou raízes oriundos das coletas de campo e previamente desidratado em sílica-gel. O tecido seco será homogeneizado e incubado por 20 min a 65°C em meio de 700 µl de solução tampão, contendo 2% CTAB, 1% PVP, 100 mM Tris (pH8), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, a 0.2vol% mercaptoethanol e as etapas posteriores seguem os procedimentos descritos por Borsh *etal.*

(2003). O DNA genômico será extraído usando DNeasy Plant Mini Kit da QIAGEN, específico para material biológico de origem vegetal. A concentração e pureza do DNA (proporções A260/A280 bem como A260/A230) serão mensuradas em um espectrofotômetro. A quantidade total de DNA genômico será armazenada a -30°C, sendo posteriormente diluída em uma solução padrão com concentração de 10ng/ul para uso no PCR (Korotkova 2011).

Amplificação e seqüenciamento – Todos os *primers* e condições de amplificação são listados no apêndice e seguem as instruções fornecidas por Korotkova (2011). Os produtos serão purificados através de um gel de extração (QIAGEN, Inc., Valencia, CA, USA) e sequenciados em um sequenciador automático de capilar ABI 3100 Genetic Analyzer/Applied Biosystems (Korotkova 2011, Borsch *etal.* 2003).

Análise dos resultados - Os dados de sequências de DNA serão alinhados com algoritmos disponíveis na literatura (ClustalW, Larkin *etal.* 2007). Sequências nucleares serão faseadas com o algoritmo PHASE (Stephens & Donnelly 2003) e testadas para eventos de recombinação. A estrutura primária dos dados de sequência será avaliada através da produção de árvores de genes individuais e redes de haplótipos. Para a identificação de linhagens e suas relações de parentesco serão construídas árvores de genes obtidas por reconstruções filogenéticas usando métodos bayesianos (programa MrBayes 3.1, Huelsenbeck & Ronquist, 2001), de parcimônia e de máxima verossimilhança (no programa PAUP versão 4.0* b10, Swofford 2000).

Para os métodos bayesianos e de máxima verossimilhança a escolha do melhor modelo para os dados obtidos será feita no programa Modeltest v. 3.7 (Posada & Crandall 1998). O modelo será utilizado para inferir a topologia de árvores genealógicas. A avaliação

do suporte estatístico de clados resultantes das reconstruções filogenéticas será baseada em probabilidades posteriores, no caso de análises bayesianas, e em métodos de *bootstrap*, no caso de análises de parcimônia e de máxima verossimilhança. Como grupo externo será utilizado *Rhipsalis baccifera*, uma vez que esta espécie possui ampla área de distribuição e existem dados filogeográficos disponíveis na literatura (Korotkova 2011). Redes de haplótipos serão construídas usando o algoritmo desenvolvido por Templeton (Templeton 1998) e implementado no programa TCS (Clement *etal.* 2000).

A estrutura populacional também será deduzida com dados multilocus usando abordagens de “árvores de espécies” (*BEAST, Heled & Drumond 2010) ou por análises de alocação a grupos populacionais (STRUCTURE, Pritchard *etal.* 2000), de acordo com os níveis de divergência encontrados dentro de *R. crispata* e *R. oblonga*. Para estimar os tempos de divergência (em unidades coalescentes), bem como as taxas históricas de fluxo gênico entre populações, usaremos métodos multilocus e modelos coalescentes de isolamento-com-migração (Hey & Nielsen 2007).

Para inferência sobre a história demográfica das populações ou linhagens vamos usar várias estatísticas demográficas, incluindo testes de expansão (F_s , R_2 , Ramos–Onsins & Rozas 2002, Fu 1997), estimativas multilocus coalescentes de crescimento (LAMARC, Kuhner 2006) e estimativas de variação de tamanhos populacionais ao longo do tempo (EBSP, Drummond & Rambaut 2007). Como a estrutura populacional afeta as estimativas de parâmetros ancestrais, essas análises serão conduzidas somente para grupos populacionais geneticamente homogêneos. Cada grupo genético será georreferenciado usando sistemas de informação geográfica, contendo dados sobre tipos de vegetação, variações do solo e ecorregiões para que sejam analisados possíveis associações de padrões geográficos de diversidade genética com variáveis ecológicas.

