



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia

CECILIA FONSECA FIORINI

FILOGEOGRAFIA PLASTIDIAL DE
Mandirola hirsuta (GESNERIACEAE)

CHLOROPLAST PHYLOGEOGRAPHY OF
Mandirola hirsuta (GESNERIACEAE)

CAMPINAS

2015

CECILIA FONSECA FIORINI

FILOGEOGRAFIA PLASTIDIAL DE
Mandirola hirsuta (GESNERIACEAE)

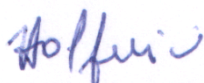
CHLOROPLAST PHYLOGEOGRAPHY OF
Mandirola hirsuta (GESNERIACEAE)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Dissertation presented to the Institute of Biology of the State University of Campinas as part of the requirements for obtaining Master's degree in Genetics and Molecular Biology, in the area of Animal Genetics and Evolution.

Orientadora: PROFA. DRA. VERA NISAKA SOLFERINI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA CECILIA FONSECA FIORINI, E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. VERA NISAKASOLFERINI



CAMPINAS

2015

Agência: FAPESP

nº do Proc.: 2012/02526-7, Vera Nisaka Solferini

Agência: FAPESP

nº do Proc.: 2011/20269-9, Andrea Onofre de Araujo

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F513f Fiorini, Cecilia Fonseca, 1989-
Filogeografia plastidial de *Mandirola hirsuta* (Gesneriaceae) / Cecilia Fonseca Fiorini. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Vera Nisaka Solferini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Filogeografia. 2. Cerrados. 3. Estruturação genética. 4. Lamiales. 5. Gesneriaceae. I. Solferini, Vera Nisaka, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Chloroplast phylogeography of *Mandirola hirsuta* (Gesneriaceae)

Palavras-chave em inglês:

Phylogeography

Cerrados

Genetic structure

Lamiales

Gesneriaceae

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Vera Nisaka Solferini [Orientador]

Maria Tereza Chiarioni Thomé

Maria Imaculada Zucchi

Data de defesa: 07-07-2015

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Comissão Julgadora

Campinas, 7 de julho de 2015

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini



Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi



Dra. Maria Tereza Chiarioni Thomé



Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

Prof. Dr. Fernando Faria Franco

A Aaron Swartz

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Bernadete e Gianfranco, pela amabilidade e dedicação;

Às minhas irmãs, Helena e Laura, pela enorme amizade e afeição;

À minha orientadora, Vera Solferini, pela oportunidade;

Ao Eduardo Borba e à Andrea Araujo, pela valiosa e imensurável colaboração;

À Célia Bresil, por toda a ajuda e bom humor nas atividades de laboratório;

Ao Márcio José da Silva, pelo esmerado auxílio com a obtenção das sequências;

À Maria de Lourdes Fagundes, por ter sido uma secretária tão maravilhosa;

Ao Kevin, pelo carinho e companheirismo;

A todos aqueles que foram meus professores, pelos ensinamentos e incentivos;

Aos músicos, compositores e interpretes, por me alegrarem e inspirarem;

À minha tia Cibele e a minha prima Tabatha, pela afeição;

Aos meus amigos, em especial à Lorena, ao Elder, à Naíla, ao Germano, à Basak,
à Natália, à Marília, ao Lars e à Cécile, pelas boas conversas;

Aos meus queridos colegas de laboratório, pela boa companhia e pelas boas idéias;

À Sandra, à Regina e à Ray, pelo afetuoso acolhimento em Campinas;

Aos meus saudosos colegas do coral "Zíper na Boca", pelos bons momentos e

À Fapesp, ao CNPq e à Capes, pelo financiamento.

A eles e a todos que colaboraram com a conclusão desse trabalho,
meus sinceros e calorosos agradecimentos!

Solidão

Imensas noites de inverno,
com frias montanhas mudas,
e o mar negro, mais eterno,
mais terrível, mais profundo.

Este rugido das águas
é uma tristeza sem forma:
sobe rochas, desce fráguas,
vem para o mundo, e retorna...

E a névoa desmancha os astros,
e o vento gira as areias:
nem pelo chão ficam rastros
nem, pelo silêncio, estrelas.

A noite fecha seus lábios
- terra e céu - guardado nome.
E os seus longos sonhos sábios
geram a vida dos homens.

Geram os olhos incertos,
por onde descem os rios
que andam nos campos abertos
da claridade do dia.

