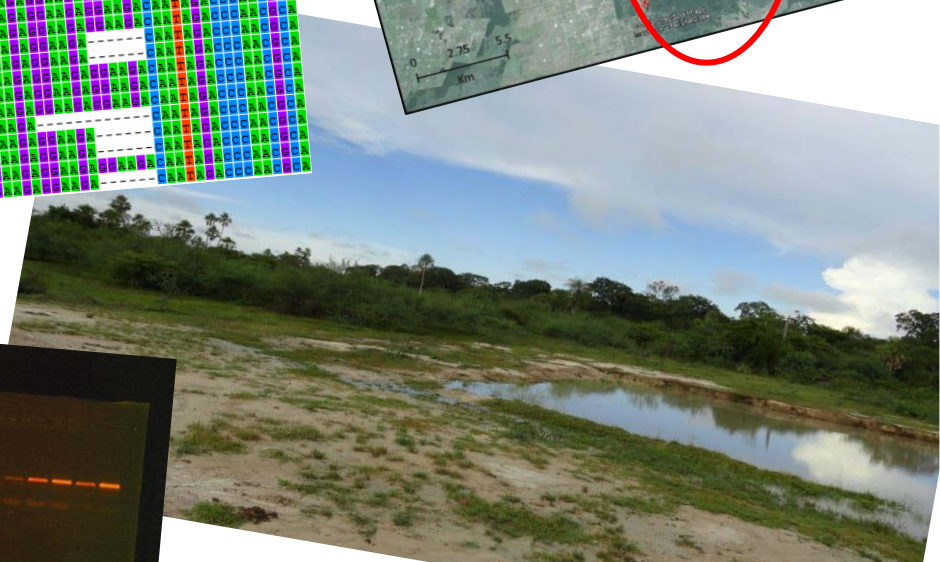
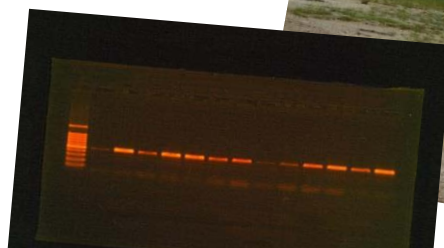
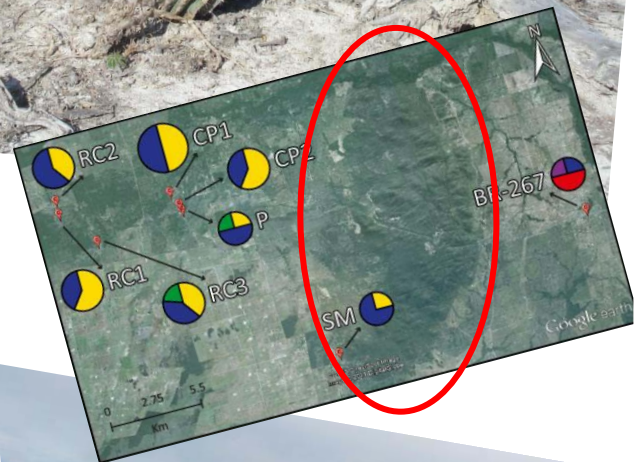
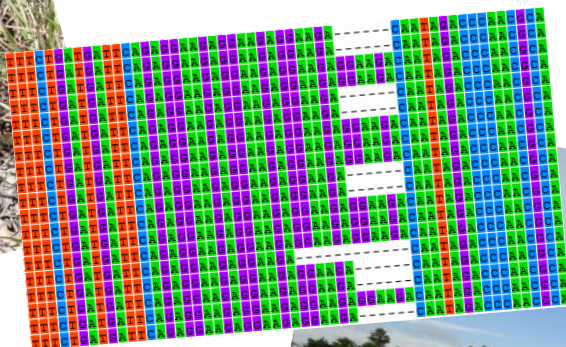
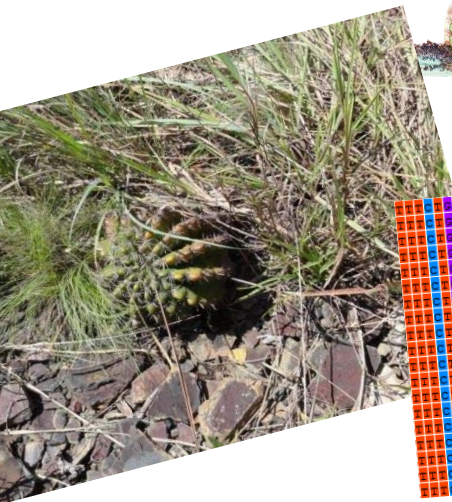


FILOGEOGRAFIA E GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DO GÊNERO *ECHINOPSIS* (CACTACEAE) NO PANTANAL BRASILEIRO

Wesley Covre

Aline Lorenz-Lemke





Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal
Laboratório de Evolução e Biodiversidade



WESLEY DA SILVA COVRE

**FILOGEOGRAFIA E GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DO GÊNERO
ECHINOPSIS (CACTACEAE) NO PANTANAL BRASILEIRO**

Orientador: Profa. Dra. Aline Pedroso
Lorenz Lemke

Campo Grande
Março/2013



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal
Laboratório de Evolução e Biodiversidade



WESLEY DA SILVA COVRE

Filogeografia e genética da conservação do gênero *Echinopsis* (Cactaceae) no Pantanal brasileiro

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

Campo Grande

Março/2013

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Aline Pedroso Lorenz Lemke, pelo empenho e dedicação ao me iniciar na área da Genética e Conservação de Plantas, pelas oportunidades oferecidas, e por confiar este trabalho a mim;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, e à FUNDECT, pelo financiamento deste estudo;

À Dra. Letícia Jungmann Cançado, Profa. Dra. Gecele Matos Paggi, e Profa. Dra. Andrea Cardoso de Araujo, pelas sugestões dadas na qualificação;

Ao Prof. Dr. Geraldo Alves Damasceno Junior, Prof. Dr. Arnildo Pott, Profa. Dra. Ângela Lúcia Bagnatori Sartori, e Ma. Thayane Ely Lima, pelas informações sobre os locais de ocorrência das espécies, vias de acesso, e pelos contatos das mineradoras/fazendeiros;

Ao Sr. Marconi Andrade dos Anjos (Gerente de Meio Ambiente), Dra. Rosilene Rodrigues Silva (Analista de Meio Ambiente), e Eng. Felipe Tadashi Asao Coelho (Analista de Meio Ambiente), da Vale Complexo Corumbá; e Sr. Sérgio, Sr. Mauro, e Sr. “Bala”, proprietários de fazendas em Porto Murtinho, pelas autorizações de acesso às áreas de coleta; e Sr. Victor Bardasson Moreira (Meio Ambiente), da MMX Sistema Corumbá, pela permissão da realização de estudos com *E. calochlora* na área da empresa;

À Profa. Dra. Iria Hiromi Ishii, pela sua simpatia e disposição em ajudar nas coletas de *E. calochlora* no Maciço do Urucum, desde o primeiro contato, mesmo sem me conhecer;

À Profa. Dra. Gecele Matos Paggi, pelo apoio logístico em Corumbá;

Ao Seu Dirceu, morador da Morraria do Mutum-Jacadigo, um exemplo de simplicidade e gentileza, por ter me recebido tão bem, e prontamente se disponibilizado a me acompanhar na subida do morro ao fundo de sua casa;

Ao Me. Carlos Rodrigo Lehn, pela parceria para a coleta de *E. calochlora* na Morraria de São Domingos;

A Thiago Stefanello, Luan, Tiago Green, Joãozinho, Wellinton, Marquito, Profa. Iria, Fábio Kochanowski, Maria Ana, Mariana, Thabata, e Wand, pelo auxílio nas suadas, porém divertidas coletas;

Ao doutorando Danilo Rafael Mesquita Neves, pelas informações sobre o polinizador e o dispersor de *Echinopsis calochlora*;

Aos professores do PPGBV/UFMS (Profa. Dra. Maria Rosângela Sigrist, Profa. Dra. Edna Scremin Dias, Profa. Dra. Ângela Lúcia Bagnatori, Profa. Dra. Maria Rita Marques, Prof. Dr. Geraldo Alves Damasceno Junior, Prof. Dr. Arnildo Pott, Prof. Dr. Valdemir Antônio Laura, Profa. Dra. Gecele Matos Paggi, e Profa. Dra. Aline Pedroso Lorenz Lemke), pela excelente formação que me proporcionaram, e à secretária do programa, Ariana Françoze Pavão, pela eficiência na resolução dos assuntos burocráticos, quando necessários;

À minha estagiária Carol, pela ajuda no laboratório, e todo o pessoal do LEBio (Thabata, Ana Letícia, Pedro, Weg, Nicolay, Luciana, Letícia, e tantos outros), pela boa convivência no dia a dia do laboratório;

À Profa. Dra. Gecele Matos Paggi, e Prof. Dr. Arnildo Pott, pelas correções e sugestões que ajudaram a enriquecer a versão final deste manuscrito;

Aos meus pais, Sérgio Luiz Covre e Sônia Aparecida da Silva Covre, pelo apoio incondicional durante esses dois anos de mestrado, e toda a minha vida;

A Diogo, Lala, Lili, Anicreide, Suzicreide e Wandiléa, pela diversão nas festas da turma, viagens, e disciplinas;

À Thabata Borine, pela amizade, cafés no corredor central, sessões de reclamação conjunta quando nada estava dando certo, conversas improdutivas, apoio nos momentos críticos, e parceria nos divertidos. Sem você, a aventura não seria a mesma!

À Fábria, Jane e Zildamara, que conheci no Chaco e não larguei mais, por não recusarem um café ou “serrana”, toda sexta-feira! (só às vezes... por motivo de força maior) Amo vocês!

Índice

RESUMO	7
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO GERAL	11
Maciço do Urucum e Morraria do Mutum-Jacadigo	11
Chaco Brasileiro	17
O grupo de estudo	19
Tempo de geração e taxas de evolução molecular em Cactaceae	23
Consequências genéticas em populações pequenas e isoladas	25
Características do genoma plastidial e uso de sequências não-codificantes em estudos populacionais de plantas	27
Estudos genéticos populacionais em Cactaceae	29
Modelagem de distribuição potencial	31
OBJETIVO GERAL	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ARTIGO - Filogeografia e genética da conservação do gênero <i>Echinopsis</i> (Cactaceae) no Pantanal brasileiro	42
Resumo	51
Abstract	52
INTRODUÇÃO	53
MATERIAIS E MÉTODOS	55
RESULTADOS	62
DISCUSSÃO	65
LITERATURA CITADA	71
Tabelas	79
Apêndice	81
Figuras	82
CONSIDERAÇÕES FINAIS	86

RESUMO — O Pantanal é uma grande planície de formação recente, situada no centro da América do Sul, conhecida por seus ciclos anuais de inundação. A flora da região é caracterizada pela convergência de diversos grupos fitogeográficos e poucos endemismos, mas algumas exceções ocorrem em ambientes isolados da inundação. Este é o caso da cactácea *Echinopsis calochlora*, espécie ameaçada de extinção que habita altas altitudes em formações montanhosas com substrato rico em ferro (Maciço do Urucum e Morraria do Mutum-Jacadigo) na borda oeste do Pantanal. No extremo sudoeste do Pantanal, há outra formação vegetacional diferenciada, a intrusão do Chaco no Brasil, onde ocorre a cactácea congênica *E. rhodotricha*, localmente ameaçada pelo desmatamento para formação de pastagens. O presente estudo descreve a variabilidade genética populacional dessas espécies com o objetivo de contribuir para o estabelecimento de políticas de conservação nas áreas onde ocorrem. Para tanto, foram coletados fragmentos de ponta de raiz, de forma a não danificar os indivíduos, para posterior extração de DNA. Foram analisadas as sequências de dois espaçadores intergênicos do DNA plastidial: *psbA-trnH* e *trnS-trnG*. Os parâmetros genéticos populacionais estimados foram relacionados a padrões geográficos, atuais e do passado, obtidos através da construção de modelos de distribuição potencial baseados em variáveis bioclimáticas. Além disso, a posição de *E. rhodotricha* na filogenia de *Echinopsis* foi determinada através de uma análise de máxima verossimilhança com sequências obtidas por este trabalho e outras já publicadas. Foram amostradas 169 plantas de nove populações de *E. calochlora*, sete naturais, uma reintroduzida em área minerada e uma resgatada e mantida em casa de vegetação. Nos remanescentes de Chaco arborizado foi coletado material de 191 indivíduos de oito populações naturais de *E. rhodotricha*. Até o momento, foram

obtidas 11 sequências de *psba-trnH* para *E. calochlora* e 11 para *E. rhodotricha*, e 14 de *trns-trnG* para *E. calochlora* e 38 para *E. rhodotricha*. O marcador *psbA-trnH* não apresentou variação intraespecífica em ambas as espécies. As sequências de *trnS-trnG* geraram dois haplótipos em *E. calochlora* e cinco em *E. rhodotricha*. As análises das sequências de *E. rhodotricha* revelaram a ausência de estruturação genética significativa e de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas. *Echinopsis rhodotricha* assumiu uma posição basal no clado *Echinopsis sensu lato* e não está proximamente relacionada a *E. calochlora*. As distribuições potenciais estimadas para ambas as espécies durante o Último Máximo Glacial são substancialmente menores do que as de hoje, indicando que *E. calochlora* e *E. rhodotricha* provavelmente experimentaram ciclos de expansão e retração durante as alterações climáticas do Quaternário. Apesar de incipientes, as análises genéticas revelaram que *E. rhodotricha* apresenta maiores índices de diversidade genética se comparada a *E. calochlora*. A ausência de estruturação populacional em *E. rhodotricha*, mesmo com a análise de marcadores de herança materna, indica que há considerável fluxo gênico populacional e que a conectividade entre os únicos remanescentes de Chaco do Brasil deve ser mantida. Dada a baixa diversidade genética observada, para a obtenção de um panorama mais completo sobre a história evolutiva de ambas as espécies será necessária a ampliação do número de marcadores analisados. Desta forma, será possível uma contribuição mais efetiva da genética para a conservação e manejo destas espécies cujos habitats são únicos no Brasil e encontram-se extremamente ameaçados.

Palavras-chave: Chaco brasileiro; *Echinopsis calochlora*; *E. rhodotricha*; espécies endêmicas; Maciço do Urucum; modelagem de distribuição potencial; *trnS-trnG*

ABSTRACT (Phylogeography and conservation genetics of the genus *Echinopsis* (Cactaceae) in Brazilian Pantanal) — Pantanal is a large recent plain, at the center of South America, known by its annual flood cycles. Flora of the region is characterized by convergence of several phytogeographic groups and few endemisms, which occur mainly in flood-free environments. This is the case of the cactus *Echinopsis calochlora*, an endangered species that inhabits high altitudes on hills with high iron content (“Maciço do Urucum” and Mutum-Jacadigo’s Hill) at Pantanal west edge. In extreme Pantanal southwest, there is another distinct vegetation group, the Chaco intrusion in Brazil, where the cactus *E. rhodotricha* occurs, locally threatened by deforestation for pastures. The present study describes the intraspecific genetic variability of these species with the goal of contributing to the establishment of conservation policies. To do this, were collected root fragments in a way to not damage the individuals, for DNA extraction. Sequences of two plastidial DNA intergenic spacers were analyzed: *psbA-trnH* and *trnS-trnG*. The estimated population genetic parameters were related to current and past geographic patterns, obtained through the construction of potential distribution models based on bioclimatic variables. Additionally, the position of *E. rhodotricha* in *Echinopsis* phylogeny was determined through a maximum likelihood analysis with sequences obtained from this work and other ones already published. We sampled 169 plants from nine populations of *E. calochlora*, seven native, one reintroduced in an exploited area and one rescued and kept in the greenhouse. In wooded Chaco remnants we collected material from 191 individuals from eight native populations of *E. rhodotricha*. Until now, we obtained 11 *psbA-trnH* sequences for *E. calochlora* and 11 for *E. rhodotricha*, and 14 *trnS-trnG* sequences for *E. calochlora* and 38 for *E. rhodotricha*. The *psbA-trnH* marker did not show intraspecific variation in

both species. The *trnS-trnG* sequences produced two haplotypes in *E. calochlora* and five in *E. rhodotricha*. The analysis of the sequences from *E. rhodotricha* revealed the absence of significant genetic structure and of correlation between genetic and geographic distances. *Echinopsis rhodotricha* assumed a basal position in the *Echinopsis sensu lato* clade and is not closely related to *E. calochlora*. The potential distributions estimated for both species during the Last Glacial Maximum are substantially smaller than the current ones, indicating that *E. calochlora* and *E. rhodotricha* probably have undergone expansion and retraction cycles during the Quaternary climatic changes. Although being incipient, the genetic analysis revealed that *E. rhodotricha* has higher genetic diversity indices when compared to *E. calochlora*. The absence of population structuring in *E. rhodotricha*, even when analyzing maternally-inherited markers, indicate that considerable gene flow exists across populations and that the connectivity between the only Chaco remnants from Brazil should be maintained. Given the observed low genetic diversity, it will be necessary to increase the number of analyzed markers for the acquisition of a more comprehensive overview on the evolutionary history from both species. Thus, a more effective contribution from genetics to conservation and management of these species, whose habitats are unique in Brazil and stand extremely threatened, shall be possible.

Key words: Brazilian Chaco; *Echinopsis calochlora*; *E. rhodotricha*; endemic species; “Maciço do Urucum”; potential distribution modelling; *trnS-trnG*

INTRODUÇÃO GERAL

Maciço do Urucum e Morraria do Mutum-Jacadigo

O Pantanal é uma grande planície sedimentar (160 mil km²) situada no Centro-Oeste do Brasil (140 mil km²), leste da Bolívia (15 mil km²) e norte do Paraguai (5 mil km²; Junk et al., 2006). Sua topografia quase plana, em geral entre 80 e 150 m acima do nível do mar, ocasiona periódicos alagamentos em algumas sub-regiões devido à dificuldade de escoamento dos rios da Bacia do Rio Paraguai (Franco e Pinheiro, 1982). Em meio à planície inundável destacam-se dois conjuntos de formações montanhosas ao norte e ao sul da cidade de Corumbá, no estado de Mato Grosso do Sul (MS), na região fronteira com a Bolívia ([Fig. 1 A](#)). Estes conjuntos são representados pela Serra do Amolar e pelo Maciço do Urucum e Morraria do Mutum-Jacadigo, respectivamente (Franco e Pinheiro, 1982).

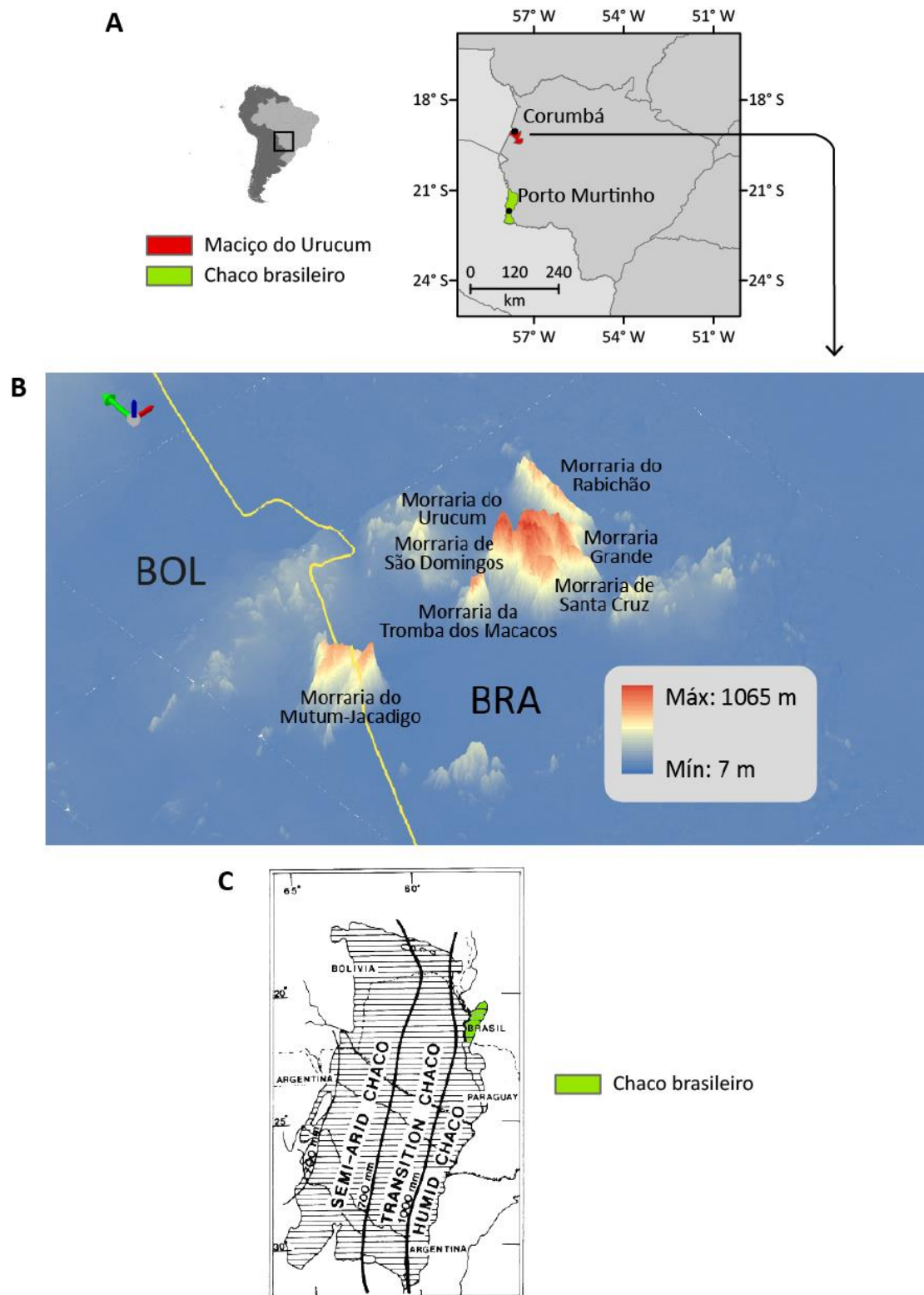


Figura 1. **A.** Localização do Maciço do Urucum e Morraria do Mutum-Jacadigo e da porção brasileira do Chaco no estado de Mato Grosso do Sul. **B.** Morrarias que compõem o Maciço do Urucum e Morraria do Mutum-Jacadigo, na borda oeste do Pantanal (adaptado de Franco e Pinheiro, 1982). BOL = Bolívia, BRA = Brasil. **C.** Localização do Chaco brasileiro dentro do “Gran Chaco” (reproduzido e adaptado de Riveros, 2002).

O Maciço do Urucum - erroneamente assim caracterizado, em razão deste vocábulo não exprimir o verdadeiro significado geomorfológico da região¹ - compreende um relevo residual, originado de restos de uma plataforma muito antiga, cuja litologia data do Pré-Cambriano (4.600 - 550 milhões de anos - Ma; Franco e Pinheiro, 1982). O conjunto de relevo é constituído por blocos de falhas que foram provavelmente reativados no Terciário Superior (23 - 2 Ma) durante o clímax da orogenia andina (Almeida, 1959).