CRONOGRAMA

Atividades:	Mar-Jul 2012	Ago-Dez 2012	Jan-Jul 2013	Ago-Dez 2013	Jan-Mar 2014
Elaboração do projeto de pesquisa					
Obtenção de créditos					
Coletas de campo e análises laboratoriais					
Organização e análise dos dados					
Redação de relatórios e manuscritos					
Participação em congressos					
Redação de manuscritos e dissertação					
Defesa de dissertação					

RESULTADOS ESPERADOS

Os resultados deste projeto contribuirão para o conhecimento dos fatores que determinam a diversificação de *Rhipsalis crispata* e *Rhipsalis oblonga* na Mata Atlântica, bem como para um melhor entendimento do subgênero *Phyllarthrorhipsalis*. Os dados obtidos sobre a estrutura filogeográfica dessas populações poderão contribuir para a compreensão da influência das variações climáticas ocorridas nos últimos anos na composição e diversidade dos organismos nos neotrópicos. Os resultados serão apresentados à comunidade científica através de manuscritos a serem submetidos a revistas especializadas e sob a forma de apresentações em reuniões, simpósios e congressos internacionais.

COLABORAÇÃO E APOIO

O projeto está sendo co-orientado pela Profª. Silvana Buzato (Departamento de Ecologia, I.B., USP). Com base no conhecimento ecológico do grupo, esta pesquisadora está sugerindo a seleção das espécies e auxiliando na proposição de hipóteses a serem testadas quanto aos fatores atuantes na diversificação das linhagens e origem de espécies no grupo. O suporte logístico para o desenvolvimento deste projeto está vinculado ao Programa de Pós-Graduação da UNIFESP – Diadema e Departamento de Ecologia, I.B., USP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTHLOTT, W. 1983. Biogeography and evolution in Neo and Paleotropical *Rhipsalinae* (Cactaceae). Dispersal and Distribution: *An International Symposium*. Sonderbände des Naturwissenschaftlichen Vereins, Hamburg. 7: 241-248.
- BARTHLOTT, W. & Taylor, N.P. 1995. Notes towards a monograph of Rhipsalideae (Cactaceae). *Bradleya*. 13: 43-78.
- BAUER, D. & Weachter, J.L. 2006. Sinopse taxonômica de Cactáceas epifíticas no Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 20: 225-239.
- BORSCH, T., Hilu, K.W., Quandt, D., Wilde, V., Neinhuis, C. & Barthlott, W. 2003. Noncoding plastid *trnT-trnF* sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. *Journal Evolutionary Biology*. 16: 558-576.
- CALVENTE, A., Zappi, D.C., Forest, F. & Lohmann, L.G. 2011. Molecular phylogeny of tribe Rhipsalideae (Cactaceae) and taxonomic implications for *Schlumbergera* and *Hatiora*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 58: 456-468.
- CALVENTE, A., Zappi, D.C., Forest, F. & Lohmann, L.G. 2011. Molecular phylogeny, evolution and biogeography of South American epiphytic cacti. *International Journal of Plants Sciences*. 172 (7): 902-914.
- CALVENTE, A. 2010. Filogenia molecular, evolução e sistemática de *Rhipsalis* (Cactaceae). *Dissertação de Doutorado*. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CALVENTE, A.M., Andreata, R.H.P. & Vieira, R.C. 2008. Stem anatomy of *Rhipsalis* (Cactaceae) and its relevance for taxonomy. *Plant Systematics and Evolutions* 276: 1-7.
- CALVENTE, A.M., Freitas, M.F. & Andreata, R.H.P. 2005. Listagem, distribuição geográfica e conservação das espécies de Cactaceae no Estado do Rio de Janeiro. *Rodriguésia*. 56: 141-162.
- CLEMENT, M., Posada, D & Crandall, K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657-1660.
- DRUMMOND, A.J. & Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214.