Cecília Meireles

In Viagem, 1939

Resumo

Há evidências de que a área ocupada por florestas tropicais na América do Sul foi mais ampla e contínua, tendo sido reduzida a partir do Mioceno com a formação da diagonal seca, constituída por Caatinga, Cerrado e Chaco. O Cerrado caracteriza-se por ser um mosaico fitofisionômico que, além das savanas, abrange também formações úmidas. É possível que as formações úmidas do Cerrado contenham remanescentes da vegetação que havia antes do surgimento das fitofissionomias savânicas; alternativamente, essas formações podem ter sido colonizadas por linhagens provenientes das florestas úmidas. O objetivo deste trabalho foi testar as hipóteses de “fragmentação ancestral” e de “colonização recente” para compreender os processos que resultaram na distribuição atual de espécies de formações úmidas do Cerrado. Populações de *Mandirola hirsuta* (Gesneriaceae) foram amostradas em 25 locais contemplando toda sua distribuição geográfica. Foram sequenciadas as regiões intergênicas plastídias *psbA-trnH* e *trnQ-5'-rps16*. Foram avaliados índices de diversidade e estruturação genéticas, inferidas rede de haplótipos e hipótese filogenética bayesiana e realizadas as análises demográficas. A variabilidade genética intrapopulacional foi baixa, em contraste com a alta variabilidade interpopulacional. Foram detectados sete grupos genéticos geograficamente bem delimitados e não foram observados sinais de expansão populacional recente. A divergência entre as sete linhagens principais ocorreu entre o Mioceno tardio e o Plioceno. Os resultados apóiam a hipótese de uma distribuição passada mais ampla, fragmentada com a expansão das vegetações savânicas do Cerrado.

Abstract

There are evidences that the distribution of the tropical forests in South America was broader and continuous in the past, being reduced along the Miocene with the spread of the Dry Diagonal, composed by Caatinga, Cerrado and Chaco. The Cerrado comprises a vegetation mosaic that, in addition to the dry savannas, also includes humid formations. It is possible that the humid formations contain remnants of the vegetation that occurred on the region before the emergence of savannas; alternatively, it is possible that these formations have been colonized by rainforest lineages. The aim of this work was to test the hypotheses of "fragmentation" and "recent colonization", to understand the processes that led to the current distribution of the species of humid habitats of Cerrado. We sampled *Mandirola hirsuta* (Gesneriaceae) populations in 25 locations along all the group geographic range and sequenced the plastidial intergenic regions *psbA-trnH* and *trnQ-5'-rps16*. We evaluated genetic diversity and genetic structure indices, inferred haplotype network and bayesian phylogeny hypothesis and performed demographic analyzes. Intra-population genetic diversity was low, in contrast to the high interpopulation variability. Seven genetic groups, geographically well defined, were detected and no signals of recent population expansion were detected. The results support the hypothesis of a broader past distribution, fragmented with the expansion of the *Cerrado* savanna vegetation.

Lista de figuras

Figura 1. Distribuição geográfica das populações de <i>Mandirola</i> amostradas.....	19
Figura 2. Perfil de gel de agarose corado com GelRed™ com DNAs totais obtidos a partir de duas metodologias de extração.	20
Figura 3. Grupos genéticos de <i>Mandirola</i> a) Grupos inferidos pela BAPS; b) Distribuição geográfica dos grupos.	27
Figura 4. Correlação entre distâncias genética (número médio de substituições) e geográfica (Km); a) Interpopulacional; b) Entre grupos.	28
Figura 5. Correlação entre distâncias genética (número médio de substituições) e geográfica (Km) nos grupos que apresentam mais que duas populações.; a) grupo I; b) grupo II; c) grupo IV.	29
Figura 6. Rede de haplótipos das sequências (a) e distribuição geográfica dos grupos (b). ...	30
Figura 7. Inferência filogenética bayesiana dos haplótipos.....	32
Figura 8. <i>Skyline plots</i> e histogramas de diferenças par a par dos seis grupos que apresentam mais que um haplótipo.....	33
Figura anexa 1. <i>Mandirola hirsuta</i> . a) Corola; b) Parte da população M01; c) Visitante floral; d) Frutos; e) Sementes; f) Substrato na população M17; g) Rizoma; h) Indivíduo da população M01; i) Indivíduo da população M07; j) Indivíduo da população M11; k) Indivíduo da população M24	48