O Maciço do Urucum é composto pelas seguintes morrarias: Urucum (971 m), Santa Cruz (1.065 m; ponto mais alto do MS), São Domingos (800 m), Grande (951 m), Rabichão (700 m) e Tromba dos Macacos (500 m; Franco e Pinheiro, 1982; Neves e Damasceno-Junior, 2011; [Fig. 1 B](#)). Por estarem em meio à planície alagável, as morrarias do Maciço do Urucum e a Morraria do Mutum-Jacadigo estabelecem um abrupto ecótono na região ([Fig. 2 A](#)), o que permite o estabelecimento de diversas fitofisionomias, como Floresta Estacional Semidecidual Aluvial, Floresta Estacional Semidecidual Submontana, Savana Arborizada, Savana Gramíneo-Lenhosa, e Relíquia sobre Bancada Laterítica, além de áreas de transição e capoeiras² (Pott et al., 2000).

Há um grande interesse econômico nas morrarias do Maciço do Urucum e na Morraria do Mutum-Jacadigo devido aos depósitos de ferro e manganês do conteúdo litológico dessas áreas (Anjos e Okida, 2000; [Fig. 2 B](#)). O estado de MS possui a terceira

¹Guerra e Guerra (2008) propõem que o termo deva ficar reservado às grandes massas de rochas eruptivas ou metamórficas, que abrangem áreas relativamente extensas.

²Áreas cuja madeira foi utilizada como lenha para siderurgia na década de 50 e aquelas desmatadas para implantação de pastagens cultivadas e depois abandonadas, estando sob processo de regeneração natural (Pott et al., 2000).

maior reserva de minério de ferro no Brasil, e, apesar da produção atual no estado ser pouco expressiva, a produção brasileira vem crescendo a taxas altas nos últimos anos (somente em um ano - entre 2006 e 2007 - houve um aumento de 11,6%) e já ocupa a posição de líder na produção mundial do minério, superando países com China, Austrália, Índia e Rússia (MME, 2009).

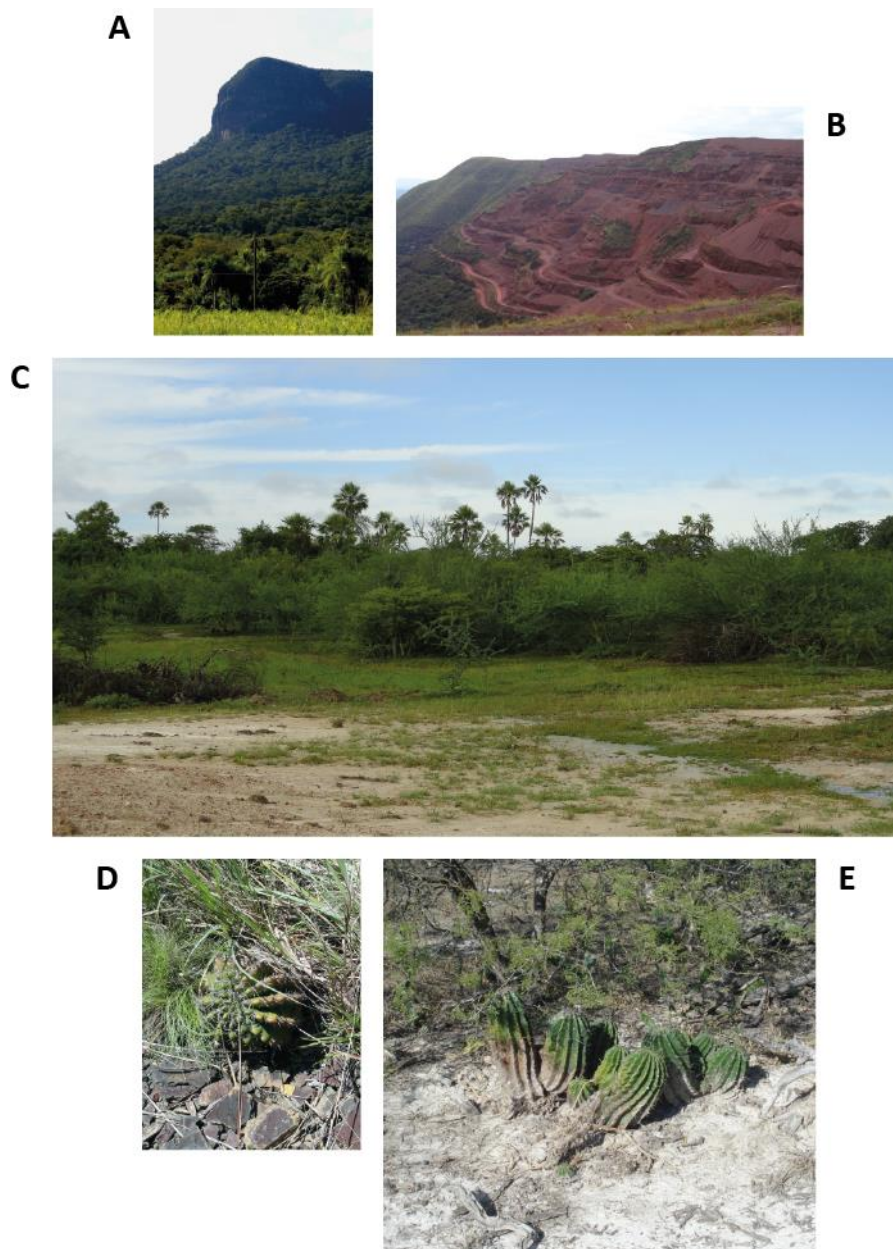


Figura 2. **A.** Vista de morraria do Maciço do Urucum (Foto: Paulo Robson de Souza). **B.** Extração de minério de ferro, no Maciço do Urucum. **C.** Área de Chaco *sensu stricto*, no Pantanal Sul. **D.** Indivíduo de *Echinopsis calochlora*. **E.** Indivíduos de *E. rhodotricha*.

Do ponto de vista conservacionista, estes números são preocupantes, pois, diferentemente do minério de manganês, que é lavrado através de túneis escavados, o minério de ferro é lavrado a céu aberto nas encostas dos morros (Anjos e Okida, 2000), sendo necessária a retirada total da cobertura de vegetação, o que ameaça a biodiversidade local. O Maciço do Urucum é considerado uma das Áreas Prioritárias

para a Conservação da Biodiversidade da Flora do Cerrado e Pantanal devido à convergência de diversos grupos fitogeográficos e a presença de espécies de distribuição restrita (MMA, 1999).

O Pantanal é reconhecido como um local de baixo endemismo. Do ponto de vista geológico, isso pode ser explicado pela sua formação recente. A depressão do Rio Paraguai, que engloba as Planícies e Pantanaís Mato-grossenses, começou a se formar no final do Terciário (23 - 2 Ma), em reflexo à orogenia andina (Franco e Pinheiro, 1982). No início do Pleistoceno, a Depressão do Rio Paraguai já deveria ter seus limites definidos (Franco e Pinheiro, 1982), no entanto, a deposição de sedimentos produzida em ambiente fluvial e/ou fluviolacustre iniciada no Quaternário perdura até hoje (Franco e Pinheiro, 1982). Outra razão para o baixo endemismo, sugerida por Junk et al. (2006), é a instabilidade climática da região em que o Pantanal está situado, uma vez que, durante o Quaternário, as frequentes mudanças climáticas teriam ocasionado períodos intermitentes de alagamento em larga escala e secas severas na região, não havendo tempo para adaptações locais.

No Pantanal, comparativamente à região da planície, os morros rochosos apresentam um maior número de espécies de plantas endêmicas (Pott et al., 2009). Estas áreas xéricas em meio à planície inundável são isoladas entre si e funcionam como ilhas, proporcionando um dos raros centros de endemismos no Pantanal. Pott et al. (2000) listaram duas espécies endêmicas para a região do Maciço do Urucum: *Gomphrena centrota* E. Holzh. (Amaranthaceae), ocorrente em bancadas lateríticas; e *Aspilia grazielae* J. U. Santos (Asteraceae), em campos de Savana Gramíneo-Lenhosa. Tomas et al. (2010) citam *Discocactus ferricola* Buining & Brederoo (Cactaceae) como

endêmico de bancadas lateríticas da região. Em campos sujos, também pode ocorrer *Echinopsis calochlora* K. Schum. (Neves e Damasceno-Junior, 2011), outra espécie de cactácea que também é considerada endêmica (Eggli, 2002) além de ser indicadora de solos com altas concentrações de minério de ferro (Garcia, 2008). *Aspilia grazielae* e *E. calochlora* estão na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (MMA, 2008), enquanto *G. centrota* necessita de estudos adicionais para ser enquadrada com segurança na condição de espécie ameaçada (MMA, 2008).

Chaco Brasileiro

O Chaco é uma ampla província fitogeográfica situada nas planícies do nordeste da Argentina, oeste do Paraguai, sudeste da Bolívia. No Brasil, ocorre apenas em uma área restrita da borda oeste do MS (Prado, 1993; [Fig. 1 A, C](#)). Sua extensão é de aproximadamente 800 mil km², e compreende uma das poucas áreas no mundo onde a transição entre a zona tropical e a zona temperada não ocorre na forma de um deserto, mas sim como florestas semiáridas e bosques (Morello, 1967). O Chaco é plano por toda a sua extensão (Ramella e Spichiger, 1989), e seus solos são derivados da acumulação massiva de “loess”³ fino e sedimentos aluviais durante o Quaternário (Putzer, 1962). Rochas de qualquer tamanho são completamente ausentes, resultando no desenvolvimento de solos compactos com drenagem dificultada (Prado, 1993). Os efeitos de intrusões oceânicas passadas nas planícies Chaco-Pampeanas são claros,

³Sedimento eólico de granulação fina constituído de argila muito quartzosa e rica em calcário (Guerra e Guerra, 2008).

devido à predominância de solos salinos, algumas vezes com horizontes altamente alcalinos (Pennington et al., 2000). O Chaco está sujeito à baixa umidade do solo, geadas no período seco, alagamentos e temperaturas do ar de até 49°C no período úmido (Pennington et al., 2004).

As florestas do Chaco são dominadas por árvores do gênero *Schinopsis* Engl. (Anacardiaceae), junto com *Aspidosperma quebrachoblanco* D.F.K. Schldt. (Apocynaceae), *Tabebuia nodosa* (Griseb.) Griseb. (Bignoniaceae), e várias espécies de *Vachellia Wight & Arn.* (Fabaceae) e *Bulnesia* Gay (Zygophyllaceae). Existe uma camada descontínua de arbustos, consistindo principalmente de espécies espinhentas Mimosoideae e de um estrato geralmente esparsos de Bromeliaceae e Cactaceae, com poucas gramíneas (Pennington et al., 2000; [Fig. 2 C](#)).

Assim como as florestas tropicais sazonalmente secas, a vegetação do Chaco também cresce em áreas de baixa precipitação e alta sazonalidade, e provavelmente ocupa uma área menor atualmente do que nas eras glaciais (Pennington et al., 2004). Whitney et al. (2011), em sua reconstrução paleoclimática dos últimos 45 mil anos do interior da América do Sul, baseada em dados palinológicos, verificaram dois períodos em que o aumento de pólen de táxons característicos de florestas tropicais sazonalmente secas indicam climas mais secos e/ou sazonais: um na segunda fase do último período glacial (19,5 mil anos) e outro no período do Holoceno inicial–médio (10 - 3 mil anos). Possivelmente durante esses períodos a vegetação chaquenha também passou por expansões.

Em um estudo realizado na área de Corumbá a Porto Murtinho (MS), Prado et al. (1992) concluíram que, das áreas descritas como Chaco no Brasil, somente as florestas próximas de Porto Murtinho poderiam ser aceitas como vegetação chaquenha sem ressalvas, uma vez que tanto suas espécies dominantes como as demais são elementos de Chaco *sensu stricto*. Esses autores constataram que os bosques dominados por *Schinopsis brasiliensis* Engl. não contêm nenhum elemento chaquenho, e, assim, somente 10-20% (1-2 mil km²) do que foi inicialmente indicado por Hueck (1955) como intrusão do Chaco no Brasil (aproximadamente 10 mil km²) pode ser considerado de fato como vegetação chaquenha. Apesar de estas formações vegetacionais abrigarem várias espécies de distribuição única no Brasil, não há Unidades de Conservação para a região, e grande parte dessas áreas vem sendo desmatada para o plantio de pastagens (Silva et al., 2008, 2011).

O grupo de estudo

Cactaceae Juss. é uma família composta por plantas suculentas, nativas do Novo Mundo, com exceção de uma espécie – *Rhipsalis baccifera* (J.S.Muell.) Stearn – que ocorre na África tropical, Madagascar, em ilhas do Oceano Pacífico, e no Sri Lanka, e que foi provavelmente dispersa do Novo Mundo para essas outras áreas por pássaros (Anderson, 2001). A distribuição da família vai do Canadá até o extremo sul da América do Sul, e pode ser encontrada em habitats que variam de desertos extremamente secos a exuberantes florestas tropicais (Anderson, 2001). As cactáceas possuem diversas adaptações morfofisiológicas para sobreviver em ambientes secos,

evitando a perda e melhorando a absorção e armazenamento de água, como o desenvolvimento de espinhos, ausência de folhas (com exceção do gênero *Pereskia*), e sistema radicular superficial bastante ramificado (Andrade, 2008).

Suas mais de 1.300 espécies (Hunt e Taylor, 2006) estão subdivididas em quatro subfamílias, que, segundo a classificação mais aceita atualmente (a do consórcio “International Cactaceae Systematics Group”; Anderson, 2001), inclui: Pereskioideae, Maihuenioideae, Opuntioideae e Cactoideae. Cactoideae é a maior em número de espécies e a mais diversificada em termos de formas e hábitos (Nyffeler, 2002; Taylor e Zappi, 2004).

Entre as tribos de Cactoideae, Trichocereae possui importante representatividade em MS (Eggli, 2002). Um dos gêneros de Trichocereae é *Echinopsis* Zucc., o qual é caracterizado por formas de crescimento que podem variar de cactos lenhosos grandes a pequenos e globosos (Anderson, 2001), distribuídos na América do Sul (Eggli, 2002). Recentemente, Schlumpberger e Renner (2012) publicaram uma filogenia molecular deste gênero, onde encontraram polifilia em vários níveis e evolução convergente de características florais ligadas às síndromes de polinização e das formas de crescimento.

No estado de MS, este gênero é representado por *E. calochlora* K. Schum. ([Fig. 2 D](#)), endêmica das morrarias do Maciço do Urucum e Morraria do Mutum-Jacadigo, no município de Corumbá (Eggli, 2002), e por *E. rhodotricha* K. Schum. ([Fig. 2 E](#)), que

ocorre na região sudoeste de MS em remanescentes de Chaco arborizado⁴, no município de Porto Murtinho, estendendo-se pelo Paraguai, Uruguai e Argentina (Eggli, 2002).

Alguns autores reconhecem duas subespécies para *E. calochlora*: *E. calochlora* K. Schum. ssp. *calochlora* e *E. calochlora* K. Schum. ssp. *glaetzleana* P.J. Braun & Esteves. A subespécie *glaetzleana* é descrita para a Serra da Bodoquena, a noroeste da cidade de Bonito (MS; Eggli, 2002) e difere da subespécie-típica por ter cladódios de somente 7,5 cm de diâmetro, de 14 a 16 costelas em vez de 13 e flores menores (Anderson, 2001). *Echinopsis rhodotricha* também é dividida em duas subespécies: *E. rhodotricha* K. Schum. ssp. *rhodotricha* e *E. rhodotricha* K. Schum. ssp. *chacoana* (Schütz) P.J. Braun & Esteves. A subespécie *rhodotricha* tem de oito a 13 costelas, de quatro a sete espinhos radiais e ocorre no Brasil, Paraguai, Uruguai e nordeste da Argentina. Já a subespécie *chacoana* possui de 12 a 18 costelas, sete ou oito espinhos radiais, e ocorre somente na região do Chaco Boreal do Paraguai (Anderson, 2001; Eggli, 2002). A relação filogenética entre essas duas espécies e, mesmo entre *E. rhodotricha* e o restante do gênero *Echinopsis*, é desconhecida, uma vez que esta espécie não foi incluída na filogenia recém-publicada do grupo (Schlumpberger e Renner, 2012).

Echinopsis calochlora ocorre principalmente nos campos acima de 800 m de altitude do Maciço do Urucum e da Morraria do Mutum-Jacadigo (mas pode ser

⁴(Ou “Savana Estépica Arborizada”) Formação composta por árvores e arvoretas espinhentas, esparsas, com folhas miúdas e cobertura contínua de gramíneas, em solo argiloso. A vegetação é de árvores espaçadas com altura entre 4 e 10 metros, muitos arbustos espinhosos, cactos grandes e pequenos, e o chão forrado de samambaia-rediviva (*Selaginella*), que na época seca fica cinzenta e parece morta, mas reverdece com as chuvas (Silva et al., 2011).

encontrada a partir dos 400 m, em alguns locais), e indica a ocorrência de ferro de alta qualidade (Garcia, 2008), o que põe em risco a existência de seu habitat. A mineração deste tipo de substrato é uma crescente ameaça para esta espécie e outra cactácea, *D. ferricola* (ICMBio, 2011). O estudo realizado pela Fundação Biodiversitas, que auxiliou na elaboração da Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (Fundação Biodiversitas, 2005; MMA, 2008), classificou *E. calochlora* como “em perigo”, critérios A3c (de acordo com normas estabelecidas pela IUCN, em 2003). Isso significa que há uma redução no tamanho da população de maior ou igual a 50% projetada ou suspeita para os próximos 10 anos ou três gerações, qualquer que seja o mais longo, baseada em um declínio na área de ocupação, na extensão de ocorrência e/ou na qualidade do habitat. Outra espécie do gênero *Echinopsis*, *Echinopsis eyriesii* (Turpin) Pfeiff. & Otto (= *E. oxygona* (Link) Zucc. ex Pfeiff. & Otto), ocorrente no estado do Rio Grande do Sul, também aparece neste estudo, como “criticamente em perigo”, critério B2ab(v)⁵ (Fundação Biodiversitas, 2005). Cactaceae inclui um grande número de espécies ameaçadas (Hunt, 1992; Anderson et al., 1994), e isto pode ser atribuído ao fato destas plantas serem altamente vulneráveis a alterações ambientais, dadas as suas baixas taxas de crescimento individual e populacional; alta longevidade; e baixas taxas de recrutamento. No Brasil, as principais ameaças às cactáceas são a fragmentação de habitats, perda de qualidade do habitat, a mineração, e o comércio e coleta ilegal (ICMBio, 2011).

⁵ Área de ocupação estimada menor que 10 km², e estimativas que indicam estar severamente fragmentada ou conhecida em uma única localidade; declínio contínuo observado, inferido ou projetado em número de indivíduos maduros.

Tanto *E. calochlora* como *E. rhodotricha* possuem grandes flores laterais, brancas, com antese noturna, de aroma agradável e que duram apenas uma noite (Eggli, 2002). Essas características se encaixam em duas síndromes de polinização: falenofilia/esfingofilia (mariposas/esfingídeos) e cantarofilia (besouros; Faegri e Van der Pijl, 1979). Observações em campo indicam que *E. calochlora* é polinizada por mariposas (D. R. M. Neves, com. pess.), e *E. rhodotricha*, por besouros (C. S. Souza, com. pess.). Para *E. calochlora*, também foi observado que formigas dispersam as sementes (D. R. M. Neves, com. pess.). Mirmecoria (dispersão por formigas) já foi relatada para outras duas espécies de Cactaceae, *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo e *M. paucispinus* Heimen & R.J.Paul (Fonseca et al., 2012). Além disso, foi observada reprodução vegetativa em algumas populações (C. R. Lehn, com. pess.). Nesses indivíduos, pode ocorrer a formação de pequenos brotos, que se destacam da planta-mãe e enraízam em outro local para formar novos indivíduos. Este é a principal forma de reprodução vegetativa em cactos (Anderson, 2001). Em muitas espécies de *Cylindropuntia* (Engelm.) F.M. Knuth, estes pedaços do caule são dispersos através de animais (aderindo-se na pele ou no pêlo; Anderson, 2001). Não há dados sobre os sistemas reprodutivos de *E. calochlora* e *E. rhodotricha*, entretanto, já foi observada auto-incompatibilidade em outras espécies do gênero (*E. chiloensis* (Colla) Friedrich & G.D.Rowley, Ossa e Medel, 2011; *E. terscheckii* (Parm.) Friedrich & G.D.Rowley, Ortega-Baes et al., 2011; *E. schickendantzii* F.A.C.Weber, Alonso-Pedano e Ortega-Baes, 2012).

Cactos são, em geral, espécies de crescimento lento e ciclo de vida longo, e isto está possivelmente associado à limitação da disponibilidade de água com que lidam nos locais onde ocorrem (Godínez-Álvarez et al., 2003). No entanto, é possível verificar variações dentro da família. Em Cactaceae, a longevidade geralmente está associada com a forma de vida (i. e., globoso, expansivo, colunar, cilíndrico, arbustivo e arborescente; Gibson e Nobel, 1986; Anderson, 2001). Rosas-Barrera e Mandujano (2002) afirmam que espécies arborescentes, colunares e arbustivas como *Carnegiea gigantea* (Engelm.) Britton & Rose, *Pereskia* spp. Mill. e *Opuntia rastrera* F.A.C. Weber possuem longos ciclos de vida (que podem durar milhares de anos), plântulas grandes e crescimento rápido. Já espécies globosas como *Ariocarpus scaphirostris* Boed., *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. e *Mammillaria hernandezii* Glass & R.C. Foster possuem ciclos de vida mais curtos, plântulas pequenas e crescimento mais lento. Estima-se que os grandes cactos colunares *Neobuxbaumia acrocephala* (F.A.C. Weber ex K. Schum.) E.Y. Dawson, *N. tetetzo* (F.A.C. Weber ex K. Schum.) Backeb. e *N. mezcalaensis* Bravo do Vale Tehuacán, no México Central, que podem atingir de 10 a 15 m de altura, vivem cerca de 300 anos (Esparza-Olguín et al., 2005). Já o pequeno cacto colunar *Ferocactus wislizeni* (Engelm.) Britton & Rose, comum na região norte do Deserto de Sonora, pode atingir uma longevidade de no máximo 50 anos (Bowers, 2000). Em Cactaceae, mesmo os ciclos de vida mais curtos são longos (cerca de 50 anos), comparando-se ao de espécies arbóreas de outras famílias (Loehle, 1988).

Além da alta longevidade, os representantes de Cactaceae também possuem longos tempos de geração (o tempo da germinação da semente até a produção de frutos/sementes; Smith e Donoghue, 2008). Um tempo de geração de

aproximadamente 20 anos é verdadeiro para muitos cactos (Gorelick, 2009). Baixas taxas de evolução molecular são comuns em espécies que apresentam longos tempos de geração (Smith e Donoghue, 2008).