- EDWARDS, E.J., Nyffeler, R. & Donoghue, M.J. 2005. Basal cactus phylogeny: Implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. *American Journal of Botany*. 92: 1177-1188.
- FU, Y.X. 1997. Statistical neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147: 915–925.
- GONZALEZ, M.A., Baraloto, C., Engel, J., Mori, S.A. & Pétronelli, P. 2009. Identification of amazonian trees with DNA barcodes. *PLoS ONE*. 4: e7483.
- HELED, J. & Drummond, A.J. 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*., 27: 570–580.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, T., Hernández, H.M., De-Nova, J.A., Puente, R., Eguiarte, L.E. & Magallón, S. 2011. Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany*. 98: 44-61.
- HEY, J. & Nielsen, R. 2007. Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104: 2785–90.
- HILU, K.W. & Liang, H.P. 1997. The *matK* gene: Sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany*. 84: 830-839.
- HUELSENBECK, J. P. & Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 17: 754-755.
- HUNT, D., Taylor, N.P. & Charles, G. 2006. The News Cactus Lexicon, *Atlas & Text*. Dh Books, Milborne Port..
- JOHNSON, L.A. & Soltis, D.E. 1995. Phylogenetic in *Saxifragaceae* s.str. and *Gilia* (Polemoniaceae) using *trnK* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 82: 149-175.
- KOROTKOVA, N. 2011. Phylogeny and evolution of the epiphytic Rhipsalideae. *Dissertação de Doutorado*. Universität Bonn, Moskau.
- KOROTKOVA, N., Borsch, T., Quandt, D., Taylor, N.P., Müller, K.F. & Barthlott, W. 2011. 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.
- KUHNER, M. K. 2006. LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics*. 22: 768–770.
- LARKIN, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G. 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*. 23: 2947–2948.
- LOMBARDI, J.A. 1995. O gênero *Rhipsalis* Gärtner (Cactaceae, no Estado de São Paulo. *Acta Botanica Brasilica*. 9 (1): 151-161.
- MÜLLER, K.F. & Borsch, T. 2005. Phylogenetics of *Amaranthaceae* based on *trnK/matK* sequences data – Evidence from Parsimony, Likelihood and Bayesian analyses. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 92: 66-102.
- NYFFELER, R. 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence form *trnK-matK* and *trnL-trnF* sequences. *American Journal of Botany*. 89: 312-326.
- POSADA, D. & Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the modelo of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14: 817-818.
- PRITCHARD, J. K.; Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945–959.
- RAMOS-ONSINS, S.E. & Rozas, J., 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*. 19: 2092–2100.
- RIESEBERG, L.H., Whitton, J. & Linder, C.R. 1996. Molecular marker incongruence in plant hybrid zones and phylogenetic trees. *Acta Botanica Neerlandica*. 45: 243-262.
- SCHEMSKE, D.W. 2010. Adaptation and the origin of species. *The American Naturalist*. 176:S4-S25.
- SHAW, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E. & Small, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*. 94: 275-288.