Lista de tabelas

Tabela 1. Populações de <i>Mandirola</i> amostradas para estudo filogeográfico.	18
Tabela 2. Iniciadores plastidiais testados em <i>Mandirola</i>	21
Tabela 3. Testes de amplificação e sequenciamento de regiões intergênicas de cpDNA avaliadas para estudo filogeográfico em <i>Mandirola</i>	22
Tabela 4. Características das regiões intergênicas de cpDNA <i>psbA-trnH</i> e <i>trnQ-5'-rps16</i>	25
Tabela 5. Distribuição de haplótipos e índices de diversidade das populações.....	26
Tabela 6. Análise de Variância Molecular hierarquizada.....	28
Tabela 7. Testes de neutralidade dos marcadores plastidiais concatenados.....	31
Tabela 8. Exemplos de diversidade genética de plantas ocorrentes nas fisionomias do bioma Cerrado	34
Tabela anexa 1. Descrição dos 29 haplótipos do grupo <i>Mandirola</i> originados da concatenação dos alinhamentos das regiões intergênicas de cpDNA <i>psbA-trnH</i> e <i>trnQ-5'-rps16</i>	49
Tabela anexa 2. Matriz de distâncias genética (número de substituições médio para a par, abaixo da diagonal) e geográfica (em quilômetros, acima da diagonal) entre as populações de <i>Mandirola</i>	52
Tabela anexa 3. Matriz de distâncias genética (número de substituições médio para a par, abaixo da diagonal) e geográfica (em quilômetros, acima da diagonal) entre os grupos (BAPS, figura 3) de <i>Mandirola</i>	53
Tabela anexa 4. Matriz de distâncias genética (número de substituições médio para a par, abaixo da diagonal) e geográfica (em quilômetros, acima da diagonal) entre as populações do grupo I (BAPS, figura 3) de <i>Mandirola</i>	53
Tabela anexa 5. Matriz de distâncias genética (número de substituições médio para a par, abaixo da diagonal) e geográfica (em quilômetros, acima da diagonal) entre as populações do grupo II (BAPS, figura 3) de <i>Mandirola</i>	53
Tabela anexa 6. Matriz de distâncias genética (número de substituições médio para a par, abaixo da diagonal) e geográfica (em quilômetros, acima da diagonal) entre as populações do grupo IV (BAPS, figura 3) de <i>Mandirola</i>	54

Sumário

Introdução.....	13
Objetivos.....	17
Metodologia.....	18
Resultados.....	25
Discussão	34
Conclusão	38
Referências	39
Anexos.....	47

Introdução

A América do Sul é uma das regiões mais biodiversas do planeta, sendo atualmente composta por ecorregiões que vão de florestas tropicais úmidas a desertos e páramos (Marchant *et al.* 2009; Antonelli & Sanmartín 2011). O registro fóssil sugere que a distribuição das florestas sul-americanas foi mais ampla durante o Eoceno e o Mioceno do que atualmente, resultado corroborado por simulações climáticas (Gouveia *et al.* 2002; Bush & Flenley 2007; Micheels *et al.* 2007; Fanton *et al.* 2012). Estudos indicam que a partir do Mioceno médio, de 17-13 Ma (milhões de anos atrás), eventos orogênicos alteraram a dinâmica de circulação de calor e chuvas no planeta, levando a alterações que, entre outros efeitos, reduziram a temperatura e aumentaram a sazonalidade do clima; na América do Sul, o soerguimento dos Andes ocasionou aumento da aridez e diminuição da temperatura (Potter & Szatmari 2009; Micheels *et al.* 2011; Armijo *et al.* 2015). Este período coincide com a expansão das pradarias de gramíneas com metabolismo fotossintético C₄ (Keeley & Rundel 2005) e a conjunção desses eventos colaborou para a redução da área ocupada por florestas tropicais e a expansão de fitofisionomias abertas, como as savanas e as matas secas (Simon *et al.* 2009; Maurin *et al.* 2014; Pennington & Hughes 2014). Na América do Sul tal processo deu origem à diagonal seca, que hoje é composta por Caatinga, Cerrado e Chaco (Simon *et al.* 2009; Werneck 2011). Dentre esses biomas, o Cerrado caracteriza-se por abranger fitofisionomias predominantemente savânicas e ocupar um total de 204 milhões de hectares na região central do Brasil (IBGE/MMA 2004; Pennington & Ratter 2006). Compreende uma ampla variedade de características edáficas, geomorfológicas e climáticas, assim como de tipos vegetacionais: formações campestres, savânicas e florestais estão dispostas lado a lado em um mosaico fitofisionômico (Silva *et al.* 2006; Sano *et al.* 2010; Carvalho *et al.* 2014). O bioma é composto por uma excepcional riqueza de espécies, muitas das quais endêmicas, mas tem sido substituído por pastagens e áreas cultiváveis em ritmo acelerado, o que faz dele um dos 25 *hotspots* mundiais de biodiversidade com prioridade para conservação (Myers *et al.* 2000; de Oliveira *et al.* 2015; Kline *et al.* 2015).