Consequências genéticas em populações pequenas e isoladas

Populações naturais de espécies raras, em perigo ou ameaçadas de extinção são tipicamente pequenas (Ellstrand, 1992; Gaudeul et al., 2000; Jaramillo et al., 2011). Estas populações são mais propensas à extinção do que populações grandes e estáveis. Espécies que conseguiram sobreviver a reduções no tamanho populacional geralmente pagam um alto preço genético por isso, apresentando altos níveis de endogamia, baixo vigor reprodutivo, diversidade genética reduzida e habilidade de evoluir comprometida (Frankham et al., 2008; Foster et al., 2010; Jacquemyn et al., 2010).

Quando os tamanhos populacionais são reduzidos, a diversidade genética pode ser perdida em consequência da deriva genética (Ellstrand, 1992; Maki, 2001; Frankham et al., 2008). Neste processo, as frequências dos alelos flutuam de uma geração para a outra ao acaso e a perda da diversidade decorre do fato de que, em pequenas populações, alguns alelos, especialmente aqueles raros, podem não ser transmitidos à próxima geração, enquanto outros se fixam na população (Franklin, 1980; Frankham et al., 2008). Essas populações têm menos chances de resistir às pressões seletivas de uma mudança ambiental, e ficam mais vulneráveis à extinção (Franklin, 1980; Lande e Barrowclough, 1987).

A endogamia - o cruzamento entre indivíduos aparentados - é inevitável em populações pequenas e isoladas (Frankham et al., 2008). Suas principais consequências são reduções na heterozigosidade, reduções na reprodução e sobrevivência (perda do vigor reprodutivo), e aumento do risco de extinção (Lambert et al., 2006a, 2006b; Chaves et al., 2010). A perda do vigor reprodutivo como uma consequência da endogamia é conhecida como depressão endogâmica. Neste processo, a endogamia aumenta as chances de expor os alelos deletérios (existentes em todas as populações; cuja expressão geralmente tem herança recessiva) em homozigose. A endogamia não altera diretamente a frequência dos alelos, como a deriva genética. Ela está relacionada com a alteração das frequências genotípicas, pois aumenta a frequência de homozigotos e diminui a de heterozigotos (Frankham et al., 2008).

Populações naturais de espécies raras, em perigo ou ameaçadas de extinção geralmente estão geograficamente isoladas, mas nem sempre estão isoladas reprodutivamente (Ellstrand, 1992). Neste contexto, o fluxo gênico é uma importante força em conservação de plantas e seu potencial papel deve ser considerado em qualquer programa de manejo para conservação de espécies ameaçadas (Ellstrand, 1992). Se, por um lado, a ausência de fluxo gênico em populações pequenas reduz o seu “fitness” reprodutivo através dos baixos tamanhos efetivos populacionais e da depressão endogâmica (especialmente em espécies alógamas; Franklin, 1980; Frankel e Soule, 1981; Beardmore, 1983; Simberloff, 1988), por outro, a presença de fluxo gênico pode quebrar a diferenciação adaptativa local de pequenas populações (Antonovics, 1976; Simberloff, 1988), podendo levar à extinção local de variantes genéticas únicas (Ellstrand, 1992).

Espécies auto-incompatíveis que ocorrem em populações pequenas também podem ter o seu “fitness” reduzido devido a uma disponibilidade limitada de coespecíficos compatíveis (Byers e Meagher, 1992; Glémin et al., 2008). Dois padrões podem ser esperados em populações pequenas de uma espécie auto-incompatível: (1) um número menor de produção de sementes por indivíduo devido a cruzamentos limitados; e (2) um aumento na variação da produção de sementes por indivíduo, devido à variação de coespecíficos disponíveis (Byers e Meagher, 1992). A baixa produção de sementes pode levar a um decréscimo do “fitness” em genótipos particulares e aumentar a possibilidade de extinção local da espécie (Byers e Meagher, 1992).

Características do genoma plastidial e uso de sequências não-codificantes em estudos populacionais de plantas

Embora o genoma plastidial evolua mais lentamente do que o nuclear (as taxas evolutivas são cerca de metade das do DNA nuclear - ncDNA; Wolfe et al., 1987), os polimorfismos neutros de cpDNA possuem um maior poder para detectar diferenciação entre populações que estão divergindo ou divergiram recentemente (em populações onde o fluxo gênico seja limitado, por exemplo), quando comparados aos polimorfismos neutros de ncDNA (Hamilton et al., 2003). Isso pode ser explicado pelo fato de que, pelo genoma plastidial ser haploide, e, na maioria dos casos, uniparentalmente herdado, os tamanhos efetivos populacionais são menores quando comparados aos do genoma nuclear, diploide e herdado biparentalmente (Moore,

1995). Os processos da deriva genética são então mais acelerados neste genoma do que no nuclear, estruturando-o mais rapidamente entre as populações ou linhagens que estão divergindo (Hamilton e Miller, 2002). Além desta vantagem, como a herança do cpDNA em angiospermas é frequentemente materna (procede para Cactaceae; Harris e Ingram, 1991; Ritz et al., 2007; Butterworth e Edwards, 2008), é possível estimar o fluxo gênico mediado via dispersão de sementes independentemente do fluxo gênico mediado via pólen (Hamilton e Miller, 2002).

Sequências não-codificantes de DNA plastidial (cpDNA) podem ser usadas como marcadores genéticos para estudos de avaliação da diversidade genética intraespecífica em plantas (Ding et al., 2012; Fehrmann et al., 2012; Geleta e Bryngelsson, 2012; Liu et al., 2013; Tnah et al., 2013). Segundo Hamilton et al. (2003), regiões desse genoma, especialmente os espaçadores intergênicos, têm apresentado substancial polimorfismo do tipo inserção/deleção (“indels”) dentro e entre populações. Com o intuito de avaliar a utilidade de sequências de cpDNA para estudos de filogeografia de plantas, Byrne e Hankinson (2012) testaram 13 regiões não-codificantes supostamente altamente variáveis em seis espécies de quatro diferentes famílias para as quais a estrutura filogeográfica já havia sido obtida com marcadores RFLP, detectando altos níveis de variabilidade intraespecífica estruturada em duas linhagens. Três espaçadores intergênicos (*trnQ-rps16*, *trnS-trnG* e *psbA-trnH*) foram as regiões que mais variaram entre indivíduos na maioria das espécies, tendo esses mesmos autores encontrado níveis de variabilidade similares aos obtidos utilizando técnicas de RFLP em uma avaliação da estrutura filogeográfica do complexo *Calothamnus quadrifidus* R. Br. ex W.T. Aiton (Myrtaceae; estudo ainda não publicado).

Estes espaçadores são, portanto, fortes candidatos a terem os seus níveis de variabilidade testados em famílias onde não é possível identificar quais são as regiões mais variáveis e adequadas para avaliar a diversidade genética intraespecífica. Este é o caso de Cactaceae, onde, até o momento, estudos filogeográficos com marcadores de cpDNA ainda são extremamente raros. Somente Paterson et al. (2009) utilizaram estes marcadores para este fim, tendo encontrado baixa variabilidade no íntron do *trnL* em populações introduzidas de *Pereskia aculeata* Mill., na África do Sul.

Estudos genéticos populacionais em Cactaceae

Apesar de o terceiro maior centro de diversidade de Cactaceae estar situado no Brasil (representando 130 espécies, a maioria das quais são endêmicas; ICMBio, 2011), poucas cactáceas brasileiras tiveram os seus níveis de diversidade genética e estruturação populacional investigados (cerca de sete espécies; ICMBio, 2011). Lambert et al. (2006b) encontraram baixa variabilidade genética e altos valores de estruturação genética e endogamia nas populações de *Melocactus paucispinus* Heimen & R.J.Paul, espécie endêmica da Cadeia do Espinhaço no estado da Bahia (BA) e ameaçada de extinção. Em outro estudo, Lambert et al. (2006a) encontraram baixa variabilidade genética e altos níveis de endogamia também para *M. glaucescens* Buining & Brederoo, espécie endêmica do município de Morro do Chapéu-BA, e criticamente ameaçada de extinção. Moraes et al. (2005), no entanto, verificaram alta variabilidade genética apesar dos baixos tamanhos populacionais em *Praecereus euchlorus* (Weber) Taylor e *Pilosocereus machrisii* Dawson, dois cactos colunares com

distribuição geográfica marcadamente disjunta nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás, que ocorrem na forma de populações pequenas e isoladas em áreas de ambientes xéricos. Esses autores também encontraram alta diferenciação genética entre as populações amostradas, de acordo com a sua distribuição insular. Machado (2004) também encontrou este padrão em *Discocactus zehntneri* Britton & Rose, espécie endêmica do norte da BA e que se subdivide em duas subespécies: *D. zehntneri* ssp. *zehntneri*, que cresce como rupícola em afloramentos rochosos em meio à caatinga, e *D. zehntneri* ssp. *boomianus* (Buining & Brederoo) N.P.Taylor & Zappi, que cresce em solos arenosos ou cascalhentos em áreas montanhosas do norte da Chapada Diamantina. Todos estes estudos utilizaram aloenzimas como marcador (ICMBio, 2011). Estes marcadores moleculares também foram amplamente utilizados em estudos envolvendo a família realizados na Venezuela (Nassar et al., 2001, 2002, 2003) e no México (Nason et al., 2002; Clark-Tapia e Molina-Freaner, 2003; Parra et al., 2008).

Outros marcadores também já foram utilizados para realizar análises genéticas populacionais em Cactaceae. Otero-Arnaiz et al. (2005) realizaram um estudo populacional refinado sobre *Polaskia chichipe* (Gosselin) Backeb., uma espécie de cactácea que está passando por seleção artificial devido aos seus frutos comestíveis no Vale Tehuacán, México central. Através das análises de cinco *loci* de microssatélites, esses autores não encontraram diferenças nos níveis e distribuição da variabilidade genética entre as populações selvagens e manipuladas. Já Paterson et al. (2009) utilizaram sequenciamento de DNA (nuclear e plastidial) e microssatélites para determinar a origem de populações invasoras da cactácea *Pereskia aculeata* Mill. na

África do Sul. Esses autores puderam inferir, através das dos baixos níveis de variabilidade genética encontrados nas populações introduzidas, que estas plantas são a progênie de uma única ou várias introduções de uma mesma fonte, possivelmente provenientes de locais ao norte do estado do Rio de Janeiro, no Brasil.

Modelagem de distribuição potencial

Quando o conjunto de dados de presença disponíveis de uma espécie não cobre toda a extensão de sua distribuição natural, programas de modelagem de distribuição de espécies podem calcular uma aproximação da extensão completa da sua distribuição (Scheldeman e van Zonneveld, 2010). Estes programas identificam locais com ambientes similares àqueles onde a espécie já foi observada (nicho realizado) - e, portanto, locais onde a espécie potencialmente ocorra (nicho fundamental; Hutchinson, 1957) – através de pontos de presença da espécie e “rasters” de variáveis ambientais cobrindo a área de estudo (Scheldeman e van Zonneveld, 2010). Os resultados da análise de modelagem de distribuição potencial podem ser usados para avaliar o impacto das mudanças climáticas na distribuição de espécies, identificar “gaps” em coleções de espécies de plantas selvagens, identificar zonas adequadas para a produção de colheitas e árvores, priorização de áreas para conservação, entre outros (Scheldeman e van Zonneveld, 2010).

Análises de modelagem de distribuição de espécies têm sido aplicadas em cactáceas, para examinar os efeitos possíveis futuras mudanças climáticas nos padrões de distribuição de espécies e para identificar áreas prioritárias à conservação e uso

sustentável. Téllez-Valdés e Dávila-Aranda (2003) examinaram os efeitos da mudança climática nos futuros padrões de distribuição de 20 espécies de cactos do Vale Tehuacán-Cuicatlán, no México, e os seus resultados destacaram a importância de levar em consideração os efeitos das possíveis futuras mudanças climáticas na escolha de áreas para conservação. Já Dávila et al. (2012), diferenciaram populações do cacto colunar endêmico desse mesmo vale *Neobuxbaumia tetetzo* em uma aproximação bioclimática e avaliaram os efeitos da mudança climática na distribuição da espécie nesta área. Por último, Iloldi-Rangel et al. (2012) identificaram uma rede de áreas prioritárias espacialmente coerentes para a conservação do gênero *Opuntia* no México permitindo o uso humano sustentável, através da análise de modelos de distribuição de 60 espécies e outros critérios.

Outros estudos, como os de Alba-Sánchez et al. (2010) e Quiroga et al. (2012), que comparam as distribuições potenciais do passado com as do presente a fim de compreender a história biogeográfica, ainda não foram realizados com espécies de Cactaceae.

OBJETIVO GERAL

Este estudo pretende contribuir para o estabelecimento de políticas de conservação de *E. calochlora* e *E. rhodotricha*, através de análises da distribuição da variabilidade genética e da história evolutiva de suas populações.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

1. Georreferenciar as populações de *E. calochlora* na borda oeste do Pantanal, e de *E. rhodotricha* no Chaco brasileiro;
2. Descrever a distribuição da variabilidade genética populacional das espécies com marcadores de cpDNA;
3. Correlacionar os dados genéticos populacionais com as características do habitat das espécies;
4. Entender a história evolutiva de *E. calochlora* e *E. rhodotricha* através de suas relações filogenéticas e da modelagem das suas distribuições potenciais no presente e passado;
5. Subsidiar a escolha de indivíduos de *E. calochlora* para transplantação na restauração de áreas lavradas por minério do Maciço do Urucum, e as ações do Plano de Ação Nacional para Conservação das Cactáceas (ICMBio, 2011).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBA-SÁNCHEZ, F., J.A. LÓPEZ-SÁEZ, B.B. PANDO, J.C. LINARES, D. NIETO-LUGILDE, E L. LÓPEZ-MERINO. 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.
- ALMEIDA, F.F.M. 1959. Traços gerais da geomorfologia do Centro Oeste brasileiro. In F. M. Almeida, e M. A. Lima [eds.], Planalto Centro-Occidental e Pantanal Matogrossense: Guia da Excursão nº 1, realizada por ocasião do 18º Congresso Internacional de Geografia, 7–65. Conselho Nacional de Geografia, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- ALONSO-PEDANO, M., E P. ORTEGA-BAES. 2012. Generalized and complementary pollination system in the Andean cactus *Echinopsis schickendantzii*. *Plant Systematics and Evolution* 298: 1671–1677.
- ANDERSON, E.F., S. ARIAS-MONTES, N.P. TAYLOR, E A. CATTABRIGA. 1994. Threatened Cacti of Mexico. 135 p. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Greater London, Reino Unido.
- ANDERSON, E.F. 2001. The cactus family. 777 p. Timber Press, Portland, Oregon, EUA.
- ANDRADE, C.T.S. 2008. Cactos úteis na Bahia: ênfase no semi-árido. 128 p. Ed. USEB, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.
- ANJOS, C.E., E R. OKIDA. 2000. Geologia. In J. S. V. S. Silva [ed.], Zoneamento Ambiental da Borda Oeste do Pantanal: Maciço do Urucum e Adjacências. 211 p. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- ANTONOVICS, J. 1976. The nature of limits to natural selection. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 63: 224–247.
- BEARDMORE, J.A. 1983. Extinction, survival, and genetic variation. In C. M. Schonewald-Cox, S. M. Chambers, B. Mac-Bryde, e W. L. Thomas [eds.], Genetics and Conservation: A Reference for Managing Wild Animals and Plant Populations, 125–151. Benjamin/Cummings, Menlo Park, Califórnia, EUA.
- BOWERS, J.E. 2000. Does *Ferocactus wislizeni* (Cactaceae) have a between-year seed bank? *Journal of Arid Environments* 45: 197–205.
- BUTTERWORTH, C., E E.J. EDWARDS. 2008. Investigating *Pereskia* and the earliest divergences in Cactaceae. *Haseltonia* 14: 46–53.
- BYERS, D.L., E T.R. MEAGHER. 1992. Mate availability in small populations of plant species with homomorphic sporophytic self-incompatibility. *Heredity* 68: 353–359.

- BYRNE, M., E M. HANKINSON. 2012. Testing the variability of chloroplast sequences for plant phylogeography. *Australian Journal of Botany* 60: 569–574.
- CHAVES, L.J., R. VENCovsky, R.S.M. SILVA, M.P. CAMPOS TELLES, M.I. ZUCCHI, E A.S.G. COELHO. 2010. Estimating inbreeding depression in natural plant populations using quantitative and molecular data. *Conservation Genetics* 12: 569–576.
- CLARK-TAPIA, R., E F. MOLINA-FREANER. 2003. The genetic structure of a columnar cactus with a disjunct distribution: *Stenocereus gummosus* in the Sonoran desert. *Heredity* 90: 443–450.
- DÁVILA, P., O. TÉLLEZ, E R. LIRA. 2012. Impact of climate change on the distribution of populations of an endemic Mexican columnar cactus in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Plant Biosystems*: 1–11.
- DING, G., D. ZHANG, Y. YU, L. ZHAO, E B. ZHANG. 2012. Phylogenetic relationship among related genera of Plumbaginaceae and preliminary genetic diversity of *Limonium sinense* in China. *Gene* 506: 400–403.
- EGGLI, U. 2002. Synopsis of the Cactaceae of Mato Grosso, Brazil. *Haseltonia* 9: 146–166.
- ELLSTRAND, N.C. 1992. Gene flow by pollen: implications for Plant Conservation Genetics. *Oikos* 63: 77–86.
- ESPARZA-OLGUÍN, L., T. VALVERDE, E M.C. MANDUJANO. 2005. Comparative demographic analysis of three *Neobuxbaumia* species (Cactaceae) with differing degree of rarity. *Population Ecology* 47: 229–245.
- FAEGRI, K., E L. VAN DER PIJL. 1979. The principles of Pollination Ecology. 3^a ed., 244 p. Pergamon Press, Oxford, Oxfordshire, Reino Unido.
- FEHRMANN, S., C.T. PHILBRICK, E R. HALLIBURTON. 2012. Intraspecific variation in *Podostemum ceratophyllum* (Podostemaceae): evidence of refugia and colonization since the last glacial maximum. *American Journal of Botany* 99: 145–151.
- FONSECA, R.B.S., L.S. FUNCH, E E.L. BORBA. 2012. Dispersão de sementes de *Melocactus glaucescens* e *M. paucispinus* (Cactaceae), no Município de Morro do Chapéu, Chapada Diamantina - BA. *Acta Botanica Brasilica* 26: 481–492.
- FOSTER, J.T. G.J ALLAN, A.P. CHAN, P.D. RABINOWICZ, J. RAVEL, P.J. JACKSON E P. KEIM. 2010. Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (*Ricinus communis*). *BMC Plant Biology* 10: 1–11.
- FRANCO, M.S.M., E R. PINHEIRO. 1982. Geomorfologia. In Projeto RADAMBRASIL. Folha SE.21 Corumbá, 161–224. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

- FRANKEL, O.H., E M.E. SOULE. 1981. Conservation and evolution. 327 p. Cambridge University Press, Cambridge, Cambridgeshire, Reino Unido.
- FRANKHAM, R., J.D. BALLOU, E D.A. BRISCOE. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação. 280 p. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
- FRANKLIN, I.R. 1980. Evolutionary change in small populations. In M. E. Soulé, e B. A. Wilcox [eds.], Conservation biology: an evolutionary, ecological perspective, 135–150. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, EUA.
- FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS. 2005. Lista da flora brasileira ameaçada de extinção segundo avaliação no workshop da Fundação Biodiversitas em 2005. Website: http://www.biodiversitas.org.br/florabr/lista_florabr.pdf [Acessado em 25 de janeiro de 2012]
- GARCIA, J.S. 2008. Anatomia do caule e raiz, e estrutura do xilema secundário de duas espécies de *Discocactus* Pfeiff. e duas de *Echinopsis* Zucc. (Trichocereae, Cactaceae) ocorrentes em Mato Grosso do Sul. Dissertação de mestrado, UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.
- GAUDEUL, M., P. TABERLET, E I. TILL-BOTTRAUD. 2000. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology* 9: 1625–1637.
- GELETA, M., E T. BRYNGELSSON. 2012. Population genetic analysis of *Lobelia rhynchopetalum* Hemsl. (Campanulaceae) using DNA sequences from ITS and eight chloroplast DNA regions. *Scientific World Journal* 2012: 1–10.
- GIBSON, A.C., E P.S. NOBEL. 1986. The cactus primer. 286 p. Harvard University Press, Boston, Massachusetts, EUA.
- GLÉMIN, S., C. PETIT, S. MAURICE, E A. MIGNOT. 2008. Consequences of low mate availability in the rare self-incompatible species *Brassica insularis*. *Conservation Biology* 22: 216–221.
- GODÍNEZ-ÁLVAREZ, H., T. VALVERDE, E P. ORTEGA-BAES. 2003. Demographic trends in the Cactaceae. *The Botanical Review* 69: 173–203.
- GORELICK, R. 2009. Evolution of cacti is largely driven by genetic drift, not selection. *Bradleya* 27: 37–48.
- GUERRA, A.T., E A.J.T. GUERRA. 2008. Novo Dicionário Geológico-Geomorfológico. 6ª ed., 652 p. Bertrand Brasil, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- HAMILTON, M.B., E J.R. MILLER. 2002. Comparing relative rates of pollen and seed gene flow in the island model using nuclear and organelle measures of population structure. *Genetics* 162: 1897–1909.