- SHAW, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Müller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E. & Small, R.L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*. 92:142-166.
- STEPHENS, M., Smith, N.J. & Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*. 68:978-989.
- SWOFFOD, D. 2000. Phylogenetic analysis using parsimony (PAUP 4.0* b10). *Sinauer Associates*, Sunderland, MA.
- TABERLET, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A. Vermat, T., Corthier, G., Brochmann, C. & Willerslev, E. 2007. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research*. 35: e14.
- TAYLOR, N. & Zappi, D.C. 2004. Cacti of Eastern Brazil. Richmond, Surrey: *Kew*, 499 pp.
- TEMPLETON, A. R. 1998. Nested clade analysis of phylogeographic data. *Molecular Ecology*. 7: 381-397.
- WASER, N.M. 2001. Pollinator behavior and plant speciation: looking beyond the ethological isolation paradigm. Pages 318-335. In: L. Chittka & J.D. Thomson (eds.). *Cognitive ecology of pollination*. Cambridge University Press, Cambridge.
- WICKE, S. & Quandt, D. 2009. Universal *primers* for the application of the plastid *trnK/matK* region in land plants. *Anales Jardin Botanical Madrid*. 66: 285-288.
- WORBERG, A. 2009. Non-coding and fast-evolving chloroplast genomic regions and their utility for reconstructing evolutionary relationship among eudicots: towards resolving the radiation of the rosids. PhD Thesis, *Nees Institute for Biodiversity of Plants*, Universität Bonn.
- ZAPPI, D., Aona, L.Y.S. & Taylor, N. 2007. Cactaceae. Pp. 163-193 in: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J. Melhem, T.S. & Giulietti, A.M. (eds.), *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*, vol 5. *Instituto de Botânica*, São Paulo.

APÊNDICE 1:

O protocolo de amplificação de PCR foi retirado Korotkova (2011) e segue os procedimentos utilizados por esta autora para estudos de filogenia e filogeografia de *Rhipsalis*.

PCR amplification protocols

- DNA working dilution: 10 ng / µl;
- Primer stock concentration: 100 mmol @l (MWG Biotech, Ebersberg/Germany);
- Primer working concentration: 20mmol.

PCR reagents used

Taq Polymerase:

- SAWADY Taq DNA polymerase (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany)
- GoTaq® Flexi DNA polymerase (Promega Corp., Madison, USA, cat. no. M830A)

Taq polymerase buffers and magnesium chloride (all reagents supplied by the manufacturer of the polymerase):

- for SAWADY Taq DNA polymerase:

- peqLab Buffer Y: 200 mM Tris-HCl (pH 8.55 at 25°C), 160 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween
- 20 (red cap) and 20 mM MgCl₂, increases product yield).
- peqLab Buffer S: (100 mM Tris-HCl (pH 8.8, 500 mM KCl, 0.1 % Tween 20, 15 mM MgCl₂), increases polymerase specificity.
- 25mM MgCl₂ (cat. no. A351B)

- for GoTaq® Flexi DNA polymerase:

- 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega Corp., Madison, USA, cat. no. M890A)
- 25mM MgCl₂ (cat. no. A351H)

- dNTPs:

- peqGOLD dNTP-Set 4x25 @mol (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany; cat. no. 20-2010)
- dNTP Set 1 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany; cat. no. K 0.39.1)

- PCR nucleotide mix (Promega Corp., Madison, USA, cat. no. C1141)

- PCR additives:

- PVP (Polyvinylpyrrolidone) 10%
- 5 M Betaine

Reaction mixtures

Reaction mixture using SAWADY Taq-DNA-Polymerase, total volume: 50 µl

2 µl solution of DNA template à 20 ng/µl
 5 µl 10x peqLab Taq Buffer S or Y
 0 - 3 µl MgCl² 25mM
 0 - 5 µl Betaine (5 M)
 0 - 2,5 µl PVP (10%)
 2 µl Forward primer (20pm/µl)
 2 µl Reverse primer (20pm/µl)
 10 µl dNTP (each 1,25mM)
 0,3 µl peqLab Taq polymerase
 ad H²O p.a. grade

Reaction mixture using GoTaq® Flexi DNA polymerase, total volume: 50 µl

2 µl solution of DNA template à 20 ng/µl
 6 µl MgCl² 25mM
 10 µl 5x GoTaq® Flexi Buffer
 2 µl Forward primer (20pm/µl)
 2 µl Reverse primer (20pm/µl)
 0 - 2,5 µl Betaine (5 M)
 0 - 5 µl PVP 10%
 8 µl dNTP (each 1,25 mM) *or* 1 µl PCR nucleotide mix
 0,25 µl GoTaq® flexi DNA polymerase @ 5units/µl
 ad H²O p.a. grade

Primers used and amplification conditions

(Directions: F: forward, R: reverse. Application: A: amplification, S: sequencing).