A origem e distribuição da biodiversidade no espaço geográfico tem sido explicada por duas hipóteses biogeográficas principais: as hipóteses de vicariância e de dispersão (Whittaker & Fernández-Palacios 2007). Simon *et al.* (2009) sugerem que a biodiversidade do bioma Cerrado se originou a partir de múltiplas colonizações independentes de linhagens tolerantes ao fogo provenientes dos biomas adjacentes, como a Mata Atlântica e

a Amazônia, há menos que 10 Ma. Entretanto, é possível que ao menos parte das linhagens das formações úmidas atuais sejam remanescentes da vegetação adaptada ao clima mais úmido e não sazonal que antecedeu o surgimento das fitofisionomias savânicas pós-miocênicas na América do Sul. No contexto das formações úmidas do Cerrado, é possível que a vegetação que hoje ocupa tais regiões seja o relicto da formação florestal mais ampla que ocupava a área até o Mioceno e que passou por fragmentação após alterações climáticas do terciário ou do quaternário. Alternativamente, é possível que a biodiversidade das formações úmidas do Cerrado tenha se originado de colonizações de linhagens provenientes das florestas tropicais úmidas.

O registro fóssil da flora sul-americana é escasso até o terciário e, mesmo no quaternário, concentra-se em sítios localizados na região noroeste do continente (Burnham & Graham, 1999), o que torna a utilização de marcadores genéticos muito relevante para uma melhor compreensão dos processos que deram origem à atual organização da biodiversidade no Cerrado. A filogeografia fornece evidências de processos demográficos, como expansão e retração populacionais, e geográficos, como dispersão e vicariância, e pode proporcionar um melhor entendimento sobre a origem dos padrões de diversidade genética atuais (Diniz-Filho *et al.* 2008; Hickerson *et al.* 2010). Essa abordagem permite ainda a inferência de tempos de divergência entre linhagens, possibilitando que evidências climáticas e geomorfológicas sejam associadas a processos de diferenciação populacional (Bouckaert *et al.* 2014). Turchetto-Zolet *et al.* (2013), ressaltam que a maior parte dos estudos filogeográficos na América do Sul discute padrões de vertebrados, principalmente em florestas úmidas, e que estudos com vegetais e invertebrados distribuídos nos demais ambientes desse continente seriam fundamentais para um melhor entendimento de sua dinâmica evolutiva, auxiliando a compreensão da origem e manutenção de sua biota. Além de serem relevantes para a compreensão de processos evolutivos, estudos filogeográficos podem auxiliar na determinação de áreas prioritárias para conservação, na identificação de linhagens crípticas e também na previsão de possíveis alterações vegetacionais em função de mudanças climáticas, sendo fundamentais para o planejamento de estratégias de conservação da biodiversidade (Frankham *et al.* 2008).

O número de estudos sobre os padrões filogeográficos de plantas que ocorrem no Cerrado apresentou um incremento nos últimos anos (Olsen 2002; Collevatti *et al.* 2003, 2009, 2012a, b; Ramos *et al.* 2007; Feres *et al.* 2009; Novaes *et al.* 2010, 2013; Barbosa *et al.* 2012; Terribile *et al.* 2012; Bonatelli *et al.* 2014; de Lima *et al.* 2014). Contudo, a maior parte dos trabalhos realizados no bioma concentra-se em espécies arbóreas e ocorrentes em

fitofisionomias campestres ou savânicas. Tendo em vista que o Cerrado é um mosaico fitofisionômico, para uma visão mais completa de seus padrões filogeográficos é fundamental que organismos de formações úmidas desses bioma sejam também avaliados, pois grupos com tolerâncias ambientais diferentes respondem de formas distintas a mudanças ambientais (D'Amen *et al.* 2013).

A família Gesneriaceae (Lamiales) divergiu há cerca de 70 Ma (Perret *et al.* 2013), é composta por cerca de 3200 espécies e tem seus principais centros de riqueza na região neotropical, localizados no norte da região andina, na América Central e na Mata Atlântica (Perret *et al.* 2013). Apesar de Gesneriaceae ser particularmente abundante em florestas úmidas de montanhas, onde os indivíduos crescem como epífitas ou em afloramentos rochosos, e estar predominantemente adaptada a ambientes úmidos com baixa incidência solar (Weber 2004; Weber e Skog 2007), alguns dos representantes da família encontram-se atualmente distribuídos no Cerrado, porém ocorrendo exclusivamente em ambientes úmidos e sombreados, como é o caso das populações de *Mandirola*. Segundo Perret *et al.* (2013), o gênero *Mandirola* (Gesneriaceae, Gesnerieae, Gloxiniinae) divergiu há cerca de 8 Ma, sendo endêmico de fitofisionomias do Cerrado brasileiro, onde as populações ocorrem de forma disjunta em afloramentos rochosos úmidos. As plantas do gênero apresentam porte herbáceo, rizoma, frutos secos, sementes pequenas sem adaptações aparentes para dispersão a longa distância e propagação vegetativa; as flores são possivelmente polinizadas por abelhas (Araujo 2007). Os indivíduos passam por um período de dormência anual que coincide com o período de estiagem, ocorrendo de julho a novembro. Nesta fase as plantas perdem as folhas e sobrevivem na forma de rizoma. Iniciado o período das chuvas as plantas brotam e produzem folhas e flores; após o amadurecimento dos frutos, retornam ao estado de dormência.