- HAMILTON, M.B., J.M. BRAVERMAN, E D.F. SORIA-HERNANZ. 2003. Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in new world species of the Lecythidaceae. *Molecular Biology and Evolution* 20: 1710–1721.
- HARRIS, S.A., E R. INGRAM. 1991. Chloroplast DNA and biosystematics: the effects of intraspecific diversity and plastid transmission. *Taxon* 40: 393–412.
- HUECK, K. 1955. Bosques chaquenhos e extração de tanino no Brasil. *Revista Brasileira de Geografia* 17: 343–346.
- HUNT, D. 1992. CITES Cactaceae checklist. 190 p. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Greater London, Reino Unido.
- HUNT, D., E N. TAYLOR. 2006. The New Cactus Lexicon. 1000 p. DH Books, Milborne Port, Somerset, Reino Unido.
- HUTCHINSON, G.E. 1957. Concluding Remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 22: 415–427.
- ICMBio. 2011. Plano de ação nacional para a conservação das Cactáceas (Série Espécies Ameaçadas, 24). 112 p. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- ILLOLDI-RANGEL, P., M. CIARLEGLIO, L. SHEINVAR, M. LINAJE, V. SÁNCHEZ-CORDERO, E S. SARKAR. 2012. *Opuntia* in México: identifying priority areas for conserving biodiversity in a multi-use landscape. *PLoS ONE* 7: 1–16.
- JACQUEMYN, H., I. ROLDÁN-RUIZ, E O. HONNAY. 2010. Evidence for demographic bottlenecks and limited gene flow leading to low genetic diversity in a rare thistle. *Conservation Genetics* 11: 1979–1987.
- JARAMILLO, P., R. ATKINSON, E G. GENTILE. 2011. Evaluating Genetic Diversity for the Conservation of the Threatened Galapagos Endemic *Calandrinia galapagosa* (Portulacaceae). *Biotropica* 43: 386–392.
- JUNK, W.J., C.N. CUNHA, K.M. WANTZEN, P. PETERMANN, C. STRÜSSMANN, M.I. MARQUES E J. ADIS. 2006. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Aquatic Sciences* 68: 278–309.
- LAMBERT, S.M., E.L. BORBA, E M.C. MACHADO. 2006a. Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus* x *albicephalus* (*Melocactus ernestii* x *M. glaucescens*) in north-eastern Brazil. *Plant Species Biology* 21: 93–108.
- LAMBERT, S.M., E.L. BORBA, M.C. MACHADO, E S.C.S. ANDRADE. 2006b. Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for

- hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-eastern Brazil. *Annals of Botany* 97: 389–403.
- LANDE, R., E G.F. BARROWCLOUGH. 1987. Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In M. E. Soulé [ed.], *Viable populations for conservation*, 87–123. Cambridge University Press, Cambridge, Cambridgeshire, Reino Unido.
- LIU, J., P. SUN, X. ZHENG, D. POTTER, K. LI, C. HU E Y. TENG. 2013. Genetic structure and phylogeography of *Pyrus pashia* L. (Rosaceae) in Yunnan Province, China, revealed by chloroplast DNA analyses. *Tree Genetics & Genomes* 9: 433–441.
- LOEHLE, C. 1988. Tree life history strategies: the role of defenses. *Canadian Journal of Forest Research* 19: 209–222.
- MACHADO, M.C. 2004. O gênero *Discocactus* Pfeiff. (Cactaceae) no estado da Bahia, Brasil: variabilidade morfológica, variabilidade genética, taxonomia e conservação. Dissertação de Mestrado, UEFS, Feira de Santana, Bahia, Brasil.
- MAKI, M. 2001. Genetic differentiation within and among island populations of the endangered plant *Aster miyagii* (Asteraceae), an endemic to the Ryukyu Islands. *American Journal of Botany* 88: 2189–2194.
- MMA. 1999. Ações Prioritárias para Conservação da Biodiversidade do Cerrado e do Pantanal. Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- MMA. 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção - Instrução Normativa N° 06, de 23 de setembro de 2008. Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- MME. 2009. Desenvolvimento de estudos para elaboração do Plano Duodecenal (2010-2030) de Geologia, Mineração e Transformação Mineral. Produto 09 - Minério de Ferro. Relatório Técnico 18 - Perfil da Mineração de Ferro. Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- MOORE, W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49: 718–726.
- MORAES, E.M., A.G. ABREU, S.C.S. ANDRADE, F.M. SENE, E V.N. SOLFERINI. 2005. Population genetic structure of two columnar cacti with a patchy distribution in eastern Brazil. *Genetica* 125: 311–323.
- MORELLO, J. 1967. Bases para el estudio fitoecológico de los grandes espacios (el Chaco argentino). *Ciencia e Investigacion* 23: 252–267.
- NASON, J.D., J.L. HAMRICK, E T.H. FLEMING. 2002. Historical vicariance and postglacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran Desert columnar cactus. *Evolution* 56: 2214–2226.

- NEVES, D., E G. DAMASCENO-JUNIOR. 2011. Post-fire phenology in a campo sujo vegetation in the Urucum plateau, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 71: 881–888.
- NYFFELER, R. 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from *trnK/matK* and *trnL-trnF* sequences. *American Journal of Botany* 89: 312–326.
- ORTEGA-BAES, P., M. SARAVIA, S. SÜHRING, H. GODÍNEZ-ÁLVAREZ, E M. ZAMAR. 2011. Reproductive biology of *Echinopsis terscheckii* (Cactaceae): the role of nocturnal and diurnal pollinators. *Plant Biology* 13: 33–40.
- OSSA, C.G., E R. MEDEL. 2011. Notes on the floral biology and pollination syndrome of *Echinopsis chiloensis* (Colla) Friedrich & GD Rowley (Cactaceae) in a population of semiarid Chile. *Gayana Botánica* 68: 213–219.
- OTERO-ARNAIZ, A., A. CASAS, J.L. HAMRICK, E J. CRUSE-SANDERS. 2005. Genetic variation and evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacán Valley, central Mexico. *Molecular Ecology* 14: 1603–1611.
- PARRA, F., N. PÉREZ-NASSER, R. LIRA, D. PÉREZ-SALICRUP, E A. CASAS. 2008. Population genetics and process of domestication of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Arid Environments* 72: 1997–2010.
- PATERSON, I.D., D.A. DOWNIE, E M.P. HILL. 2009. Using molecular methods to determine the origin of weed populations of *Pereskia aculeata* in South Africa and its relevance to biological control. *Biological Control* 48: 84–91.
- PENNINGTON, R.T., D.E. PRADO, E C.A. PENDRY. 2000. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography* 27: 261–273.
- PENNINGTON, R.T., M. LAVIN, D.E. PRADO, C.A. PENDRY, S.K. PELL, E C.A. BUTTERWORTH. 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, Biological Sciences* 359: 515–537.
- POTT, A., J.S.V.S. SILVA, S.S. SALIS, V.J. POTT, E M.P. SILVA. 2000. Vegetação e Uso da Terra. In J. S. V. S. Silva [ed.], Zoneamento Ambiental da Borda Oeste do Pantanal: Maciço do Urucum e Adjacências. 211 p. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- POTT, A., V.J. POTT, E G.A. DAMASCENO-JUNIOR. 2009. Fitogeografia do Pantanal. In III CLAE e IX CEB, 1–4. São Lourenço, Minas Gerais, Brasil.
- PRADO, D.E., P.E. GIBBS, A. POTT, E V.J. POTT. 1992. The Chaco-Pantanal transition in southern Mato Grosso, Brazil. In P. A. Furley, J. Proctor, e J. A. Ratter [eds.], Nature and Dynamics of Forest-Savanna Boundaries, 451–470. Chapman & Hall, Londres, Greater London, Reino Unido.

- PRADO, D.E. 1993. What is the Gran Chaco vegetation in South America? 1. A review. Contribution to the study of flora and vegetation of the Chaco. V. *Candollea* 48: 145–172.
- PUTZER, H. 1962. Geologie von Paraguay. 182 p. Gebruder Borntraeger, Berlim, Alemanha.
- QUIROGA, M.P., S. PACHECO, L.R. MALIZIA, E A.C. PREMOLI. 2012. Shrinking forests under warming: evidence of *Podocarpus parlatorei* (pino del cerro) from the subtropical Andes. *Journal of Heredity* 103: 682–691.
- RAMELLA, L., E R. SPICHIGER. 1989. Interpretación preliminar del medio físico y de la vegetación del Chaco Boreal. Contribución al estudio de la flora y de la vegetación del Chaco. I. *Candollea* 44: 639–680.
- RITZ, C.M., L. MARTINS, R. MECKLENBURG, V. GOREMYKIN, E F. HELLWIG. 2007. The molecular phylogeny of *Rebutia* (Cactaceae) and its allies demonstrates the influence of paleogeography on the evolution of South American mountain cacti. *American Journal of Botany* 94: 1321–1332.
- RIVEROS, F. 2002. The Gran Chaco. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Website: <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Bulletin/Granchaco.htm> [Acessado em 13 de setembro de 2012].
- ROSAS-BARRERA, M.D., E M.C. MANDUJANO. 2002. La diversidad de historias de vida de cactáceas, aproximación por el triángulo demográfico. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 47: 33–34.
- SCHELDEMAN, X., E M. VAN ZONNEVELD. 2010. Training Manual on Spatial Analysis of Plant Diversity and Distribution. 179 p. Bioversity International, Roma, Roma, Itália.
- SCHLUMBERGER, B.O., E S.S. RENNER. 2012. Molecular phylogenetics of *Echinopsis* (Cactaceae): Polyphyly at all levels and convergent evolution of pollination modes and growth forms. *American Journal of Botany* 99: 1335–1349.
- SILVA, M.P., R.A. MAURO, M. ABDON, E J.S. V SILVA. 2008. Estado de conservação do Chaco (Savana Estépica) brasileiro. In IX Simpósio Nacional Cerrado e II Simpósio Internacional Savanas Tropicais, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- SILVA, J.S. V, A. POTT, M.M. ABDON, V.J. POTT, E K.R. SANTOS. 2011. Projeto GeoMS: cobertura vegetal e uso da terra do Estado de Mato Grosso do Sul. 1ª ed., 64 p. Embrapa Informação Agropecuária, Campinas, São Paulo, Brasil.
- SIMBERLOFF, D. 1988. The contribution of population and community biology to conservation science. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19: 473–511.

- SMITH, S.A., E M.J. DONOGHUE. 2008. Rates of molecular evolution are linked to life history in flowering plants. *Science* 322: 86–89.
- TAYLOR, N., E D. ZAPPI. 2004. Cacti of Eastern Brazil. 512 p. The Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Greater London, Reino Unido.
- TÉLLEZ-VALDÉS, O., E P. DÁVILA-ARANDA. 2003. Protected Areas and Climate Change: a Case Study of the Cacti in the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve, México. *Conservation Biology* 17: 846–853.
- TNAH, L.H., S.L. LEE, K.K.S. NG, C.T. LEE, S. BHASSU, E R.Y. OTHMAN. 2013. Phylogeographical pattern and evolutionary history of an important Peninsular Malaysian timber species, *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae). *Journal of Heredity* 104: 115–126.
- TOMAS, W.M., I.H. ISHII, C. STRUSSMANN, A.P. NUNES, S.M. SALIS, Z. CAMPOS, V.L. FERREIRA ET AL. 2010. Borda oeste do Pantanal e Maciço do Urucum em Corumbá, MS: área prioritária para conservação da biodiversidade. In 5º Simpósio sobre Recursos Naturais e Socioeconômicos do Pantanal. Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil.
- WHITNEY, B.S., F.E. MAYLE, S.W. PUNYASENA, K.A. FITZPATRICK, M.J. BURN, R. GUILLEN, E. CHAVEZ ET AL. 2011. A 45kyr palaeoclimate record from the lowland interior of tropical South America. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 307: 177–192.
- WOLFE, K., W.H. LI, E P.M. SHARP. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 84: 9054–9058.

Artigo a ser submetido à *American Journal of Botany*

American Journal of Botany

Instructions for Authors

Scope and Aims of the Journal

Review Procedure and Policy || Data Origin || Data Access || Nomenclature || Vouchers || General Instructions and Requirements || Open Access Policy || Article Types||

Manuscript Preparation|| Cover/Response Letter||Author Agreement Form||

Manuscript Content||Title Page||Footnote Page||Abstract Page||Text||Literature Cited||
||Tables||Appendices||Figure Legends||Figures/illustrations||
||Online Supplemental Materials||Abbreviations, Units, and Symbols||

Copyright and Color Agreement||Contact the Editorial Office||

For *Applications in the Plant Sciences* Instructions for Authors,
see http://www.botany.org/apps/APPS_Author_Instructions.html.

SCOPE AND AIMS OF THE JOURNAL

The *American Journal of Botany* (*AJB*) publishes peer-reviewed, innovative, significant research of interest to a wide audience of plant scientists in all areas of plant biology, all levels of organization, and all plant groups and allied organisms. *AJB* requires authors to frame their research questions and discuss their results in terms of major questions of plant biology. In general, papers that are too narrowly focused, purely descriptive, natural history, broad surveys, or that contain only preliminary data will not be considered.

Review Procedure and Policy

Manuscripts are reviewed by scholars with expertise in the research area. Reviewers, Associate Editors, and the Editor-in-Chief evaluate manuscripts for innovations in, significant contributions to, and noteworthy advances in the theoretical or conceptual bases of the subdisciplines of plant biology, and/or novel insights of general relevance to fundamental questions of biology (see http://www.botany.org/ajb/AJB_Reviewer_Instructions.pdf for review criteria).

Manuscripts may be returned without review if the English needs significant improvement. Typically, authors have two opportunities to produce an acceptable manuscript: the original submission and one revision in which to address the criticisms and concerns of the reviewers and editors.

Correspondence and notifications regarding manuscripts will be through e-mail, directed through the editorial office (ajb@botany.org). All reviewer comments and author revisions are handled electronically using Editorial Manager (<http://ajb.edmgr.com>). Copyediting queries and page proofs (e-galleys) are also provided electronically.

Final acceptance of a manuscript is contingent upon compliance with Journal requirements. Manuscripts other than Special Invited Papers are generally published in the order of receipt, within subject areas, of the final, accepted version or of the corrected proof. With the Journal's online *AJB* Advance Access feature, articles that have undergone complete peer review and copyediting, as well as full review by the authors, will be posted as soon as possible.

The Journal editors expect authors to follow the ethics guidelines of the Botanical Society of America (BSA) (www.botany.org/governance/ethics.php).

- **Copyrighted Material and Plagiarism**—If copyrighted material is reproduced in the manuscript, full attribution must be provided in the text; proof of permission must be sent to the Editorial Office. It is the responsibility of the authors, not the BSA or the editors or reviewers, to ensure that proper attribution is given to data and/or text previously published elsewhere. If suspicion is raised about the originality of the material (unattributed to source), the Editorial Office may check the manuscript for plagiarism. In cases where plagiarism is verified, the manuscript will be returned without further review without the possibility of re-submission. Self-plagiarism (i.e., the use of identical sentences from previously published papers by the same author) is also not acceptable.
- **Conflict of Interest**—Authors are responsible for recognizing and disclosing any duality of interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other personal connections. All funding sources, including the research funder and grant number, must be given in the acknowledgements section.

Data Origin—When using unpublished data owned or created by a researcher who is not the author or a co-author, a formal statement from the owner of the data must be sent to the Editorial Office acknowledging the use of the data and granting formal permission.

Data Access—*AJB* requires that supporting data be deposited in an appropriate repository to facilitate reader access prior to submission of the manuscript. Genetic information, such as DNA, RNA, or protein sequences, should be submitted to an appropriate data bank, such as GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) or EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>). Alignments used to produce phylogenies must be submitted to TreeBase (<http://www.treebase.org>), Dryad (<http://datadryad.org>), or to *AJB* to be published with the paper as supplementary material. The data matrices must be in an editable format (i.e., text files) for reanalysis by any interested readers following publication. Authors are encouraged to archive all sequences generated from next-generation sequencing techniques in a suitable public repository, such as the Sequence Read Archive of NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), the Sequence Read Archive of ENA (http://www.ebi.ac.uk/ena/about/sra_submissions), or Dryad. Ecological data or software information may also be deposited into Dryad or a similar publicly available site. Media files may also be housed on Figshare (<http://figshare.com>). If necessary,

raw data files (e.g., DNA sequences, gel images, chromatograms, data matrices), and/or electropherograms may be requested by the editors during the review process.

Nomenclature—*AJB* requires that nomenclature for all extant and extinct species conform to the current International Code of Nomenclature of Algae, Fungi and Plants. Taxonomic authorities are given at first mention in the text (not in the manuscript title). Authors should refer to the International Plant Names Index (<http://www.ipni.org/index.html>) or Tropicos (<http://www.tropicos.org/>) for accepted authority names. Conventions adopted by the scientific community must be used for genetic symbols and nomenclature.

Use conventions adopted by the scientific community for genetic symbols and nomenclature.

Vouchers—At the time of submission, supporting genetic and voucher specimen information must be provided, preferably for each population sampled, as appropriate (see Appendices below). Plant vouchers are defined here as mounted herbarium specimens that are permanently housed in an accessible herbarium or museum and that are identified by unique accession numbers; vouchers may be requested for review by future investigators to verify the identity of the material used in the study (especially if taxonomic rearrangements occur in the future). In discussions of morphological character states, access to the data must be provided.

Manuscripts that report data from individual populations must include the GPS coordinates for each of the populations sampled. A waiver of this requirement may be granted for rare, threatened, or endangered species, as explained in the cover letter. Accuracy must be provided to the nearest second, or the fifth decimal place if using decimal degrees. If vouchers or GPS coordinates are unavailable, an explanation must be provided in the cover letter, as well as within the article itself. Exceptions to the voucher requirement will be assessed by the editors.

General Instructions and Requirements

Before submitting manuscripts, please review all instructions and refer to recent issues of *AJB*.

To take advantage of the free-page-charge policy, at least one author must be a member of the BSA when the manuscript is submitted for review as well as during the year of publication (except for Special Invited Papers). Authors who are not members of the BSA may also submit manuscripts for consideration: a mandatory page charge of \$150 per printed (or equivalent PDF) page is assessed. Page charges must be paid prior to a manuscript going into production, based on the estimated number of printed (or PDF) pages.

AJB requires that at least one colleague whose first language is English critically read and edit the manuscript before submission. Manuscripts may be returned without review if the English needs significant improvement.

Open Access Policy

AJB authors have the option to make their accepted paper freely available online immediately upon publication. The fee for Open Access is \$1500 (discounted to \$500 if the author's institution subscribes to the Journal). Contact the Editorial Office at ajb@botany.org for more information.

Submission process

Submit your manuscript via the online submission and review system, Editorial Manager, at <http://ajb.edmgr.com>. First-time users need to register for an account at this URL using their active e-mail addresses. The same Username and Password created on Editorial Manager are used to log in as an author or as a reviewer. [If there are any difficulties in the login or submission process, contact the Editorial Office at ajb@botany.org for assistance.]

There is a mandatory charge for more than five changes made on proofs resulting from mistakes made by the author(s). Author(s) who require a figure replacement in the e-galleys stage, unless the error was caused by the *AJB* editorial staff or the compositor, will be charged \$25 for each figure replacement or correction.

Authors are encouraged to submit figures in color when doing so enhances the presentation of the scientific information. Due to the cost of printing color, however, the editor may recommend using black and white if the information is just as clear when presented this way..

Article Types

In addition to Research Papers, *AJB* publishes the following:

Special Invited Papers—These are mostly reviews of limited scope on timely subjects written for a general, albeit well-informed, audience. Special Invited Papers are typically solicited by the Editor-in-Chief, the Special Papers Editor, or an Associate Editor. Discuss ideas for unsolicited Special Papers with the Editor-in-Chief or the Special Papers Editor. Manuscripts are subject to the usual review process. Benefits for Special Invited Papers include rapid publication, no page charges, and free membership in the BSA for one year. In the introduction, succinctly explain why your paper is of interest to the general biological community.

Brief Communications—These are short papers (2–5 printed pages) reporting significant new findings that do not warrant standard full-length treatment with the usual main headings, or that provide scholarly commentaries, corrections, criticisms, or alternative interpretations of results presented in published papers. “Opinion” papers that are unsupported by new data or reanalysis of published data are unacceptable. Brief Communications are subject to normal review. Publication will be expedited. Membership requirements and page charges are not waived.

Invited Commentary—All invited commentaries are paired with a forthcoming paper, usually on the suggestion of an Associate Editor or the Editor-in-Chief. These 3- to 5-page articles discuss the contributions and significance of the research

paper relative to accepted or emerging paradigms in the subject. Membership requirements and page charges are waived.

Book Reviews—All book reviews are by invitation, and publication is expedited. Direct communication and manuscripts to the Book Review Editor. Membership requirements and page charges are waived. An alternative outlet for book reviews is the *Plant Science Bulletin*. [Contact the editor at psb@botany.org.]

Manuscript Preparation

A cover letter, an author agreement form, a manuscript file, and separate files for figures should be uploaded at <http://ajb.edmgr.com>. The manuscript file includes in the following order: Title Page, Footnote Page, Abstract Page, Text, Literature Cited, Tables, Appendices, and Figure Legends.

For manuscript files, MS Word (.doc) format is preferred, but Rich Text Format (.rtf) files are acceptable for review as well.

The Editorial Manager online submission system automatically inserts line numbers to facilitate review comments, so line numbers are not required in the manuscript file.

Double-space and left justify the margin of the entire manuscript, including Literature Cited, Appendices, Figure Legends, and Tables, using continuous pagination.

Leave at least a 2.5-cm margin on all sides. Place a header with last name(s) of author(s) and page number in upper right corner.

Number figures and tables in the order discussed in the text.

Cover/Response Letter

Include a cover letter that describes the questions addressed or hypotheses tested, the major contribution of your paper to your discipline, and how this contribution is of interest to a broad audience. List any papers on related topics by any of the authors that have been published within the past year or that are in review or in press. For a revision, include a letter detailing your response to all the review comments.

Author Agreement Form

Upon initial submission of a manuscript, the corresponding author must fill out an author agreement form and either upload an electronic version at the online submission site or mail or fax a hard copy to the Editorial Office in St. Louis, Missouri (**American Journal of Botany**, P.O. Box 299, St. Louis, MO 63166-0299, USA; 1-314-577-9515). The author agreement form is available online at http://www.botany.org/ajb/AJB_Author_Agreement_Form_2.docx; on the Editorial Manager website at the "Attach Files" screen; and from the Editorial Office.

Manuscript Content

1. Title Page

Place a running head 2.5 cm (1 in) below the top of the page with the surname of the FIRST author (followed, as appropriate, with the surname of a sole co-author, or with et al. if there are three or more authors) and a short title.

The manuscript title for research papers should be specific and informative, conveying the key findings of the research in an active voice. Center boldfaced title written with sentence-style capitalization, followed by superscript 1 (for footnote 1, to appear on footnote page). In most cases, Latin binomials in a title should be followed by the name of the family in parentheses.

Below the title, list authors: each author's first name, middle initial, surname. On the next line, give affiliation and unabbreviated address. If authors have different affiliations and addresses, add a superscript number after each author's name to indicate the footnoted address. Include another footnote superscript number to indicate the author for correspondence.

2. Footnote Page

Include the following footnote:

¹Manuscript received _____; revision accepted _____.

Place brief acknowledgments, if desired, as a separate paragraph, using the following style: "The author(s) thank(s)..." For brevity, do not use first names. Include grant acknowledgments here.

Other footnotes (e.g., e-mail for correspondence) are permitted: match footnote numbers with those on the title page.

3. Abstract Page

AJB requires structured abstracts for manuscript submission. The abstract is 250 words or less, written in the following structured format:

- *Premise of the study* (why the work was done, what major questions of plant biology are addressed, and why it is important to the broad *AJB* readership)
- *Methods*
- *Key results*
- *Conclusions* (what major points should the reader take from this article)

Note that the abstract will be used in an RSS feed and thus should capture the interest of the general botanical community as well as the specialists and include the most important contribution of this paper. Avoid references; if essential, cite parenthetically with journal name, volume number, pages, and year.

Provide a list of 3–10 "**Key words**" that will be used for the volume index. Capitalize proper nouns, place in alphabetical order, and separate by semicolons.

4. Text

In the first paragraph of the introduction, include the theoretical or conceptual basis for your work in a context accessible to the diverse botanical readership that **AJB** attracts. Include a summary of conclusions and a take-home message for the generally informed reader in the DISCUSSION.

Center main headings and capitalize all letters: MATERIALS AND METHODS, RESULTS, and DISCUSSION.

Indent subheadings at the start of a paragraph; capitalize only the first word and proper nouns and adjectives.

Second-level headings—(boldface italic followed by an em dash)

Third-level headings—(italic followed by an em dash) Fourth-level headings—(regular text followed by an em dash)

In MATERIALS AND METHODS add name, city, spelled-out state (if in USA), and country of manufacturers/suppliers after brand names.