***trnS-trnG* region (*trnS-trnG* intergenic spacer, *trnG* intron)**

Primers used

primer name	sequence (5'-3')			Reference
<i>trnS</i>	AACTCGTACAACGGATTAGCAATC	F	A,S	Shaw et al. 2007
<i>trnG</i>	GAATCGAACCCGCATCGTTAG	R	A,S	Shaw et al. 2007
<i>trnG2G</i>	GCGGGTATAGTTTGTAGTGGTAAAA	F	S	Shaw et al. 2005
<i>trnG2S</i>	TTTTACCACTAAACTATACCCGC	R	S	Shaw et al. 2005
<i>CAtrnSG-650F</i>	AGGAGGAGAGATAATAAACG	F	S	this study
<i>CAtrnSG-400F</i>	CAAAGTAATGCTAAAATTCTG	F	S	this study
<i>CAtrnG-40R</i>	GGAATAGTAATCAAACCGG	R	S	this study

PCR conditions:

- 1) initial denaturation: 2 min at 95°C,
- 2) 35 cycles of 0:30 min at 95°C, 1 min. at 58°C, 2 min at 72°C,
- 3) final extension step of 15 min. at 72°C.

***rps3-rpl16* spacer, *rpl16* intron**

Primers used

primer name	sequence (5'-3')			Reference
<i>CArps3F</i>	GATTATTGCGCCTATCCG	F	A,S	this study
<i>CArpl16R</i>	CCGATAAGATAATCCCTTCA	R	A,S	this study
<i>CArpl16-400R</i>	GAACTTTGTTCTTGAGCC	R	S	this study
<i>CArpl16-700R</i>	GYTAAAATAAAATTGGAGCCATC	R	S	this study

PCR conditions:

- 1) initial denaturation: 2 min at 95°C,
- 2) 35 cycles of 0:30 min at 95°C, 1 min. at 55°C, 1:30 min at 72°C,
- 3) final extension step of 15 min. at 72°C.

***trnK/matK* region**

Primers for amplification (A) and sequencing (S)

primer name	sequence (5'-3')			Reference
<i>trnK-F</i>	GGGTTGCTAACTCAATGGTAGAG	F	A,S	Wicke & Quandt 2009
<i>trnK3914Fdi</i>	GGGGTTGCTAACTCAACGG	F	A,S	Johnson & Soltis 1995
<i>trnK-2R</i>	AACTAGTCGGATGGAGTAG	R	A,S	Johnson & Soltis 1995
<i>ROSmatK-655R</i>	GGATTCGTATTACATACAT	R	A,S	Worberg 2009
<i>ROSmatK-530F</i>	AGATGCCTCTTCTTTGC	F	A,S	Worberg 2009
<i>ACmatK500F</i>	TTCTTCTTTGCATTTATTACG	F	A,S	Müller 2002
<i>ACmatK650R</i>	GGATTCATATTACATACATRG	R	S	Müller 2002
<i>ACmatK1300F</i>	ATAAAGTATATACTTCGAC	F	S	Müller & Borsch 2005
<i>trnK-71R</i>	CTAATGGGATGTCCTAATAC	R	S	Nyffeler 2002
<i>CAtrnK-270R</i>	GAGCTTATCTTCGTAATTTG	R	S	Korotkova et al. 2010

PCR conditions:

- 1) initial denaturation: 1:30 min at 95°C,
- 2) 35 cycles of 0:30 min at 95°C, 1 min. at 50°C, 1:30 min at 72°C
- 3) final extension step of 20 min. at 72