Desde sua descrição, *Mandirola* passou por uma série de revisões taxonômicas (Decaisne 1848; Hanstein 1864; Wiehler 1976; Roalson *et al.* 2005). Na mais recente revisão, Araujo *et al.* (2012) consideraram a ocorrência de um contínuo de variação morfológica entre os táxons descritos no gênero e propuseram sinonimização de todos estes a *M. hirsuta*, reconhecendo que este grupo pode se tratar de um complexo de espécies. O polimorfismo morfológico das populações pode ser uma evidência de processos de diferenciação. Esta condição, associada à ampla área de distribuição e ao tempo de divergência estimado para o grupo, faz de *Mandirola* um bom modelo para estudos de padrões filogeográficos de espécies herbáceas perenes de formações úmidas do Cerrado.

Neste trabalho marcadores moleculares de herança materna são utilizados para explorar informações sobre a história evolutiva do grupo *Mandirola*, permitindo que e as

hipóteses de “colonização recente” e de “fragmentação ancestral” sejam testadas. Em um cenário em que *Mandirola* passou por sucessivos eventos de colonização a partir de uma distribuição restrita (refúgios, colonização recente), é esperado que exista um gradiente de diversidade genética, indícios de isolamento por distância, diferenciação gradual dos clados e sinais demográficos de expansão populacional. Alternativamente, no caso da ocorrência de fragmentação de uma distribuição ampla com consequente redução da conexão entre as populações, é esperado que a diversidade genética esteja homogeneamente distribuída, que não sejam observados indícios de isolamento por distância, que a divergência entre os clados seja simultânea e que os testes demográficos indiquem estabilidade ou declínio populacional.

Objetivos

O objetivo deste trabalho é compreender processos que resultaram na distribuição atual de espécies de formações úmidas do Cerrado, por meio do estudo da diversidade genética de *Mandirola hirsuta*.

Para testar as hipóteses de “fragmentação ancestral” e “colonização recente”, este trabalho pretende avaliar se há evidências de que: (1) a distribuição de *Mandirola* passou por fragmentação e (2) a distribuição atual é resultante de dispersão recente. No cenário de fragmentação de uma distribuição ampla com consequente redução da conexão entre as populações, é esperado que a diversidade genética esteja homogeneamente distribuída, que não sejam observados indícios de isolamento por distância, que a divergência entre os clados seja simultânea e que os testes demográficos indiquem estabilidade ou declínio populacional. No caso da ocorrência de sucessivos eventos de colonização a partir de uma distribuição restrita (refúgios, colonização recente), é esperado que exista um gradiente de diversidade genética, indícios de isolamento por distância, diferenciação gradual dos clados e sinais demográficos de expansão populacional.

Para tanto, pretendemos avaliar a magnitude e a distribuição geográfica da diversidade genética, testar a ocorrência de isolamento por distância, descrever linhagens e estimar datas de divergências entre elas e investigar alterações demográficas ocorridas no passado.

Metodologia

Amostragem

Folhas jovens de três a 22 indivíduos, dependendo do tamanho populacional, de 25 áreas de ocorrência abrangendo toda a distribuição geográfica conhecida de *Mandirola* (Araujo 2007) foram coletadas e desidratadas em sílica gel (tabela 1, figura 1). Foi respeitada uma distância mínima de 10 m entre indivíduos coletados para evitar a amostragem de *ramets* clonais de um mesmo *genet*, uma vez que os indivíduos apresentam rizomas que podem se fragmentar. O material testemunho das populações foi depositado no HUFABC.

Tabela 1. Populações de *Mandirola* amostradas para estudo filogeográfico. N: número amostral