If statistical analyses are used, include statistical values in the RESULTS either in the text or within tables. Include the statistic value, degrees of freedom, and *p*-value for each result reported (e.g., for a *t*-test report “*t* = 32.41, *df* = 1, *P* = 0.03” for an ANOVA report “*F*_{5, 23} = 26.45, *P* less than 0.001” [note two *df*-values as subscripts with *F*]). Use *P* for significance, and *p* for probability.

Common Latin words (e.g., *in vivo*, *sensu lato*) are not italicized.

Footnotes are not used in the text.

5. Literature Cited

Verify all entries against original sources. Double check that all references in the manuscript text are in the Literature Cited and vice-versa and that they agree in spelling and year.

Literature citations in text—Cite references in chronological order (oldest first); within a given year, order them alphabetically (e.g., Jones and Gil, 1999, 2006; Ashton et al., 2007; Brown, 2007; Jackson, 2005, 2008).

Single author: Jones (2008) or (Jones, 2008). Two authors: Jones and Gil (2008) or (Jones and Gil, 2008). More than two authors: Jones et al. (2008) or (Jones et al., 2008).

Manuscripts accepted for publication but not yet published: Jones (in press) or (Jones, in press). Include “In press” citations in LITERATURE CITED (shown later).

Unpublished data and manuscripts (e.g., submitted, in prep.) and personal communication: (F. Jones, Institution, unpublished data [or unpublished manuscript or personal observation]). These are not included in LITERATURE CITED.

References listed in LITERATURE CITED—List citations in alphabetical order by author. Single-author titles precede multi-authored titles by the same senior author, regardless of date.

List works by the same author(s) chronologically, beginning with earliest date of publication. Spell out all author(s) names. Use “a”, “b” (determined alphabetically) for works with the same author(s) and year citation.

For multi-authored works, list the first seven authors and then “et al.”— unless there are only eight authors and then list all eight.

Type author names in citations in upper and lower case or in large and small caps, *not* in all caps. For formatting examples (note spacing, capitalization, italics, etc.), go to http://www.botany.org/ajb/ajb_Lit_Cited_Instructions.pdf.

6. Tables – include in manuscript file and place immediately after Literature Cited

Tables need to be formatted using the Table feature in Word or in a spreadsheet such as Excel.

Number tables with Arabic numerals followed by a period. Capitalize first word of title; all others, except proper nouns, are lowercase; spell out names of genera and abbreviations on first mention; place period at end. Include study organism (species or group) and geographic location in each caption when appropriate. Place explanatory notes and define all abbreviations below the table after the heading “Note:” or “Notes:”. Place footnotes after the Notes.

Every column must have an appropriately placed heading (esp. the first at left—the stub head), with appropriate subheadings. In the body of the table, capitalize the first word of each entry (and proper nouns); do not use vertical lines between columns; indicate footnotes by lowercase superscript letters.

If the use of color in a table is essential, please contact the Editorial Office at ajb@botany.org.

7. Appendices – include in manuscript file and place immediately after the tables

If voucher and gene accession information support the study, list these in Appendix 1, which will be published in the print and online versions. Provide an appendix title, and a sentence-style row of headings for the data. For each taxon sampled, include specimen voucher information and/or gene accession numbers, separated by commas. To save space, the taxa can be run together in a paragraph. See a current issue or <http://www.amjbot.org/content/98/6/1049.full> for an example.

Additional appendices may be included. **AJB** encourages online-only publication of extensive appendices, as well as other supplemental materials that support the article but are best presented electronically (see “Online Supplemental Materials” below).

8. Figure Legends – include in manuscript file and place immediately after the Appendices (or after the tables if there are no appendices)

Each figure legend must be complete and informative so that reference to the text is not necessary to understand the content of the figure. Abbreviations should be defined unless they are standard convention. Place legends as separate paragraphs following the appendices. For figures with multiple lettered panels, a general title for the figure should be followed by a description of each panel (e.g., Fig. 5. Relationship between... (A) All fruits. (B) Fruits less than 0.5 mm.). When applicable, study organism (species or group) or geographic location, and define scale bar (e.g., Bar = 0.1 μm). For micrographs, include pertinent information such as magnification and type of section, stain, optics, or special techniques. Any nonlinear adjustment to photographs must be detailed.

Define all symbols and abbreviations either in a key within the figure or in the legend; if defined in an earlier legend, the

appropriate figure or table may be cited.

Place figure abbreviations in alphabetical order and format as follows: c, cell; n, nucleus.

9. Figures/Illustrations - upload as separate files (do not include in the manuscript file)

For details and illustrated examples, see http://www.botany.org/ajb/AJB_Digital_Art_Guidelines.pdf. A figure checklist is also available at http://www.botany.org/ajb/AJB_Figure_Checklist.pdf.

TIFF or EPS formats are preferred for color and black and white photographs, drawings, and graphs.

Prepare figures at the final size desired: 1 column (8.9 cm [3.5 in]), 1.5 column (12.7-15.3 cm [5-6 in]), or 2 columns (18.4 cm [7.25 in]) wide and less than the length of the page (23 cm [9 in]).

Low-resolution files may be initially uploaded/submitted for the review process. Once your manuscript has been tentatively accepted, printer-quality (high-resolution) figures are required. See "Tips for Large Files" below.

Figure Manipulations

Certain types of electronic manipulations of micrographs and other digital images may not be ethically acceptable. Images that will be compared with each other must be acquired and processed under the same conditions. Manipulations such as background subtraction or white-balancing should be explained in the Materials and Methods section. Note that a selected area within an image may not be altered or enhanced; the entire image must be treated the same. Linear adjustments to contrast, brightness, or color must be applied to an entire image or plate equally (or explained). Detail nonlinear adjustments in the legend. Always keep original raw data files for documentation upon request.

Resolution for Final Figures

Line art (black lines and text, including phylogenetic trees): 1000-1200 dpi.

Halftone/grayscale (images with shades of gray, such as black and white photographs): a minimum of 300 dpi.

Color: a minimum of 300 dpi. Use RGB mode (not Indexed Color Mode). [Note: Do not send color files if images are to be printed in black and white.]

Combination art (grayscale image with type): 600-900 dpi.

Grayscale images should have the whitest area of the image set at a 2% highlight value, while the blackest area of the image should be set to a 98% shadow value.

Include the screen and printer font files for any text that has been added to the figure. Use PC or Mac versions of Adobe Postscript fonts. To avoid font problems, convert all type to curves or paths.

Format and Style

Use consistent style, font, and font size (between 6 and 10 pt.) for all figures. Use of standard fonts (Times New Roman, Helvetica) gives better results.

For figures with multiple elements (photos, drawings, or graphs), group elements in a rectangle or square and label the top left corner of each element with a capital letter (e.g., A, B). Keep elements close together for best use of space. Photographs in a composite plate should each be numbered and separated by a thin line or blank space.

Label axes; include Standard International (SI) Units of measure in parentheses; capitalize only the first letter of the first word (e.g., "Stem growth (%)"). Axis label should be c. 0.2 cm from units on axis, but no more than 0.5 cm; x- and y-axis labels should be equidistant from axes.

Use abbreviations consistently in the text and figures.

For magnified illustrations, provide a scale bar defined in either the figure itself or at the end of the legend.

Cover image and caption

You are invited to submit one or more color photographs (or artificially colorized photomicrographs) to be considered for a cover illustration. The image must be at least 300 ppi and in portrait format slightly larger than 21.6 cm wide × 28 cm high (8.5 × 11 in). Submit the file(s) online with your original submission or revised manuscript. Also include a brief caption that describes the image, scientific name and authority of any organism, photographic technique, image manipulation, and the major result of the research. For micrographs, include pertinent information such as magnification and type of section, stain, optics, or special techniques.

The legend should do more than just describe the image itself: it should "tell a story" by explaining why the image is important to entice the reader to search for the full article. See <http://www.amjbot.org/content/vol95/issue4/cover.shtml> for an example.

Tips for Large Files

Files >5 MB may be slow (or impossible) to upload on most servers. When saving graphics, LZW compression (Save As/Option) may be used to reduce file size. If your image is line-art and all pixels are either black or white, first convert the image to grayscale mode, then convert to bitmap mode at 1200 dpi, then save with LZW compression. If your image is black and white with gray portions, convert the image to grayscale mode, then save with LZW compression. (If you have any confusion about bitmap mode for line-art, your Digital Art Guidelines contain examples of image types with suggested resolutions. Alternatively, the Editorial Office may direct you to upload the files to an FTP site or send them via e-mail through <http://www.YouSendIt.com>.)

Online Supplemental Materials

Authors may wish to augment their manuscripts with online supplemental materials (e.g., large data sets, three-dimensional reconstructions, simulations, real-time movies, color photographs). Upload these appendices as separate files with the initial manuscript submission. Include a header on each file using this format: Smith et al.—American Journal of Botany 99(##): ###-###. 2012. — Data Supplement S1 — Page 1". Name online supplements Appendix S1, Appendix S2, etc, in the order in which they appear in the text, regardless of whether they are tables, figures, text, other media, or a combination thereof. In the

manuscript, after the mention of an online appendix, include the following: "(see Supplemental Data with the online version of this article)".

Note that if authors wish to submit long DNA sequence appendices as supplemental material, they should select the "DNA sequences (online-only supplemental)" option on Editorial Manager. This ensures that lengthy appendices are not built into the reviewers' PDF, but are still accessible to the reviewers.

Abbreviations, Units, and Symbols

See a recent Table of Contents page for commonly used abbreviations.

Do not begin a sentence, heading, or title with an abbreviation.

Abbreviate figure as "Fig." or "Figs."

Use the following abbreviations with numerals without spelling out at first use: h, min, s, yr, mo, wk, d, cm, mm, DNA, cpDNA, RNA, dNTP. Designate temperature as in 30°C (use the degree sign, not zero or the letter o).

Numbers: write out one through nine unless a measurement, a designator, or in a range (e.g., four petals, 3 mm, 6 yr, 5–11 species, day 2). Use % instead of percent with numerals; 1000 instead of 1,000; 10 000 instead of 10,000; 0.13 instead of .13.

Use Standard International (SI) units throughout the text, figures, and tables. Use the word mass (kg, g, mg) correctly; weight is reported in newtons (N). Use either a solidus for one unit in the denominator (e.g., kg/m²) or a negative exponent with multiplier dot (e.g., kg•m⁻²•d⁻¹) for two or more units in the denominator. Use L for liter (mL for milliliter).

Include a space before and after all operation signs (e.g., =, +) with equations and definitions; use an en dash (width of two hyphens) for minus sign.

Copyright and Color Agreement Forms

Once your manuscript has been accepted for publication, return signed copyright forms for the article, and any color plates, to the Editorial Office in St. Louis, Missouri. All authors must sign off on the copyright form or contact the Editorial Office to confirm their participation in the work.

Copyright Assignment - <http://www.botany.org/ajb/AJBcopyright.pdf>

Color agreement form - http://www.botany.org/ajb/AJBcolor_agr.pdf

If you have reproduced copyrighted material in your manuscript, send proof of permission to the Editorial Office.

If you would like to reproduce copyrighted material previously published in the *American Journal of Botany*, return the completed permission request form available online at <http://www.botany.org/ajb/BSAPermission.pdf>.

Questions? Contact the Editorial Office

American Journal of Botany

Amy McPherson, Managing Editor

Editorial Office

P.O. Box 299

St. Louis, MO 63166-0299

phone: 314-577-5112; FAX: 314-577-9515

E-MAIL: ajb@botany.org

[Last updated 28 January 2013]

Covre & Lorenz-Lemke – FILOGEOGRAFIA DE ESPÉCIES DE *Echinopsis*

**Filogeografia e genética da conservação do gênero *Echinopsis* (Cactaceae) no
Pantanal brasileiro¹**

Wesley S. Covre^{2,3} e Aline P. Lorenz-Lemke²

¹Manuscrito recebido _____; revisão aceita _____.

²Laboratório de Evolução e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Cidade Universitária, s/n. Bairro Universitário. Campo Grande-MS. 79070-900

³Autor para correspondência: covrews@gmail.com

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudos concedida ao primeiro autor; à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do estado de Mato Grosso do Sul, pelo financiamento deste estudo; e à Vale Complexo Corumbá e MMX Sistema Corumbá, pelas permissões da realização de estudos com *E. calochlora* nas áreas das empresas.

Resumo

Premissa do estudo — O Pantanal é uma grande planície recente inundável situada no centro da América do Sul. Formações montanhosas, isoladas da inunda  o, abrigam uma das poucas espécies endêmicas da região, a cactácea *Echinopsis calochlora*, ameaçada de extin  o pela intensiva minera  o de ferro em seu habitat. Próximo a esta região está a borda leste do Chaco onde ocorre a cong  n  rica *E. rhodotricha*, localmente ameaçada pelo desmatamento para pastagens. Através de análises genético-espaciais dessas espécies, este estudo tem como objetivo contribuir para o estabelecimento de políticas de conserva  o.

Materiais e métodos — Através da análise das sequências de dois espaçadores intergênicos de cpDNA (*psbA-trnH* e *trnS-trnG*), foram estimados índices de diversidade, testes de neutralidade e de estrutura  o populacional. A posi  o de *E. rhodotricha* na filogenia de *Echinopsis* foi determinada através de análise de máxima verossimilhança. Padrões geográficos, atuais e do passado, foram obtidos através da constru  o de modelos de distribui  o potencial baseados em variáveis bioclimáticas.

Principais resultados — As sequências de *trnS-trnG* geraram dois haplótipos em *E. calochlora* e cinco em *E. rhodotricha*. As análises filogenéticas revelaram que *E. calochlora* e *E. rhodotricha* não são grupos irmãos e que esta última possui uma posi  o basal no clado *Echinopsis* sensu lato. A distribui  o dos haplótipos de *E. rhodotricha* não apresentou estrutura  o genética e correla  o entre as distâncias genéticas e geográficas. As distribui  es potenciais de ambas as espécies estimadas para o último Máximo Glacial são substancialmente menores do que as de hoje.

Conclusões — Apesar de incipientes, as análises genéticas revelaram que *E. rhodotricha* apresenta maiores índices de diversidade genética se comparada a *E. calochlora*. A ausência de estrutura  o populacional em *E. rhodotricha*, mesmo com a análise de marcadores de herança materna, indica que há considerável fluxo gênico populacional e que a conectividade entre os únicos remanescentes de Chaco do Brasil deve ser mantida. Dada a baixa diversidade genética observada, para a obten  o de um panorama mais completo sobre a história evolutiva de ambas as espécies será necessária a amplia  o do número de marcadores analisados. Desta forma, será possível uma contribui  o mais efetiva da genética para a conserva  o e manejo destas espécies cujos habitats são únicos no Brasil e encontram-se extremamente ameaçados.

Palavras-chave: Chaco brasileiro; *Echinopsis calochlora*; *E. rhodotricha*; espécies endêmicas; Maciço do Urucum; modelagem de distribui  o potencial; *trnS-trnG*

Abstract (Phylogeography and conservation genetics of the genus *Echinopsis* — Cactaceae — in Brazilian Pantanal)

Premise of the study — Pantanal is a large recent flood plain, at the center of South America. Mountainous formations, flood-free, shelter one of the few endemic species of the region, the cactus *Echinopsis calochlora*, endangered by the intensive iron mining in its habitat. Close to this region is located the Chaco east edge, where the congeneric *E. rhodotricha* occurs, locally threatened by deforestation for pastures. Through genetic-spatial analysis of these species, this study aims to contribute to the establishment of conservation policies.

Methods — Through the analysis of sequences from two cpDNA intergenic spacers (*psbA-trnH* and *trnS-trnG*), diversity indices, neutrality tests and population structuring tests were estimated. The position of *E. rhodotricha* in *Echinopsis* phylogeny was determined through a maximum likelihood analysis. Current and past geographic patterns were obtained through the construction of potential distribution models based on bioclimatic variables.

Key results — The *trnS-trnG* sequences produced two haplotypes in *E. calochlora* and five in *E. rhodotricha*. The phylogenetic analysis revealed that *E. calochlora* and *E. rhodotricha* are not sister groups and that this last one has a basal position in *Echinopsis* sensu lato. The *E. rhodotricha*'s haplotypes distribution did not show genetic structuring and correlation between genetic and geographic distances. The potential distributions from both species estimated to the Last Glacial Maximum are substantially smaller than the current ones.

Conclusions — Although being incipient, the genetic analysis revealed that *E. rhodotricha* has higher genetic diversity indices when compared to *E. calochlora*. The absence of population structuring in *E. rhodotricha*, even when analyzing maternally-inherited markers, indicates that exists considerable gene flow across populations and that the connectivity between the only Chaco remnants from Brazil should be maintained. Given the low genetic diversity observed, it will be necessary to increase the number of analyzed markers for the acquisition of a more comprehensive overview on the evolutionary history from both species. Thus, a more effective contribution from genetics to conservation and management of these species, whose habitats are unique in Brazil and stand extremely threatened, shall be possible.

Key words: Brazilian Chaco; *Echinopsis calochlora*; *E. rhodotricha*; endemic species; “Maciço do Urucum”; potential distribution modelling; *trnS-trnG*

INTRODUÇÃO

O Pantanal é uma grande planície sedimentar (160 mil km²) situada no Centro-Oeste do Brasil (140 mil km²), leste da Bolívia (15 mil km²) e norte do Paraguai (5 mil km²; Junk et al., 2006). Sua topografia quase plana, em geral entre 80 e 150 m acima do nível do mar, ocasiona periódicos alagamentos na região devido à dificuldade de escoamento dos rios da Bacia do Rio Paraguai (Franco e Pinheiro, 1982). Em meio à planície inundável destaca-se um conjunto de formações montanhosas na região fronteira entre o Brasil e a Bolívia ([Fig. 1 A, B](#)), representado pelo Maciço do Urucum e pela Morraria do Mutum-Jacadigo (Franco e Pinheiro, 1982). Comparativamente à região da planície, esses morros rochosos apresentam um maior número de espécies de plantas endêmicas (Pott et al., 2009), pois estas áreas isoladas da inundação funcionam como ilhas, proporcionando um dos raros centros de endemismos no Pantanal. Em contrapartida, algumas espécies deste local estão ameaçadas de extinção devido à mineração do ferro do conteúdo litológico dessas morrarias (Anjos e Okida, 2000). Este é o caso de *Echinopsis calochlora* K. Schum. (Cactaceae; MMA, 2008), que ocorre em campos de altitude do Maciço do Urucum e indica a ocorrência de ferro de alta qualidade (Garcia, 2008).

Outro ambiente que se destaca na paisagem do Pantanal é a intrusão do Chaco no Brasil. Em sua distribuição total, o Chaco ocupa uma extensão de aproximadamente 800 mil km², mas no Brasil ocupa apenas uma área restrita de aproximadamente 1 - 2 mil km² (Hueck, 1955; Prado et al., 1992; [Fig. 1 A, C](#)). As áreas de Chaco no Brasil compreendem apenas algumas manchas de Savana Estépica Florestada ou Savana Estépica Arborizada no município de Porto Murtinho, na borda oeste do estado de

Mato Grosso do Sul (MS; IBGE, 1992; Silva et al., 2008). Apesar de estas formações vegetacionais abrigarem várias espécies de distribuição única no Brasil, como a cactácea *Echinopsis rhodotricha* K. Schum., não há Unidades de Conservação para a região, e grande parte dessas áreas vem sendo desmatada para o plantio de pastagens (Silva et al., 2008, 2011).

As populações de *E. calochlora* no Maciço do Urucum e de *E. rhodotricha* no Chaco brasileiro estão sujeitas a várias consequências genéticas, em razão de suas características e da destruição dos habitats onde ocorrem. Quando os tamanhos populacionais são reduzidos, a diversidade genética pode ser perdida em consequência da deriva genética (Ellstrand, 1992; Maki, 2001; Frankham et al., 2008). Outro processo que pode ocorrer em populações pequenas e isoladas é a endogamia (Frankham et al., 2008), que pode levar a reduções na heterozigosidade, reprodução e sobrevivência, e a um aumento do risco de extinção (Lambert et al., 2006a, 2006b; Chaves et al., 2010).

Sequências não-codificantes de cpDNA podem ser usadas como marcadores genéticos para estudos de avaliação diversidade genética intraespecífica em plantas (Ding et al., 2012; Fehrmann et al., 2012; Geleta e Bryngelsson, 2012; Liu et al., 2013; Tnah et al., 2013). Com o intuito de avaliar a utilidade desses marcadores para estudos de filogeografia de plantas, Byrne e Hankinson (2012) testaram 13 regiões de cpDNA não-codificantes supostamente altamente variáveis em seis espécies de quatro diferentes famílias para as quais a estrutura filogeográfica já havia sido obtida com marcadores RFLP, detectando altos níveis de variabilidade intraespecífica. Três espaçadores intergênicos (*trnQ-rps16*, *trnS-trnG* e *psbA-trnH*) foram as regiões que

mais variaram entre indivíduos na maioria das espécies. Estes espaçadores são, portanto, fortes candidatos a terem os seus níveis de variabilidade testados em famílias onde não é possível identificar quais são as regiões mais variáveis e adequadas para avaliar a diversidade genética intraespecífica. Este é o caso de Cactaceae, onde, até o momento, estudos filogeográficos com marcadores de cpDNA ainda são extremamente raros. Somente Paterson et al. (2009) utilizaram estes marcadores para este fim, tendo encontrado baixa variabilidade no íntron do *trnL* em populações introduzidas de *Pereskia aculeata* Mill., na África do Sul.

Pesquisas que enfoquem os efeitos genéticos da diminuição e perda do habitat de cactáceas são extremamente importantes para identificar e priorizar áreas protegidas que considerem a viabilidade das populações no futuro (ICMBio, 2011). Inclusive, a elaboração de estudos para subsidiar a criação de Unidades de Conservação que incluam *E. calochlora* é uma das ações previstas no Plano de Ação Nacional para Conservação das Cactáceas (ICMBio, 2011). Neste contexto, este estudo pretende contribuir para o estabelecimento de políticas de conservação de *E. calochlora* e *E. rhodotricha*, através de análises da distribuição da variabilidade genética e da história evolutiva de suas populações. Também são apresentados dados sobre as relações filogenéticas de *E. calochlora* e *E. rhodotricha*, e os modelos de suas distribuições potenciais no presente e passado, que ajudaram a compreender os padrões de diversidade genética atuais dessas espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

Áreas de estudo — O Maciço do Urucum compreende um relevo residual, originado de restos de uma plataforma muito antiga, cuja litologia data do Pré-Cambriano (4.600 - 550 milhões de anos - Ma; Franco e Pinheiro, 1982), e que foi provavelmente reativado no Terciário Superior (23 - 2 Ma) durante o clímax da orogenia andina (Almeida, 1959). É composto pelas seguintes morrarias: Urucum (971 m), Santa Cruz (1.065 m; ponto mais alto do MS), São Domingos (800 m), Grande (951 m), Rabichão (700 m) e Tromba dos Macacos (500 m; Franco e Pinheiro, 1982; Neves e Damasceno-Junior, 2011; [Fig. 1 B](#)), que, por estarem em meio à planície alagável, estabelecem um abrupto ecótono na região, permitindo o estabelecimento de diversas fitofisionomias (Floresta Estacional Semidecidual Aluvial, Floresta Estacional Semidecidual Submontana, Savana Arborizada, Savana Gramíneo-Lenhosa, Relíquia sobre Bancada Laterítica, áreas de transição e capoeiras; Pott et al., 2000). Por esta razão, e por abrigar algumas espécies endêmicas (*Gomphrena centrata* E. Holz. – Amaranthaceae - e *Aspilia grazielae* J. U. Santos - Asteraceae, Pott et al., 2000; *Discocactus ferricola* Buining & Brederoo e *Echinopsis calochlora* K. Schum. – Cactaceae, Tomas et al., 2010; Eggli, 2002), o Maciço do Urucum é considerado uma das Áreas Prioritárias para a Conservação da Biodiversidade da Flora do Cerrado e Pantanal (MMA, 1999).