População	Estado	Município	Coordenada	Altitude	N
M01	SP	Pedregulho	20°09'09,4"S, 47°17'17,7"W	569 m	20
M02	MG	Sacramento	19°56'31,9"S, 47°23'53,2"W	706m	20
M03	GO	Paraúna	17°08'47,4"S, 50°44'06,4"W	752 m	4
M04	GO	Mossâmedes	16°05'04,8"S, 50°11'13,2"W	928 m	3
M05	GO	Caldas Novas	17°58'28,0" S, 48°33'51,1"W	763 m	20
M06	GO	Corumbá de Goiás	15°50'34,4"S, 48°46'05,5"W	1052 m	22
M07	GO	Pirenópolis	15°48'52,0"S, 48°57'45,5"W	1004 m	20
M08	DF	Brazlândia	15°35'24,8"S, 48°03'15,2"W	1256 m	15
M09	GO	Niquelândia	14°29'25,9"S, 48°33'31,6"W	698 m	18
M10	GO	Alto Paraíso	14°12'09,2"S, 47°50'09,5"W	849 m	20
M11	GO	Alto Paraíso	14°06'10,0"S, 47°28'34,5"W	1132 m	10
M12	GO	Alto Paraíso	13°56'36,0"S, 47°27'25,4"W	1501 m	20
M13	GO	Teresina de Goiás	13°52'29,5"S, 47°15'33,7"W	811 m	20
M14	GO	Colinas do Sul	13°52'24,9"S, 48°10'30,7"W	584 m	14
M15	TO	Arraias	12°33'31,5"S 47°08'18,0"W	461 m	24
M16	MT	Barra do Garças	15°52'06,4"S, 53°15'38,6"W	627 m	10
M17	MT	Barra do Garças	15°33'46,8"S, 53°26'33,8"W	544 m	10
M18	MT	Chapada dos Guimarães	15°26'16,8"S, 55°50'16,3"W	672 m	16
M19	MT	Chapada dos Guimarães	15°24'24,8"S, 55°49'27,3"W	605 m	17
M20	MT	Chapada dos Guimarães	15°22'44,8"S, 55°50'31,5"W	551 m	12
M21	BA	São Desidério	12°41'14,7"S, 45°52'13,0"W	732 m	3
M22	TO	Natividade	11°39'32,9"S, 47°41'21,1"W	384 m	21
M23	MA	Carolina	07°05'00,4"S, 47°22'03,8"W	259 m	17
M24	TO	Darcinópolis	06°49'22,9"S, 47°50'23,7"W	347 m	20
M25	PA	Parauapebas	06°24'0,5"S, 50°23'16,6"W	662m	12
Total					388

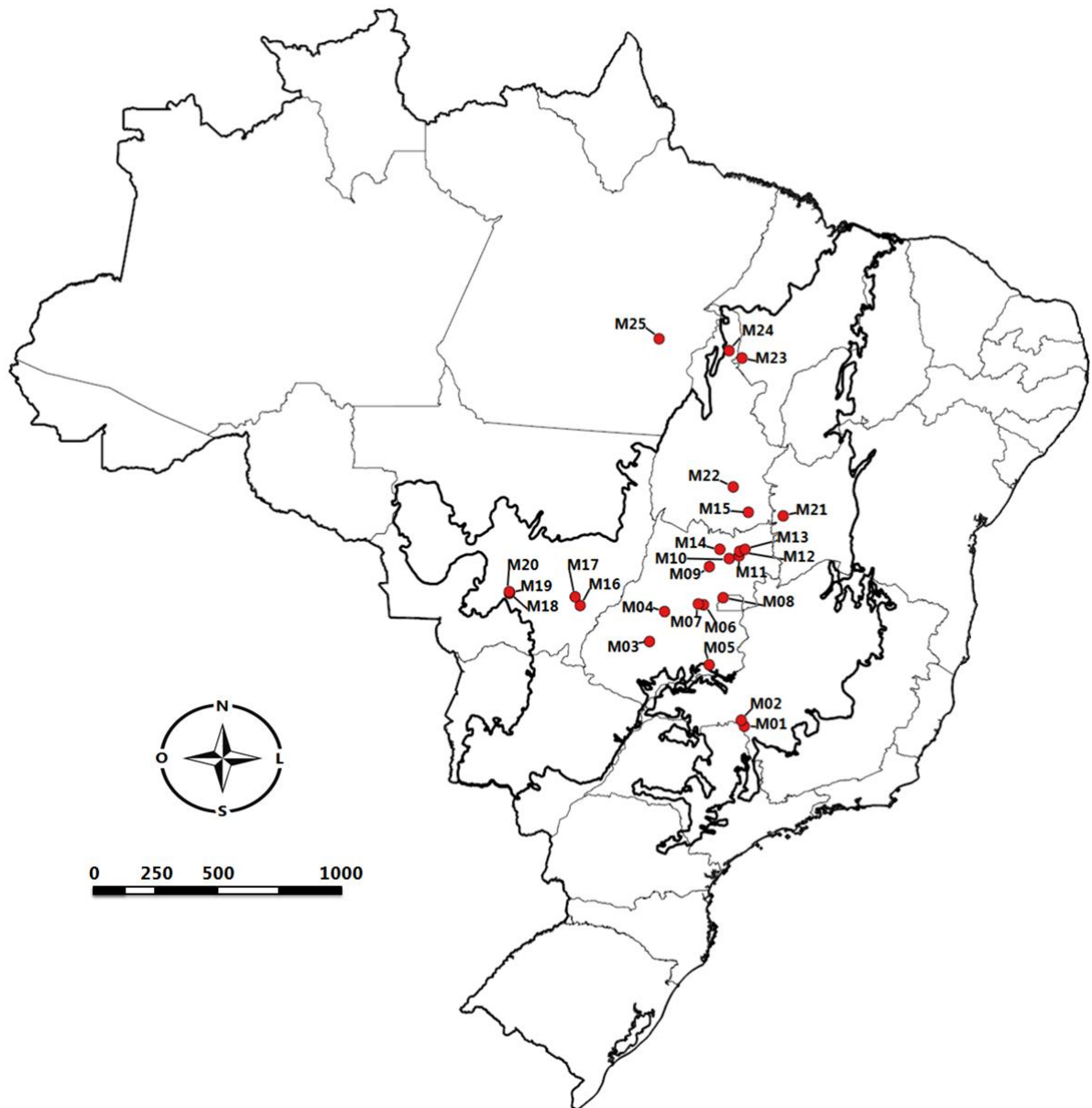


Figura 1. Distribuição geográfica das populações de *Mandirola* amostradas. Os códigos das populações encontram-se na tabela 1. A distribuição geográfica do bioma Cerrado é apresentada.

Extração, amplificação e seleção de regiões para sequenciamento

Foram testados dois métodos de extração: (1) o kit *DNAeasy*, da Quiagen e (2) o protocolo de (Doyle & Doyle 1987), o qual é baseado em brometo de cetilmetil amônio (CTAB). Por ter proporcionado rendimento superior e menor degradação do DNA total (figura 2), o protocolo de Doyle & Doyle (1987) foi utilizado para as extrações de todos os indivíduos de *Mandirola*. Os produtos das extrações estão armazenados a -20°C.

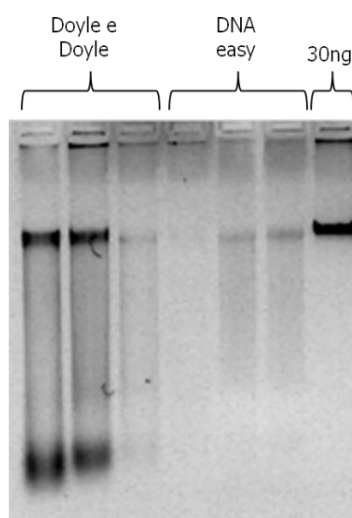


Figura 2. Perfil de gel de agarose corado com GelRed™ com DNAs totais obtidos a partir de duas metodologias de extração.

Catorze regiões plastidiais foram testadas (tabela 2), sendo os fragmentos amplificados por PCR em um volume total de 30 µL contendo 0,6 unidades de *Taq* DNA polimerase (Biotools), tampão de reação 1x [75 mM Tris HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄], 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,75 µM de cada iniciador, 0,04mg/mL de albumina de soro bovino (BSA) e DNA genômico na diluição 1/100. As condições básicas de amplificação foram: um ciclo de 94 °C por 1 min; 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 53 °C por 40 s e 72 °C por 40 s; e um ciclo de 75 °C por 5 min. Os produtos de amplificação foram avaliados qualitativamente em eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corados com GelRed™ (Biotium). Das 14 regiões plastidiais testadas, nove proporcionaram resultados satisfatórios de amplificação após a otimização das condições de PCR (tabela 3). Os melhores resultados foram obtidos para as regiões intergênicas *psbA-trnH*, *trnS(GCU)-trnG(UCC)* e *trnQ-5'-rps16*, as quais foram selecionadas para a avaliação da qualidade do sequenciamento e da presença de polimorfismos. Nos testes foram amplificadas e sequenciadas amostras de DNA

de indivíduos provenientes das populações M02, M12, M18 e M23, totalizando 16 indivíduos. Os sequenciamentos nos sentidos direto e reverso foram realizados pela metodologia de Sanger em sequenciador automático ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Unicamp (CBMEG). O número de sítios polimórficos observados no alinhamento das sequências desses indivíduos é apresentado na tabela 3. Por serem mais polimórficas, as regiões *psbA-trnH* e *trnQ-5'-rps16* foram selecionadas para este estudo. No presente trabalho optou-se por uma amostragem mais expressiva em relação ao número de localidades do que de indivíduos por população; foram amostrados de três a 14 indivíduos provenientes de todas as 25 populações amostradas. Ambas as regiões são espaçadores intergênicos do DNA plastidial e, portanto, foram concatenadas para as análises.

Tabela 2. Iniciadores plastidiais testados em *Mandirola*.