O Chaco é uma ampla província fitogeográfica (800 mil km²) situada nas planícies do nordeste da Argentina, oeste do Paraguai, sudeste da Bolívia, e em uma pequena área na borda oeste do estado de MS, no Brasil (1-2 mil km²; Prado, 1993; Prado et al., 1992; Hueck, 1955; [Fig. 1 A, C](#)). O Chaco compreende uma das poucas áreas no mundo onde a transição entre a zona tropical e a zona temperada não ocorre

na forma de um deserto, mas sim como florestas semiáridas e bosques (Morello, 1967), compostos por árvores do gênero *Schinopsis* Engl. (Anacardiaceae), espécies de *Aspidosperma quebrachoblanco* D.F.K. Schltd. (Apocynaceae), *Tabebuia nodosa* (Griseb.) Griseb. (Bignoniaceae), *Vachellia Wight & Arn.* (Fabaceae), *Bulnesia* Gay (Zygophyllaceae), uma camada descontínua de arbustos consistindo principalmente de espécies espinhentas de Mimosoideae, e um estrato geralmente esparsos de Bromeliaceae e Cactaceae, com poucas gramíneas (Pennington et al., 2000). Assim como as florestas tropicais sazonalmente secas, a vegetação do Chaco também cresce em áreas de baixa precipitação e alta sazonalidade, e provavelmente ocupa uma área menor atualmente do que nas eras glaciais (Pennington et al., 2004). Whitney et al. (2011), verificaram dois períodos em que as florestas tropicais sazonalmente secas ocuparam grandes extensões durante os últimos 45 mil anos, no interior da América do Sul: um na segunda fase do último período glacial (19,5 mil anos) e outro no período do Holoceno inicial–médio (10 - 3 mil anos).

Espécies estudadas — Tanto *E. calochlora* como *E. rhodotricha* possuem grandes flores laterais, brancas, com antese noturna, de aroma agradável e que duram apenas uma noite (Eggli, 2002). Essas características se encaixam em duas síndromes de polinização: falenofilia/esfingofilia (mariposas/esfingídeos) e cantarofilia (besouros; Faegri e Van der Pijl, 1979). Observações em campo indicam que *E. calochlora* é polinizada por mariposas (D. R. M. Neves, com. pess.), e *E. rhodotricha*, por besouros (C. S. Souza, com. pess.). Para *E. calochlora*, também foi observado que formigas dispersam as sementes (D. R. M. Neves, com. pess.) e que pode ocorrer reprodução

vegetativa em algumas populações, através da formação de pequenos brotos que se destacam da planta-mãe e enraízam em outro local para formar novos indivíduos (C. R. Lehn, com. pess.). Não há dados sobre os sistemas reprodutivos de *E. calochlora* e *E. rhodotricha*, entretanto, já foi observada auto-incompatibilidade em outras espécies do gênero (*E. chiloensis* (Colla) Friedrich & G.D.Rowley, Ossa e Medel, 2011; *E. terscheckii* (Parm.) Friedrich & G.D.Rowley, Ortega-Baes et al., 2011; *E. schickendantzii* F.A.C.Weber, Alonso-Pedano e Ortega-Baes, 2012).

Alguns autores reconhecem duas subespécies para *E. calochlora*: *E. calochlora* K. Schum. ssp. *calochlora* e *E. calochlora* K. Schum. ssp. *glaetzleana* P.J. Braun & Esteves. A subespécie *glaetzleana* é descrita para a Serra da Bodoquena, a noroeste da cidade de Bonito (MS; Eggli, 2002) e difere da subespécie-típica por ter cladódios de somente 7,5 cm de diâmetro, de 14 a 16 costelas em vez de 13 e flores menores (Anderson, 2001). *Echinopsis rhodotricha* também é dividida em duas subespécies: *E. rhodotricha* K. Schum. ssp. *rhodotricha* e *E. rhodotricha* K. Schum. ssp. *chacoana* (Schütz) P.J. Braun & Esteves. A subespécie *rhodotricha* tem de oito a 13 costelas, de quatro a sete espinhos radiais e ocorre no Brasil, Paraguai, Uruguai e nordeste da Argentina. Já a subespécie *chacoana* possui de 12 a 18 costelas, sete ou oito espinhos radiais, e ocorre somente na região do Chaco Boreal do Paraguai (Anderson, 2001; Eggli, 2002). Neste estudo, para as análises genéticas, somente foram amostrados indivíduos das subespécies típicas. A relação filogenética entre *E. rhodotricha* e *E. calochlora* e, mesmo entre *E. rhodotricha* e o restante do gênero *Echinopsis*, é desconhecida, uma vez que esta espécie não foi incluída na filogenia recém-publicada do grupo (Schlumpberger e Renner, 2012).

Coleta e extração de DNA — As amostras de *E. calochlora* foram coletadas em populações distribuídas ao longo do Maciço do Urucum e da Morraria do Mutum-Jacadigo, e as de *E. rhodotricha* em manchas de Chaco arborizado (Savana Estépica Arborizada; Silva et al., 2011) no município de Porto Murtinho (MS). Como se tratam de espécies localmente ameaçadas, somente fragmentos de ponta de raiz foram retirados, de forma a não danificar os indivíduos. As amostras foram acondicionadas em sílica gel para secagem, e os indivíduos georreferenciados através de aparelho de GPS. O DNA foi extraído com CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) seguindo o protocolo de Roy et al. (1992).

Os espaçadores intergênicos cloroplasmáticos *trnH-psbA* e *trnS-trnG* foram amplificados por PCR com “primers” universais descritos por Sang et al. (1997) e Hamilton (1999), respectivamente. As reações de amplificação do marcador *trnH-psbA* foram realizadas em um volume de 25 µl contendo os seguintes reagentes: 1 unidade de Taq polimerase (Invitrogen); tampão 1X; 0,2 mM dNTPs; 3 mM MgCl₂; 0,2 µM de cada “primer” e 10 ng de DNA genômico. Para a o marcador *trnS-trnG* foram utilizadas as mesmas condições exceto a concentração de MgCl₂ (1,5 mM) e a quantidade de DNA genômico (20 ng). As condições de amplificação foram as seguintes: (1) *trnH-psbA*: 80°C, 5 min; 35x (94°C, 30 s; 56°C, 30 s; 72°C, 1 min); 72°C, 10 min; e (2) *trnS-trnG*: 80°C, 5 min; 30x (95°C, 1 min; 66°C, 4 min); 66°C, 10 min. Ambos os protocolos foram adaptados de Shaw et al. (2005). Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados utilizando polietilenoglicol (PEG) 20% seguindo o protocolo de Dunn e Blattner (1986). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados, com os

“primers” direto e/ou reverso, no sequenciador *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) conforme as orientações da fabricante. As sequências obtidas foram verificadas através da ferramenta *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e serão depositadas na base de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Análises genéticas — Descritores básicos como diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (h) foram calculadas no programa *Arlequin* v.3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). Com a finalidade de avaliar a dinâmica demográfica das espécies, os índices de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e F_S de Fu (Fu, 1996) também foram calculados pelo programa *Arlequin* v.3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). Utilizando o mesmo programa, foi feita a análise da variância molecular (AMOVA; Excoffier et al., 1992) para estimar a diferenciação genética entre as populações e entre grupos. Os haplótipos gerados foram determinados através do programa *DnaSP* v.5.10.01 (Librado e Rozas, 2009). A correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, para testar a hipótese de isolamento por distância, foi avaliada com o programa *Alleles In Space* (AIS) v.1.0 (Miller, 2005) através da realização do teste de Mantel (Mantel, 1967) e do teste de Autocorrelação Espacial (Cliff e Ord, 1973; Sokal e Oden, 1978a, 1978b).

A filogenia recém-publicada do gênero *Echinopsis* inclui sequências de *E. calochlora*, mas não de *E. rhodotricha* (Schlumpberger e Renner, 2012). Para investigar a posição de *E. rhodotricha* na filogenia do gênero e compreender melhor seu relacionamento filogenético com *E. calochlora*, comparamos uma sequência de *trnS-trnG* de *E. rhodotricha*, produzida pelo presente estudo, com sequências de outras

Echinopsis sensu lato publicadas por Schlumpberger e Renner (2012). A sequência de *Lasiocereus fulvus* F. Ritter, produzida neste mesmo estudo, foi utilizada como grupo externo. As espécies cujas sequências foram utilizadas e seus respectivos números de acesso ao *GenBank* estão descritos no Apêndice 1. O relacionamento filogenético entre as sequências foi determinado com programa *RAxML* v.7.4.2 (Stamatakis, 2006) através da análise de máxima verossimilhança (Felsenstein, 1981), utilizando os parâmetros de 100 réplicas para o suporte de “bootstrap” e o modelo de substituição nucleotídica GTR (“Generalised Time Reversible”), o mesmo utilizado por Schlumpberger e Renner (2012).

Modelagem de distribuição potencial — Para determinar a extensão da distribuição potencial de *E. calochlora* e *E. rhodotricha* nas condições climáticas atuais (entre os anos de 1950 e 2000, aproximadamente) e durante o Último Máximo Glacial (UMG; 21 000 anos), o software *Maxent* v.3.3.3k, que utiliza o princípio da “Máxima Entropia” (Phillips et al., 2006), foi empregado. Os pontos de ocorrência das espécies foram obtidos nas coletas deste estudo, através de GPS, na base de dados de coleções científicas *speciesLink* (<http://www.splink.org.br/>), na plataforma de dados de biodiversidade *GBIF* (<http://www.gbif.org/>) e no Herbário da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CGMS), e os “grids” ambientais através do site <http://www.worldclim.org/> (Hijmans et al., 2005). Para modelar a distribuição potencial atual de *E. calochlora* e *E. rhodotricha*, foram utilizados os “grids” das 19 variáveis climáticas que formam BIOCLIM (variáveis derivadas dos valores mensais de temperatura e precipitação, a fim de gerar variáveis com maior significado biológico) e o “grid” de altitude, em resolução espacial de 30 arco-segundos ($\sim 1 \text{ km}^2$). Os modelos

de distribuição potencial no passado (UMG) foram obtidos através da projeção do nicho realizado atual em cenários climáticos gerados através de dois modelos climáticos globais (GCMs): “Community Climate System Model” (CCSM) e “Model for Interdisciplinary Research on Climate” (MIROC). Estes cenários estão disponíveis como “grids” ambientais das variáveis do BIOCLIM, em resolução espacial de 2,5 arcominutos (4,75 km²). No software *Maxent*, foi marcada a opção “Remove duplicate presence records” (que poderiam favorecer as condições climáticas de locais com uma maior amostragem), e o corte do “10 percentile training presence” foi aplicado. Os resultados gerados foram visualizados através do programa *DIVA-GIS* v.7.5 (Hijmans et al., 2001).

RESULTADOS

No Maciço do Urucum e Morraria do Mutum-Jacadigo foram obtidas amostras de 169 indivíduos de *E. calochlora* pertencentes a sete populações naturais, uma reintroduzida em área minerada e uma resgatada e mantida em casa de vegetação ([Tab. 1](#)). Nos remanescentes de Chaco arborizado foi obtido material de 191 espécimes de *E. rhodotricha* em oito populações naturais ([Tab. 1](#)). Nas populações menores, o maior número possível de indivíduos foi amostrado. Foram obtidas sequências para 11 indivíduos de *E. calochlora* e 11 de *E. rhodotricha*, do marcador *psbA-trnH*; e para 14 de *E. calochlora* e 38 de *E. rhodotricha*, do *trnS-trnG*. As características dos alinhamentos, amostragem e estimativas básicas de diversidade genética estão descritos na [Tab. 2](#).

Nenhum polimorfismo intraespecífico foi verificado dentro do espaçador intergênico *psbA-trnH* nas duas espécies estudadas. Para o *trnS-trnG*, as sequências de ambas as espécies foram polimórficas. Nas sequências de *E. rhodotricha* ocorre uma região de microssatélites (cpSSR) com um motivo de seis nucleotídeos (GAGGAA) a partir do sítio #618. Os demais polimorfismos estão descritos na [Tab. 2](#). Somente dois haplótipos foram encontrados ao longo da distribuição de *E. calochlora* ([Fig. 2](#)). Como a amostragem ainda é baixa e o número de haplótipos encontrados foi pequeno, não foram realizadas as demais análises populacionais para esta espécie. Para *E. rhodotricha* cinco haplótipos foram registrados, sendo que o Haplótipo 1, mais frequente, não está presente apenas na população BR, distante 15,6 km das demais. O segundo haplótipo mais frequente (Haplótipo 2) está distribuído em todas as populações amostradas, e o Haplótipo 3, nas populações centrais (RC3 e P3). Os outros dois haplótipos encontrados (Haplótipos 4 e 5) foram verificados somente na população BR ([Fig. 2](#)).

A AMOVA revelou que a maior parte da diversidade genética existente nas populações de *E. rhodotricha* amostradas pode ser atribuída a variações dentro das populações (95,70%). O índice de fixação se mostrou baixo (Hartl e Clark, 1997; $\phi_{ST} = -0,04304$ $p=0,28055$), indicando ausência de estruturação genética. No entanto, quando as populações foram divididas em dois grupos (Grupo 1: BR; Grupo 2: P1, P2, P3, RC1, RC2, RC3 e SM; [Tab. 1](#), [Fig. 2](#)), foi encontrado um nível muito alto de estruturação genética entres estes (Hartl e Clark, 1997; $\phi_{CT} = -0,46380$ $p=0,11535$). O teste de Mantel não evidenciou correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, refutando a hipótese de isolamento por distância ($r = -0,044$ $p=0,724$), assim como a análise de

Autocorrelação Espacial, na qual não houve um aumento contínuo da distância genética com o aumento da distância geográfica ($p = 0,933$).

Os índices de neutralidade D de Tajima e F_S de Fu não mostraram valores significativos ($D = -0,53971$ $p=0,262$ e $F_S = -1,13918$ $p=0,237$), indicando que as populações de *E. rhodotricha* não passaram por expansão demográfica, recentemente.

A análise de máxima verossimilhança com as sequências do marcador *trnS-trnG* de *Echinopsis* sensu lato disponibilizadas por Schlumpberger e Renner (2012) gerou uma árvore semelhante à deste trabalho, e colocou *E. rhodotricha* como grupo irmão de todas as espécies analisadas, com exceção de *E. bonnieae* (Halda, Hogan & Janeba) Halda & Malina e *E. famatimensis* (Speg.) Werderm., que formam um grupo com divergência mais antiga em relação às demais espécies (Fig. 3). Nesta análise fica claro que *E. calochlora* e *E. rhodotricha* não são espécies proximamente relacionadas e que o grupo irmão de *E. calochlora* é *E. oxygona* (Link) Zucc. ex Pfeiff. & Otto, de morfologia similar, que ocorre no estado do Rio Grande do Sul, no Brasil.

Os modelos das distribuições potenciais atuais gerados com os “grids” climáticos e de altitude com resolução espacial de 30 arco-segundos ($\sim 1 \text{ km}^2$) não diferiram substancialmente dos obtidos com somente os “grids” climáticos com resolução espacial de 2,5 arco-minutos ($4,75 \text{ km}^2$), e, por esta razão, aqui não são apresentados. A Fig. 4 mostra as distribuições potenciais de *E. calochlora* e *E. rhodotricha* no presente comparadas às possíveis distribuições durante o UMG, geradas através de “grids” climáticos com resolução espacial de 2,5 arco-minutos. Os modelos de distribuição atuais obtidos foram congruentes com as descrições de

ocorrência conhecidas para ambas as espécies. As distribuições potenciais de *E. calochlora* e *E. rhodotricha* durante o UMG foram substancialmente menores, nos dois cenários climáticos analisados.

DISCUSSÃO

Echinopsis calochlora e *E. rhodotricha* apresentaram, de forma geral, baixa variabilidade nos marcadores analisados. No marcador *psbA-trnH* não houve polimorfismos mesmo entre as populações mais distantes e isoladas de *E. calochlora* e *E. rhodotricha* (27,9 e 28,9 km, respectivamente). A maioria dos sítios polimórficos encontrados nas sequências de *trnS-trnG* foram “indels” em regiões de repetições simples (microsatélites), que possuem uma taxa mutacional reconhecidamente maior que as substituições nucleotídicas (Frankham et al., 2008).

Byrne e Hankinson (2012) relataram que, entre 13 regiões não-codificantes de cpDNA supostamente altamente variáveis, os espaçadores intergênicos *trnS-trnG* e *psbA-trnH* estão entre as três regiões que mais variaram entre indivíduos para a maioria das espécies analisadas, em diferentes famílias. Em Cactaceae, Paterson et al. (2009) encontraram baixos níveis de variação intrapopulacional em *Pereskia aculeata* Mill. através do íntron *trnL* do cpDNA. A maioria dos estudos genéticos populacionais realizados com Cactaceae utilizou aloenzimas como marcador (ICMBio, 2011) e, de modo geral, esses trabalhos relatam alta diversidade genética em espécies de hábito colunar (longos ciclos de vida), com reprodução predominantemente alógama e polinizadas por morcegos (Nassar et al., 2001). Mesmo *Stenocereus eruca* (Brandege)

A.C. Gibson & K.E. Horak, uma espécie colunar clonal e com habitat extremamente restrito no Deserto de Sonora, apresentou alta diversidade clonal, supostamente devido à ocorrência de recrutamentos sexuais episódicos (Clark-Tapia et al., 2005). Espécies endêmicas e ameaçadas, que habitam locais de altitude elevada, com polinizadores territorialistas e autocompatíveis como *Melocactus paucispinus* Heimen & R.J.Paul e *M. glaucescens* Buining & Brederoo, no entanto, apresentaram baixa diversidade de aloenzimas (Lambert et al., 2006a, 2006b).

Echinopsis calochlora possui a maioria dessas características (endêmica, ameaçada e habita locais de altitude elevada), e, embora os estudos de biologia reprodutiva em *Echinopsis* relatem auto-incompatibilidade (Ortega-Baes et al., 2011; Ossa e Medel, 2011; Alonso-Pedano e Ortega-Baes, 2012), a autocompatibilidade não pode ser descartada. Além disso, *E. calochlora* possui dispersores de sementes (formigas) que não se deslocam por longas distâncias (0,5 - 7 m; Lambert et al., 2006a; Fonseca et al., 2012). A ausência de fluxo gênico entre populações e os pequenos tamanhos populacionais, então, poderiam acarretar a perda de alelos através da endogamia e da deriva genética, explicando a baixa diversidade genética encontrada. Por outro lado, as baixas taxas de fluxo gênico e o isolamento das populações de *E. calochlora* em “ilhas de altitude” em meio à planície pantaneira poderiam acarretar em uma alta diferenciação entre as populações. Esse padrão já foi encontrado em outras espécies de plantas cujas populações ficam isoladas em áreas de alta altitude quando analisadas com marcadores do cpDNA, aloenzimas e/ou microssatélites nucleares (*Pitcairnia geyskesii* L.B. Sm. - Bromeliaceae, Sarthou et al., 2001; *Sedum lanceolatum* Torr. - Crassulaceae, DeChaine e Martin, 2005; *Alcantarea imperialis*

(Carrière) Harms e *A. geniculata* (Wawra) J.R. Grant - Bromeliaceae, Barbará et al., 2007; entre outros). A baixa divergência genética também pode ser um indicativo de origem e colonização recente das populações (ex., Lorenz-Lemke et al., 2010). Entretanto, mesmo usando marcadores com reconhecida variabilidade intraespecífica, não é possível afirmar com os dados obtidos até o momento se a baixa variabilidade genética encontrada em *E. calochlora* é inerente da espécie, devido à sua história evolutiva, ou a lentas taxas evolutivas destes marcadores no grupo estudado.

As sequências de *E. rhodotricha* permitiram uma maior resolução dos padrões filogeográficos, se comparadas as de *E. calochlora*. O resultado da AMOVA, indicando que 95,70% da variabilidade intraespecífica de *E. rhodotricha* está distribuída dentro das populações é inesperado para sequências de cpDNA. O resultado desta análise está possivelmente associado à proximidade das populações amostradas, que podem estar conectadas através de fluxo gênico. Durante o trabalho de campo foram vistos frutos de *E. rhodotricha* bicados por aves, um indício de que a dispersão das sementes desta espécie pode atingir longas distâncias. A ausência de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas apoia este resultado, uma vez que a dispersão das sementes a longas distâncias poderia contribuir para a conexão genética entre as populações (Frankham et al., 2008).

Entretanto, a população BR pode ser considerada diferenciada das demais. Quando esta população foi comparada com o grupo de todas as demais, foi verificado um valor muito alto de índice de fixação (Hartl e Clark, 1997; $\phi_{CT} = -0,46380$ ^{$p=0,11535$}), o que indica que estas populações devem ter estado isoladas por um período muito longo de tempo para alcançar o nível de divergência observado (Hartl, 2000). Além

disso, o mapa de distribuição dos haplótipos ([Fig. 2](#)) mostra que a população BR possui dois haplótipos exclusivos (Haplótipos 4 e 5), e não compartilha o Haplótipo 1, o mais frequente entre as demais. A imagem de satélite evidencia uma vasta área de terreno mais elevado (~ 350 m) e com vegetação densa (não chaquenha), conhecida como Serra da Bocaina, isolando a população BR das demais. Esta matriz desfavorável pode ter funcionado como uma barreira, diminuindo o fluxo gênico entre estas populações.

As sequências do marcador *trnS-trnG* também permitiram a identificação do posicionamento filogenético de *E. rhodotricha* no gênero *Echinopsis*. A árvore gerada neste estudo ([Fig. 3](#)) coloca *E. rhodotricha* como grupo irmão de todas as espécies do clado *Echinopsis*, exceto *E. bonnieae* e *E. famatimensis*. Uma das possíveis razões para *E. rhodotricha* não ter agrupado com nenhuma espécie em particular é a não inclusão de sequências de espécies de fora do clado *Echinopsis* (*Echinopsis* sensu lato), ou, simplesmente, porque as espécies mais proximamente relacionadas a *E. rhodotricha* não foram amostradas no estudo de Schlumpberger e Renner (2012).

O modelo da distribuição potencial atual de *E. calochlora* baseado em “grids” climáticos e de altitude para *E. calochlora* revelou alguns locais adicionais aos já amostrados na distribuição conhecida (Brasil e Bolívia), onde esta espécie poderia ocorrer (interior da Bolívia, sudoeste do estado de MS, e leste do Brasil; [Fig. 4](#)). Modelos de distribuição potencial, no entanto, mostram apenas as áreas onde as condições são favoráveis para a espécie, não significando necessariamente que ela irá ocorrer nestas áreas. Limitações de dispersão devido ao sistema reprodutivo e barreiras geográficas podem impedir que uma espécie ocupe outras áreas geográficas com condições semelhantes às do seu nicho realizado (Scheldeman e van Zonneveld,

2010). Além disso, “grids” de tipo de solo, um fator determinante para a ocorrência desta espécie (indicadora de solos com altos índices de ferro) não puderam ser incluídos nesta análise. A distribuição potencial de *E. rhodotricha*, no entanto, não divergiu da distribuição conhecida para a espécie, e mostra que as populações amostradas neste estudo estão no centro da região onde há uma maior probabilidade de ocorrência desta cactácea.

A comparação dos modelos de distribuição potencial atual com os projetados nas condições climáticas do UMG revela que, há cerca de 21 000 anos, as populações de *E. calochlora* e *E. rhodotricha* apresentavam uma abrangência reduzida. Se este padrão geral for extrapolado para os períodos glaciais mais antigos, é provável que as populações de *Echinopsis* do Pantanal tenham experimentado repetidos ciclos de expansão e retração de sua distribuição geográfica. Isto deve ter sido mais marcante em *E. rhodotricha*, uma vez que *E. calochlora* apresenta exigências de habitat especialmente relacionadas ao tipo de solo. *Echinopsis rhodotricha* mostrou distinção de linhagens intraespecíficas altamente diferenciadas, mesmo em populações separadas por poucos quilômetros. É possível afirmar, então, que a vegetação da Serra da Bocaina tem atuado como uma forte barreira ao fluxo gênico nas populações do Chaco brasileiro, mantendo-as isoladas mesmo durante os períodos glaciais mais frios e secos. Outro importante padrão evidenciado é que, apesar de ser uma espécie tipicamente chaquenha, *E. rhodotricha* não acompanharia a expansão da distribuição de florestas tropicais sazonalmente secas inferida por Whitney et al. (2011) durante o UMG, no arco pleistocênico proposto por Prado e Gibbs (1993).

Das populações de *E. calochlora* amostradas, as duas que contêm o Haplótipo 2 (VB e VT) estão situadas na Morraria de Santa Cruz ([Fig. 1](#), [Fig. 2](#)). Os indivíduos da população VT ([Tab. 1](#)), nos quais somente foi encontrado o Haplótipo 2, tinham sido removidos de seu habitat natural, para a extração de minério de ferro no local, e transferidos para o mesmo local onde ocorre a população nativa V3 ([Fig. 2](#), [Tab. 1](#)). Esta população possui exclusivamente o outro tipo de haplótipo encontrado. A literatura descreve que a ocorrência de fluxo gênico entre populações geneticamente diferentes pode quebrar possíveis adaptações locais (Antonovics, 1976; Simberloff, 1988), levando à extinção de variantes genéticas únicas presentes em pequenas populações (Ellstrand, 1992). No presente caso, este polimorfismo genético não reflete diferenças adaptativas locais uma vez que ambos os haplótipos encontrados em *E. calochlora* foram detectados na população VB. Dentre estas três populações, esta é a única que ainda não foi minerada e foi a maior população natural de *E. calochlora* observada em campo neste estudo, e, portanto, deve ser especialmente preservada.

Em *E. rhodotricha*, os haplótipos mais incomuns foram encontrados na população BR ([Fig. 2](#), [Tab. 1](#)). Esta população habita uma estreita faixa de Chaco arborizado com aproximadamente 1 km de extensão, contígua a uma rodovia, isolada das demais manchas de vegetação chaquenha por outros tipos vegetacionais. No entanto, esta interpenetração de diferentes formações vegetacionais, típica desta região transicional (Silva et al., 2008), não é o principal fator responsável pela fragmentação do habitat de *E. rhodotricha* no Chaco brasileiro. Os indivíduos da população SM, por exemplo ([Fig. 2](#), [Tab. 1](#)), habitam uma área de aproximadamente 1.000 m² circundada por pastagem cultivada. A principal atividade econômica da

região chaquenha em território brasileiro no Pantanal é a pecuária de corte, sendo que a vegetação nativa é altamente impactada pelo desmatamento para a formação de pastagens (Silva et al., 2008, 2011). A conservação destas áreas seria interessante não apenas para a manutenção da riqueza genética de *E. rhodotricha*, mas também de outras espécies de plantas que compartilham o mesmo habitat. Além disso, áreas transicionais são de grande importância em processos evolutivos, pois grande parte da variação adaptativa está concentrada nestas regiões (Smith et al., 2001). As savanas estépicas desta borda do Chaco agrupam espécies de distribuição única no Brasil, e até mesmo endêmicas, como o outro cacto *Cleistocactus baumannii* ssp. *horstii* (P.J. Braun) N.P. Taylor (Eggli, 2002). Esta região, assim como grande parte do Pantanal, não possui Unidades de Conservação que preservem a sua biodiversidade (Silva et al., 2008).

Este estudo fornece os primeiros indícios sobre a distribuição da variabilidade genética em *E. calochlora* que auxiliarão nas decisões para a restauração dos indivíduos resgatados de áreas mineradas, e, futuramente, irão subsidiar a criação de Unidades de Conservação que incluam esta espécie ameaçada dentro do Plano de Ação Nacional para Conservação das Cactáceas (ICMBio, 2011). Da mesma forma, os dados filogeográficos obtidos para *E. rhodotricha* podem subsidiar a escolha de áreas de Chaco brasileiro que conservem a maior parte da riqueza genética desta espécie, quando uma Unidade de Conservação for criada para ecossistema.

LITERATURA CITADA

- ALMEIDA, F.F.M. 1959. Traços gerais da geomorfologia do Centro Oeste brasileiro. In F. M. Almeida, e M. A. Lima [eds.], Planalto Centro-Occidental e Pantanal Matogrossense: Guia da Excursão nº 1, realizada por ocasião do 18º Congresso Internacional de Geografia, 7–65. Conselho Nacional de Geografia, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- ALONSO-PEDANO, M., e P. ORTEGA-BAES. 2012. Generalized and complementary pollination system in the Andean cactus *Echinopsis schickendantzii*. *Plant Systematics and Evolution* 298: 1671–1677.
- ANDERSON, E.F. 2001. The cactus family. 777 p. Timber Press, Portland, Oregon, EUA.
- ANJOS, C.E., e R. OKIDA. 2000. Geologia. In J. S. V. S. Silva [ed.], Zoneamento Ambiental da Borda Oeste do Pantanal: Maciço do Urucum e Adjacências, 211 p. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- ANTONOVICS, J. 1976. The nature of limits to natural selection. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 63: 224–247.
- BARBARÁ, T., G. MARTINELLI, M.F. FAY, S.J. MAYO, e C. LEXER. 2007. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude “inselbergs”, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Molecular Ecology* 16: 1981–1992.
- BYRNE, M., e M. HANKINSON. 2012. Testing the variability of chloroplast sequences for plant phylogeography. *Australian Journal of Botany* 60: 569–574.
- CHAVES, L.J., R. VENCovsky, R.S.M. SILVA, M.P. CAMPOS TELLES, M.I. ZUCCHI, e A.S.G. COELHO. 2010. Estimating inbreeding depression in natural plant populations using quantitative and molecular data. *Conservation Genetics* 12: 569–576.
- CLARK-TAPIA, R., C. ALFONSO-CORRADO, L.E. EGUIARTE, e F. MOLINA-FREANER. 2005. Clonal diversity and distribution in *Stenocereus eruca* (Cactaceae), a narrow endemic cactus of the Sonoran Desert. *American Journal of Botany* 92: 272–278.
- CLIFF, A.D., e J.K. ORD. 1973. Spatial autocorrelation. 178 p. Pion Press, Londres, Greater London, Reino Unido.
- DECHAINE, E.G., e A.P. MARTIN. 2005. Marked genetic divergence among sky island populations of *Sedum lanceolatum* (Crassulaceae) in the Rocky Mountains. *American Journal of Botany* 92: 477–486.
- DING, G., D. ZHANG, Y. YU, L. ZHAO, e B. ZHANG. 2012. Phylogenetic relationship among related genera of Plumbaginaceae and preliminary genetic diversity of *Limonium sinense* in China. *Gene* 506:400–403.

- DUNN, I.S., E F.R. BLATTNER. 1986. Sharons 36 to 40: Multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Research* 15: 2677–2698.
- EGGLI, U. 2002. Synopsis of the Cactaceae of Mato Grosso, Brazil. *Haseltonia* 9: 146–166.
- ELLSTRAND, N.C. 1992. Gene flow by pollen: implications for Plant Conservation Genetics. *Oikos* 63: 77–86.
- EXCOFFIER, L., P.E. SMOUSE, E J.M. QUATTRO. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- EXCOFFIER, L., E H.E.L. LISCHER. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.
- FAEGRI, K., E L. VAN DER PIJL. 1979. The principles of Pollination Ecology. 3^a ed., 244 p. Pergamon Press, Oxford, Oxfordshire, Reino Unido.
- FEHRMANN, S., C.T. PHILBRICK, E R. HALLIBURTON. 2012. Intraspecific variation in *Podostemum ceratophyllum* (Podostemaceae): evidence of refugia and colonization since the last glacial maximum. *American Journal of Botany* 99: 145–151.
- FONSECA, R.B.S., L.S. FUNCH, E E.L. BORBA. 2012. Dispersão de sementes de *Melocactus glaucescens* e *M. paucispinus* (Cactaceae), no Município de Morro do Chapéu, Chapada Diamantina - BA. *Acta Botanica Brasilica* 26: 481–492.
- FRANCO, M.S.M., E R. PINHEIRO. 1982. Geomorfologia. In Projeto RADAMBRASIL. Folha SE.21 Corumbá, 161–224. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- FRANKHAM, R., J.D. BALLOU, E D.A. BRISCOE. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação. 280 p. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
- FU, Y.X. 1996. New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics* 143: 557–570.
- GARCIA, J.S. 2008. Anatomia do caule e raiz, e estrutura do xilema secundário de duas espécies de *Discocactus* Pfeiff. e duas de *Echinopsis* Zucc. (Trichocereae, Cactaceae) ocorrentes em Mato Grosso do Sul. Dissertação de mestrado, UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.
- GELETA, M., E T. BRYNGELSSON. 2012. Population genetic analysis of *Lobelia rhynchopetalum* Hemsl. (Campanulaceae) using DNA sequences from ITS and eight chloroplast DNA regions. *Scientific World Journal* 2012: 1–10.

- HAMILTON, M.B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* 8: 513–525.
- HARTL, D.L., E A.G. CLARK. 1997. Principles of Population Genetics. 3^a ed., 543 p. A. D. Sinauer [ed.], Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, EUA.
- HARTL, D.L. 2000. A Primer of Population Genetics. 3^a ed., 221 p. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, EUA.
- HIJMANS, R.J., L. GUARINO, M. CRUZ, E E. ROJAS. 2001. Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. *Plant Genetic Resources Newsletter* 127: 15–19.
- HIJMANS, R.J., S.E. CAMERON, J.L. PARRA, P.G. JONES, E A. JARVIS. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965–1978.
- HUECK, K. 1955. Bosques chaquenhos e extração de tanino no Brasil. *Revista Brasileira de Geografia* 17: 343–346.
- IBGE. 1992. Manual Técnico da Vegetação Brasileira - Série Manuais Técnicos em Geociências N^o 1.91 p. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- ICMBio. 2011. Plano de ação nacional para a conservação das Cactáceas (Série Espécies Ameaçadas, 24). 112 p. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- JUNK, W.J., C.N. CUNHA, K.M. WANTZEN, P. PETERMANN, C. STRÜSSMANN, M.I. MARQUES E J. ADIS. 2006. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Aquatic Sciences* 68: 278–309.
- LAMBERT, S.M., E.L. BORBA, E M.C. MACHADO. 2006a. Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus* x *albicephalus* (*Melocactus ernestii* x *M. glaucescens*) in north-eastern Brazil. *Plant Species Biology* 21: 93–108.
- LAMBERT, S.M., E.L. BORBA, M.C. MACHADO, E S.C.S. ANDRADE. 2006b. Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-eastern Brazil. *Annals of Botany* 97: 389–403.
- LIBRADO, P., E J. ROZAS. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.

- LIU, J., P. SUN, X. ZHENG, D. POTTER, K. LI, C. HU E Y. TENG. 2013. Genetic structure and phylogeography of *Pyrus pashia* L. (Rosaceae) in Yunnan Province, China, revealed by chloroplast DNA analyses. *Tree Genetics & Genomes* 9: 433–441.
- LORENZ-LEMKE, A.P., P.D. TOGNI, G. MÄDER, R.A. KRIEDT, J.R. STEHMANN, F.M. SALZANO, S.L. BONATTO, E L.B FREITAS. 2010. Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South American highlands: a phylogeographic perspective on native *Petunia* (Solanaceae). *Molecular Ecology* 19: 5240–5251.
- MAKI, M. 2001. Genetic differentiation within and among island populations of the endangered plant *Aster miyagii* (Asteraceae), an endemic to the Ryukyu Islands. *American Journal of Botany* 88: 2189–2194.
- MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209–220.
- MILLER, M.P. 2005. Alleles in space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722–724.
- MMA. 1999. Ações Prioritárias para Conservação da Biodiversidade do Cerrado e do Pantanal. Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- MMA. 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção - Instrução Normativa N° 06, de 23 de setembro de 2008. Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- MORELLO, J. 1967. Bases para el estudio fitoecológico de los grandes espacios (el Chaco argentino). *Ciencia e Investigacion* 23: 252–267.
- NASSAR, J.M., J.L. HAMRICK, E T.H. FLEMING. 2001. Genetic variation and population structure of the mixed-mating cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactaceae). *Heredity* 87: 69–79.
- NEVES, D., E G. DAMASCENO-JUNIOR. 2011. Post-fire phenology in a campo sujo vegetation in the Urucum plateau, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 71: 881–888.
- ORTEGA-BAES, P., M. SARAVIA, S. SÜHRING, H. GODÍNEZ-ÁLVAREZ, E M. ZAMAR. 2011. Reproductive biology of *Echinopsis terscheckii* (Cactaceae): the role of nocturnal and diurnal pollinators. *Plant Biology* 13: 33–40.
- OSSA, C.G., E R. MEDEL. 2011. Notes on the floral biology and pollination syndrome of *Echinopsis chiloensis* (Colla) Friedrich & GD Rowley (Cactaceae) in a population of semiarid Chile. *Gayana Botánica* 68: 213–219.
- PATERSON, I.D., D.A. DOWNIE, E M.P. HILL. 2009. Using molecular methods to determine the origin of weed populations of *Pereskia aculeata* in South Africa and its relevance to biological control. *Biological Control* 48: 84–91.

- PENNINGTON, R.T., D.E. PRADO, E C.A. PENDRY. 2000. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography* 27: 261–273.
- PENNINGTON, R.T., M. LAVIN, D.E. PRADO, C.A. PENDRY, S.K. PELL, E C.A. BUTTERWORTH. 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, Biological Sciences* 359: 515–537.
- PHILLIPS, S.J., R.P. ANDERSON, E R.E. SCHAPIRE. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231–259.
- POTT, A., J.S.V.S. SILVA, S.S. SALIS, V.J. POTT, E M.P. SILVA. 2000. Vegetação e Uso da Terra. In J. S. V. S. Silva [ed.], Zoneamento Ambiental da Borda Oeste do Pantanal: Maciço do Urucum e Adjacências. 211 p. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- POTT, A., V.J. POTT, E G.A. DAMASCENO-JUNIOR. 2009. Fitogeografia do Pantanal. In III CLAE e IX CEB, 1–4. São Lourenço, Minas Gerais, Brasil.
- PRADO, D.E., P.E. GIBBS, A. POTT, E V.J. POTT. 1992. The Chaco-Pantanal transition in southern Mato Grosso, Brazil. In P. A. Furley, J. Proctor, e J. A. Ratter [eds.], Nature and Dynamics of Forest-Savanna Boundaries, 451–470. Chapman & Hall, Londres, Greater London, Reino Unido.
- PRADO, D.E. 1993. What is the Gran Chaco vegetation in South America? 1. A review. Contribution to the study of flora and vegetation of the Chaco. V. *Candollea* 48: 145–172.
- PRADO, D.E., E P.E. GIBBS. 1993. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 902–927.
- RIVEROS, F. 2002. The Gran Chaco. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Website: <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Bulletin/Granchaco.htm> [Acessado em 13 de setembro de 2012].
- ROY, A., N. FRASCARIA, J. MACKAY, E J. BOUSQUET. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 173–180.
- SANG, T., D. CRAWFORD, E T. STUESSY. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84: 1120–1136.
- SARTHOU, C., S. SAMADI, E M.-C. BOISSELIER-DUBAYLE. 2001. Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. *American Journal of Botany* 88: 861–868.

- SCHEDEMAN, X., E M. VAN ZONNEVELD. 2010. Training Manual on Spatial Analysis of Plant Diversity and Distribution. 179 p. Bioversity International, Roma, Roma, Itália.
- SCHLUMBERGER, B.O., E S.S. RENNER. 2012. Molecular phylogenetics of *Echinopsis* (Cactaceae): Polyphyly at all levels and convergent evolution of pollination modes and growth forms. *American Journal of Botany* 99: 1335–1349.
- SHAW, J., E.B. LICKY, J.T. BECK, S.B. FARMER, W. LIU, J. MILLER, K.C. SIRIPUN ET AL. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142–166.
- SILVA, M.P., R.A. MAURO, M. ABDON, E J.S. V SILVA. 2008. Estado de conservação do Chaco (Savana Estépica) brasileiro. In IX Simpósio Nacional Cerrado e II Simpósio Internacional Savanas Tropicais, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- SILVA, J.S. V, A. POTT, M.M. ABDON, V.J. POTT, E K.R. SANTOS. 2011. Projeto GeoMS: cobertura vegetal e uso da terra do Estado de Mato Grosso do Sul. 1ª ed., 64 p. Embrapa Informação Agropecuária, Campinas, São Paulo, Brasil.
- SIMBERLOFF, D. 1988. The contribution of population and community biology to conservation science. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19: 473–511.
- SMITH, T.B., S. KARK, C.J. SCHNEIDER, R.K. WAYNE, E C. MORITZ. 2001. Biodiversity hotspots and beyond: the need for preserving environmental transitions. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 431–432.
- SOKAL, R.R., E N.L. ODEN. 1978a. Spatial autocorrelation in biology: 1. Methodology. *Biological Journal of the Linnean Society* 10: 199–228.
- SOKAL, R.R., E N.L. ODEN. 1978b. Spatial autocorrelation in biology 2. Some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest. *Biological Journal of the Linnean Society* 10: 229–249.
- STAMATAKIS, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- TAJIMA, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.
- TNAH, L.H., S.L. LEE, K.K.S. NG, C.T. LEE, S. BHASSU, E R.Y. OTHMAN. 2013. Phylogeographical pattern and evolutionary history of an important Peninsular Malaysian timber species, *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae). *Journal of Heredity* 104: 115–126.
- TOMAS, W.M., I.H. ISHII, C. STRUSSMANN, A.P. NUNES, S.M. SALIS, Z. CAMPOS, V.L. FERREIRA ET AL. 2010. Borda oeste do Pantanal e Maciço do Urucum em Corumbá, MS: área prioritária para conservação da biodiversidade. In 5º Simpósio sobre Recursos Naturais e Socioeconômicos do Pantanal. Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil.

WHITNEY, B.S., F.E. MAYLE, S.W. PUNYASENA, K.A. FITZPATRICK, M.J. BURN, R. GUILLEN, E. CHAVEZ ET AL. 2011. A 45kyr palaeoclimate record from the lowland interior of tropical South America. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 307: 177–192.

Tabela 1. Populações de *Echinopsis calochlora* e *E. rhodotricha* amostradas na borda oeste do Pantanal e em manchas de Chaco arborizado no município de Porto Murtinho-MS, respectivamente. As localizações precisas foram retidas por questões de conservação.

Código	Localidade	Procedência	Coord. Geográficas	Alt. (m)	N
<i>E. calochlora</i>					
J	Morro do Jacadigo	natural	19° 13' S 57° 50' W	636	23
MD	MMX, Morro São Domingos	natural	19° 11' S 57° 37' W	419	30
V3	Vale MCR, Mina 03	natural	19° 11' S 57° 34' W	905	4
VAL	Vale Urucum, Área da Antena Leste	viveiro	19° 11' S 57° 36' W	628	6
VB	Vale MCR, Morro Bonito	natural	19° 12' S 57° 35' W	1022	30
VE	Vale MCR, Morro Encanto	natural	19° 13' S 57° 36' W	945	30
VM	Vale Urucum, Área do Mirante	natural	19° 11' S 57° 36' W	920	15
VP	Vale Urucum, Área do Piscinão	natural	19° 11' S 57° 36' W	976	1
VT	Vale MCR, Mina Tamanduá	reintroduzida na Mina 03	19° 13' S 57° 34' W	925	30
				Total:	169
<i>E. rhodotricha</i>					
BR	Rodovia	natural	21° 44' S 57° 30' W	137	20
P1	Fazenda Patolá, Área 1	natural	21° 41' S 57° 43' W	97	23
P2	Fazenda Patolá, Área 2	natural	21° 41' S 57° 42' W	96	30
P3	Fazenda Patolá Área 3	natural	21° 41' S 57° 42' W	92	27
RC1	Fazenda Retiro Conceição, Área 1	natural	21° 40' S 57° 46' W	90	30
RC2	Fazenda Retiro Conceição, Área 2	natural	21° 40' S 57° 46' W	88	27
RC3	Fazenda Retiro Conceição, Área 3	natural	21° 41' S 57° 45' W	90	28
SM	Fazenda São Manoel	natural	21° 47' S 57° 39' W	117	6
				Total:	191

Tabela 2. Dados das sequências obtidas de *Echinopsis calochlora* e *E. rhodotricha*.

	Marcadores			
	<i>psbA-trnH</i>		<i>trnS-trnG</i>	
	<i>E. calochlora</i>	<i>E. rhodotricha</i>	<i>E. calochlora</i>	<i>E. rhodotricha</i>
Tamanho do alinhamento	300	306	965	962
Tamanho das sequências	210-300	125-306	503-965	245-962
% CG	20,96	20,56	35,27	35,69
Nº indivíduos sequenciados	11	11	14	38
Nº populações analisadas	7/9	8/8	8/9	8/8
Nº sítios variáveis	0	0	1	3
Nº substituições	0	0	1	1
Transições (sítio)	0	0	0	0
Transversões (sítio)	0	0	1 (#519)	1 (#768)
Nº “indels” (sítio)	0	0	0	2 (#630, #636)
Nº haplótipos	0	0	2	5
Diversidade nucleotídica (π)	-	-	0,000274	0,000797
(+/- desvio padrão)	-	-	(+/- 0,00036)	(+/- 0,00067)
Diversidade haplotípica (h)	-	-	0,2637	0,6302
(+/- desvio padrão)	-	-	(+/- 0,1360)	(+/- 0,0475)

Apêndice 1. SEQUÊNCIAS DE *trns-trnG* UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA. Sequências do espaçador intergênico cloroplasmático *trnS-trnG* publicadas por Schlumpberger e Renner (2012) utilizadas na análise de máxima verossimilhança deste estudo.

Espécie	Origem	Nº GenBank
<i>Echinopsis atacamensis</i> ssp. <i>pasacana</i> (F.A.C.Weber) G.Navarro [BOS518]	Catamarca, Argentina	JQ779486
<i>Echinopsis atacamensis</i> ssp. <i>pasacana</i> (F.A.C.Weber) G.Navarro [BOS593]	Tucumán, Argentina	JQ779487
<i>Echinopsis aurea</i> Britton & Rose [BOS309]	Córdoba, Argentina	JQ779472
<i>Echinopsis aurea</i> Britton & Rose [BOS313]	Córdoba, Argentina	JQ779471
<i>Echinopsis aurea</i> Britton & Rose [BOSx29]	San Luís, Argentina	JQ779475
<i>Echinopsis aurea</i> ssp. <i>fallax</i> (Oehme) M.Lowry	La Rioja, Argentina	JQ779474
<i>Echinopsis aurea</i> ssp. <i>shaferi</i> (Britton & Rose) M.Lowry	Catamarca, Argentina	JQ779473
<i>Echinopsis aurea</i> var. <i>callochrysea</i> (F.Ritter) J.Ullmann	Salta, Argentina	JQ779476
<i>Echinopsis bonnieae</i> (Halda, Hogan & Janeba) Halda & Malina	Catamarca, Argentina	JQ779502
<i>Echinopsis breviflora</i> (Backeb.) M.Lowry (= <i>Lobivia sanguiniflora</i> var. <i>breviflora</i> (Backeb.) Rausch)	Salta, Argentina	JQ779469
<i>Echinopsis calochlora</i> K.Schum.	Sudoeste do Brasil, leste da Bolívia	JQ779485
<i>Echinopsis chiloensis</i> (Colla) H.Friedrich & G.D.Rowley	Chile	JQ779489
<i>Echinopsis chrysantha</i> Werderm.	Salta, Argentina	JQ779470
<i>Echinopsis densispina</i> Werderm.	Salta, Argentina	JQ779482
<i>Echinopsis famatimensis</i> (Speg.) Werderm.	La Rioja, San Juan, Argentina	JQ779501
<i>Echinopsis haematantha</i> (Speg.) D.R.Hunt [BOS175]	Salta, Argentina	JQ779480
<i>Echinopsis haematantha</i> (Speg.) D.R.Hunt [BOS493]	Salta, Argentina	JQ779481
<i>Echinopsis jajoiana</i> (Backeb.) Blossf. [BOSx79]	Jujuy, Argentina	JQ779468
<i>Echinopsis jajoiana</i> (Backeb.) Blossf. [BOSx88]	Jujuy, Argentina	JQ779467
<i>Echinopsis marsoneri</i> Werderm.	Jujuy, Argentina	JQ779466
<i>Echinopsis oxygona</i> (Link) Zucc. ex Pfeiff. & Otto [BOSx01]	Rio Grande do Sul, Brasil	JQ779483
<i>Echinopsis oxygona</i> (Link) Zucc. ex Pfeiff. & Otto [BOSx06]	Rio Grande do Sul, Brasil	JQ779484
<i>Echinopsis terscheckii</i> (Parmentier ex Pfeiff.) H.Friedrich & G.D.Rowley	La Rioja, Argentina	JQ779488
<i>Echinopsis tubiflora</i> (Pfeiff.) Zucc. ex K.Schum. [BOS106]	Tucumán, Argentina	JQ779479
<i>Echinopsis tubiflora</i> (Pfeiff.) Zucc. ex K.Schum. [BOS386]	Salta, Argentina	JQ779477
<i>Echinopsis tubiflora</i> (Pfeiff.) Zucc. ex K.Schum. [BOS387]	Salta, Argentina	JQ779478
<i>Lasiocereus fulvus</i> F.Ritter	Amazonas, Peru	JQ779525

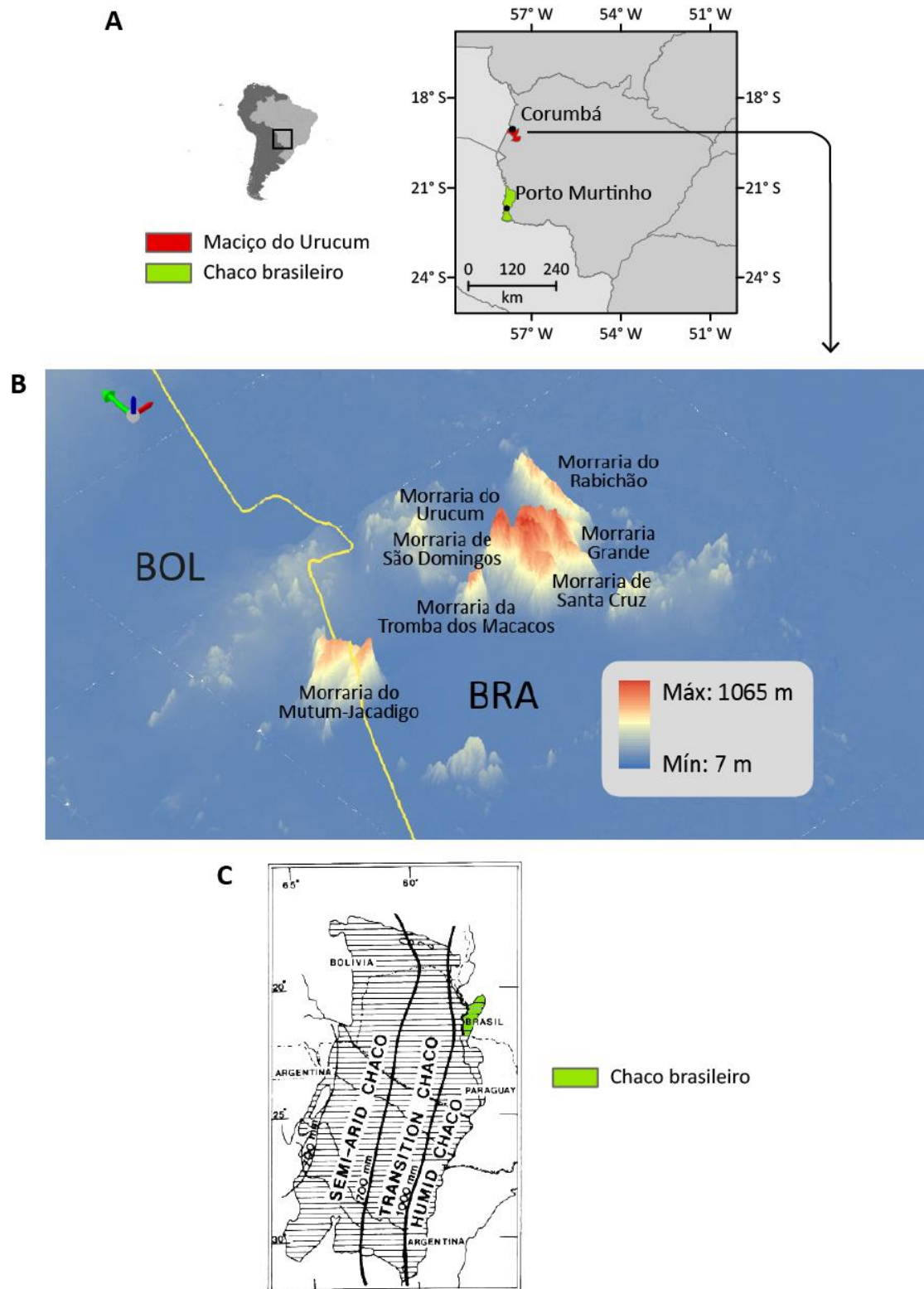


Figura 1. **A.** Localização do Maciço do Urucum e Morraria do Mutum-Jacadigo e da porção brasileira do Chaco no estado de Mato Grosso do Sul. **B.** Morrarias que compõem o Maciço do Urucum e Morraria do Mutum-Jacadigo (adaptado de Franco e Pinheiro, 1982). BOL = Bolívia, BRA = Brasil **C.** Localização do Chaco brasileiro dentro do “Gran Chaco” (reproduzido e adaptado de Riveros, 2002).

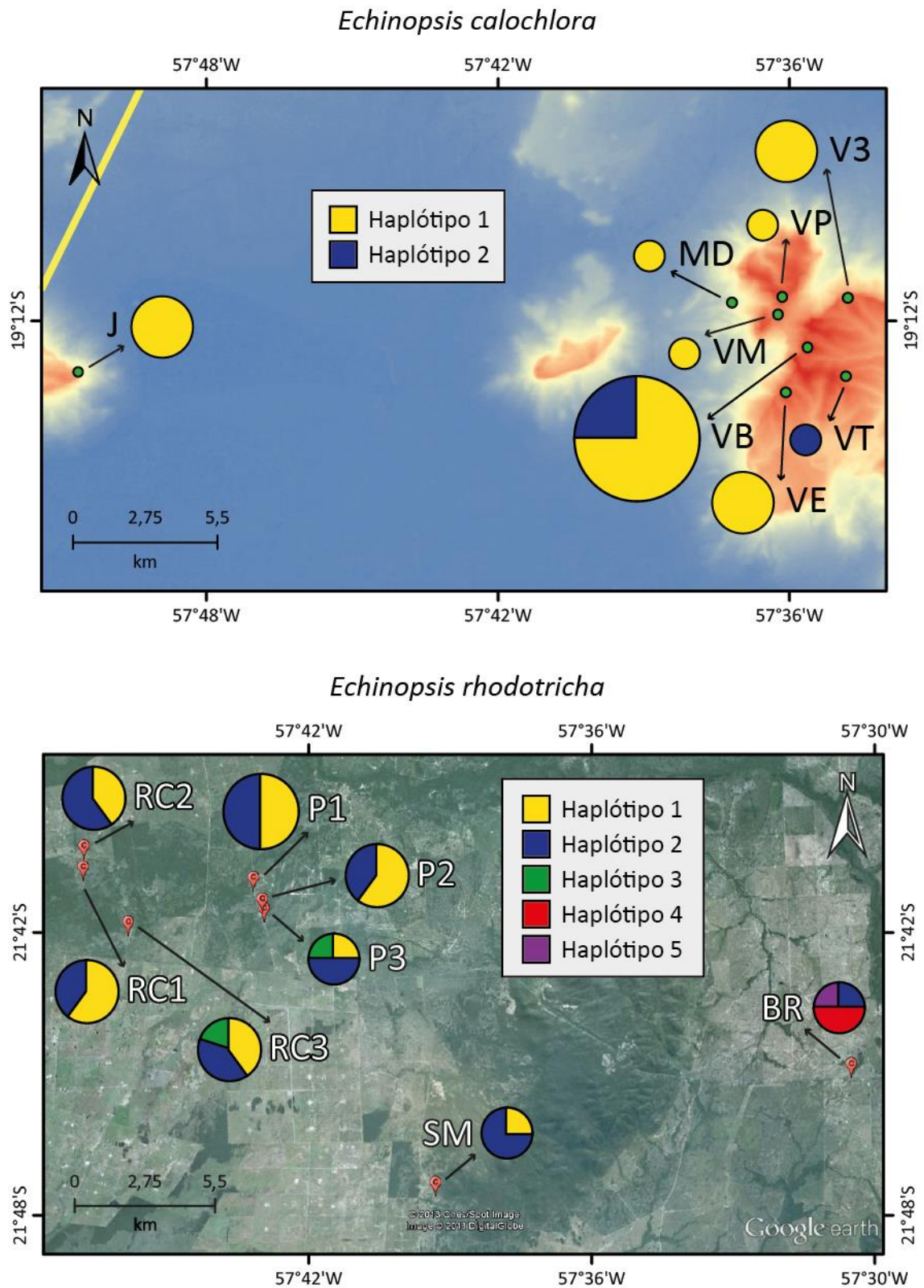


Figura 2. Distribuição dos haplótipos da região do cpDNA *trnS-trnG*, encontrados em oito populações de *Echinopsis calochlora*, e oito de *E. rhodotricha*. Nota: Os códigos das populações correspondem aos da [Tab. 1](#), e o tamanho dos gráficos é proporcional ao número de indivíduos amostrados por população.

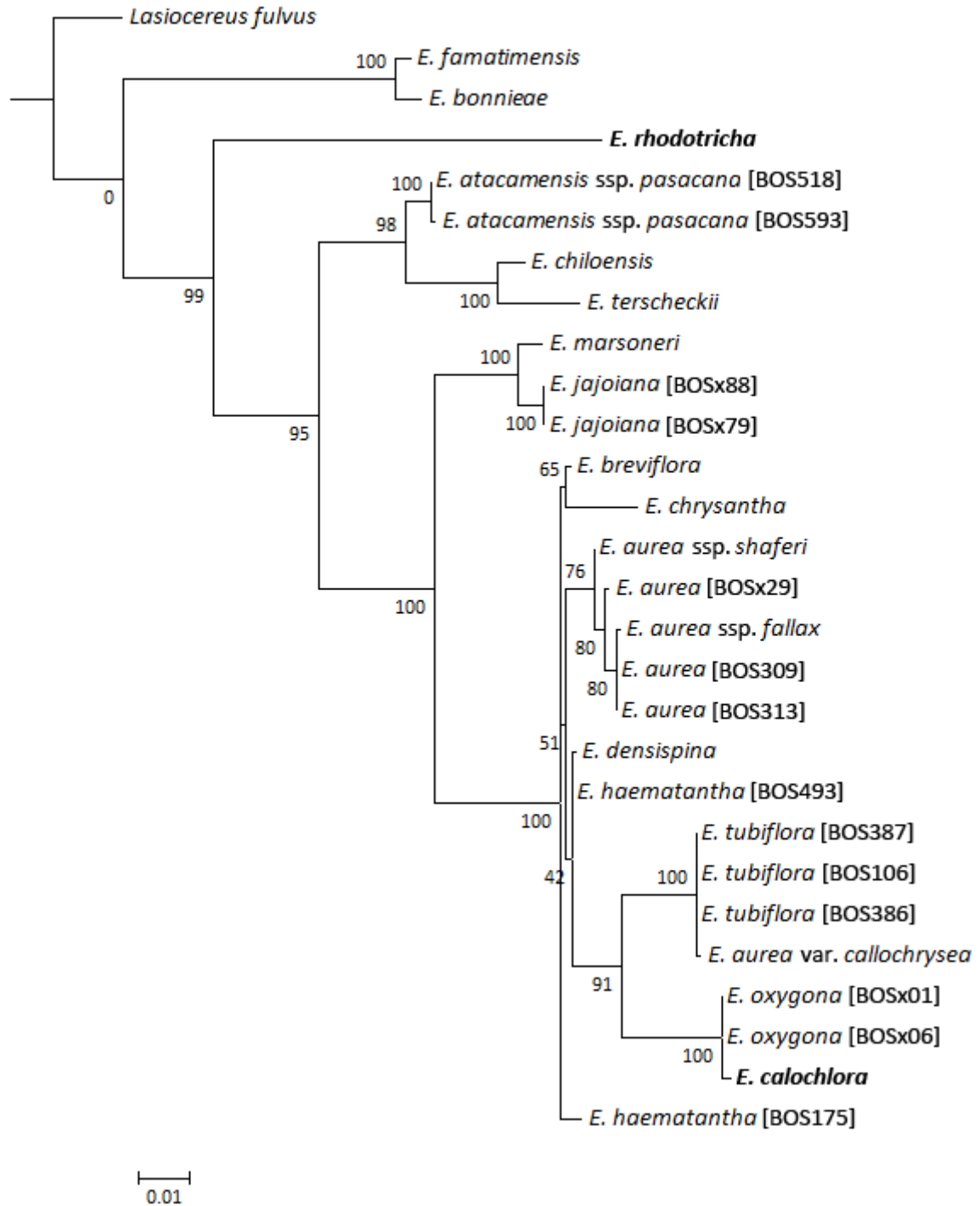
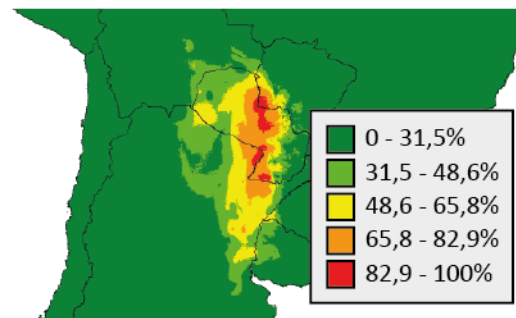
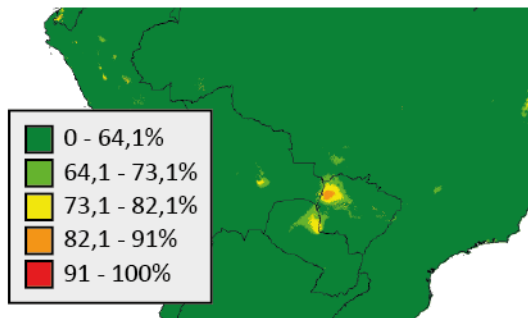


Figura 3. Árvore de máxima verossimilhança construída através da análise de sequências do espaçador intergênico cloroplasmático *trnS-trnG* pelo programa *RAXML*. A sequência de *Echinopsis rhodotricha* foi obtida neste trabalho e comparada com as demais espécies analisadas no estudo de Schlumpberger e Renner (2012). Nota: Os códigos entre colchetes representam o número de coletor da fonte de DNA utilizada, em espécies que se repetem.

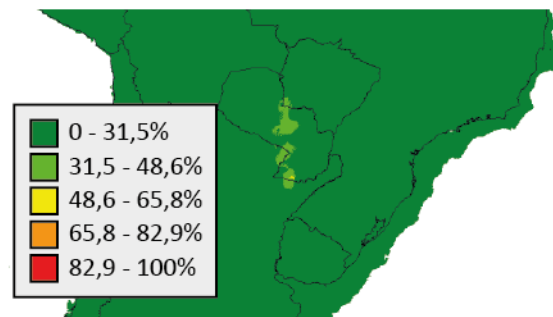
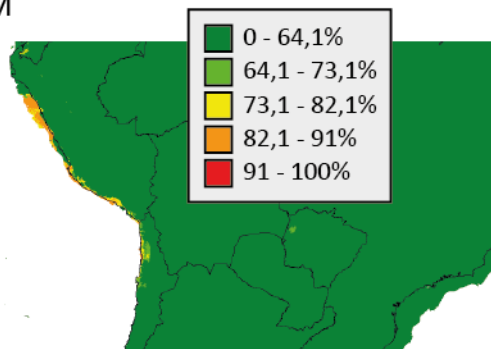
UMG

*Echinopsis calochlora**Echinopsis rhodotricha*

Presente



CCSM



MIROC

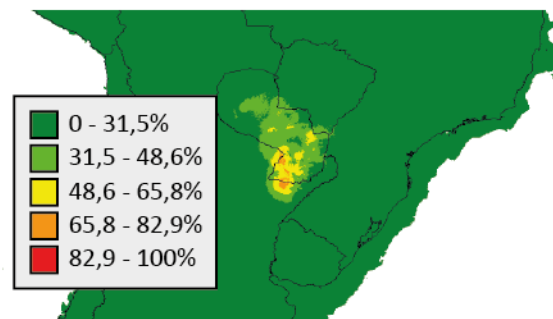
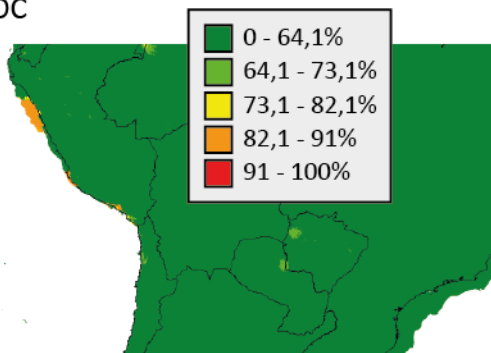


Figura 4. Modelo da distribuição potencial atual e passada (durante o Último Máximo Glacial – 21 000 anos) estimada para *Echinopsis calochlora* e *E. rhodotricha*, conforme os cenários climáticos CCSM e MIROC. Nota: Os valores na legenda representam a probabilidade de ocorrência da espécie em cada célula.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a baixa variabilidade dos marcadores utilizados em *E. calochlora* tenha impedido a realização de análises mais aprofundadas, foi possível observar que essa espécie possui níveis de diversidade genética substancialmente menores que os de *E. rhodotricha*. Ausência de fluxo gênico e pequenos tamanhos populacionais parecem ser boas explicações para esse resultado, uma vez que características da ecologia desta espécie levam à confirmação destas hipóteses, e diferem muito das observadas em *E. rhodotricha*.

Echinopsis rhodotricha, no entanto, apresentou uma diversidade genética substancial, considerando a extensão da distribuição geográfica amostrada. A ausência de estruturação genética encontrada entre a maioria das populações e a observação de frutos bicados por aves são indícios de que essas populações possivelmente estão conectadas pelo fluxo gênico, exceto uma população que apresentou dois haplótipos exclusivos e parece ter se mantido isolada das demais mesmo durante os períodos glaciais mais intensos, através da Serra da Bocaina. Estes resultados mostram que, mesmo num dos extremos da distribuição geográfica de *E. rhodotricha*, há presença de linhagens altamente diferenciadas que, muito provavelmente, são únicas em toda a sua distribuição. Desta forma, a preservação dos fragmentos brasileiros de Chaco arborizado é interessante não só para a conservação das populações de *E. rhodotricha* locais, mas de toda a espécie.

Os resultados deste trabalho são os primeiros dados sobre a filogeografia e história evolutiva de *E. calochlora* e *E. rhodotricha*, espécies típicas de formações

vegetacionais onde inexistem informações sobre estes aspectos para qualquer planta, no Brasil. Com o refinamento da amostragem, nossos resultados poderão, com maior propriedade, auxiliar nas decisões para o manejo de populações de *E. calochlora* resgatadas das áreas mineradas no Maciço do Urucum, além de, futuramente, subsidiar a criação de Unidades de Conservação que incluam *E. calochlora*, no Maciço do Urucum, e *E. rhodotricha*, no Chaco brasileiro, dois ambientes que, ultimamente, vem sofrendo constante pressão antrópica.

As perspectivas para a conclusão deste estudo são: aumentar o número de plantas sequenciadas; investigar se existem populações da subespécie *glatzleana* P.J. Braun & Esteves de *E. calochlora* na Serra da Bodoquena (MS); e avaliar marcadores genéticos com taxas evolutivas mais rápidas, como regiões de microssatélites do genoma nuclear (os quais já estão sendo desenvolvidos para *E. rhodotricha*).