Região	Iniciador	Sequência	Referência
<i>trnL-trnF</i>	trnL-c	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet <i>et al.</i> 1991
	trnF-f	ATTGAACTGGTGACACGAG	
<i>rpl16</i>	rpl16-F71	GCTATGCTTAGTGTGACTCGTTG	Kelchner & Clark 1997
	rpl16-R1661	CGTACCCATATTTTTCCACCACGAC	
	rpl16-R1516	CCCTTCATTCCTCTATGTTG	
<i>psbA-trnH</i>	psbA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Tate & Simpson 2003
	trnH2	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	
<i>trnS_(GCU)-trnG_(UCC)</i>	trnS(GCU)	AGATAGGGATTGCAACCTCG	Shaw <i>et al.</i> 2005
	trnG(UUC)	GTAGCGGAATCGAACCCGCATC	
<i>rpl32-trnL</i>	rpl32-F	CAGTTCCAAAAAACGTACTTC	Shaw <i>et al.</i> 2007
	trnL ^(UAG)	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	
<i>trnQ-5'-rps16</i>	trnQ ^(UUG)	GCGTGGCCAAGYGGTAAGGC	Shaw <i>et al.</i> 2007
	rpS16x1	GTTGCTTTYTACCACATCGTTT	
<i>trnS-trnG-trnG</i>	trnS ^{(GCU)*}	AACTCGTACAACGGATTAGCAATC	Shaw <i>et al.</i> 2007
	trnG ^{(UUC)*}	GAATCGAACCCGCATCGTTAG	
<i>3'trnV-ndhC</i>	trnV ^(UAC) x2	GTCTACGGTTCGARTCCGTA	Shaw <i>et al.</i> 2007
	ndhC	TATTATTAGAAATGYCCARAAAATATCATATTC	
<i>psbD-trnT</i>	psbD	CTCCGTARCCAGTCATCCATA	Shaw <i>et al.</i> 2007
	trnT ^(GGU) -R	CCCTTTTAACTCAGTGGTAG	
<i>atpI-atpH</i>	AtpI	TATTTACAAGYGGTATTCAAGCT	Shaw <i>et al.</i> 2007
	atpH	CCAAYCCAGCAGCAATAAC	
<i>ndhF-rpl32</i>	ndhF	GAAAGGTATKATCCAYGMATATT	Shaw <i>et al.</i> 2007
	rpl32-R	CCAATATCCCTTYTTTTTCCAA	
<i>psbJ-petA</i>	psbJ	ATAGGTACTGTARCYGGTATT	Shaw <i>et al.</i> 2007
	petA	AACARTTYGARAAGTTCAATT	
<i>petL-psbE</i>	petL	AGTAGAAAACCGAAATAACTAGTTA	Shaw <i>et al.</i> 2007
	psbE	TATCGAATACTGGTAATAATATCAGC	
<i>3'rps16-5'trnK</i>	rpS16x2F2	AAAGTGGGTTTTTATGATCC	Shaw <i>et al.</i> 2007
	trnK(UUU)x1	TTAAAAGCCGAGTACTCTACC	

Tabela 3. Testes de amplificação e sequenciamento de regiões intergênicas de cpDNA avaliadas para estudo filogeográfico em *Mandirola*. Resultados baseados em um total de 16 indivíduos provenientes das populações M02, M12, M18 e M23.

Região	Condições de amplificação				Qualidade amplificação*	Tamanho fragmento (pb)	Nº sítios polimórficos
	Tm (°C)	Iniciador (µM)	MgCl ₂ (mM)	BSA (mg/mL)			
trnL-F	56	0,1	1,5	0,00	-	1000	-
<i>psbA-trnH</i>	53	0,1	1,5	0,04	+	400	15
trnS _(GCU) -trnG _(UCC)	53	0,4	3,0	0,04	+	900	7
rpl32-trnL	56	0,1	1,5	0,00	-	1000	-
<i>trnQ-5'-rps16</i>	57	0,4	1,5	0,04	+	1000	36
3'trnV-ndhC	53	0,3	3,0	0,04	-	900	-
psbD-trnT	55	0,4	1,5	0,04	-	1500	-
ndhF-rpl32	53	0,4	1,5	0,04	-	800	-
3'rps16-5'trnK	53	0,4	1,5	0,04	-	1300	-

*insatisfatória (-) ou satisfatória (+)

Características das sequências, diversidade e estrutura genética

O consenso das sequências direta e reversa das regiões *psbA-trnH* e *trnQ-5'-rps16* foi realizado com o software Staden Package 1.7.0 (Staden 1996) e o alinhamento das sequências foi realizado com Muscle implementado em MEGA 6 (Edgar 2004; Tamura *et al.* 2013). Com o auxílio do programa BioEdit 5.0.6 (Hall 1999), a matriz de alinhamento passou por inspeção visual para detecção de sítios polimórficos espúrios. Os indels foram codificados de acordo com o esquema Simple Indel Coding (SIC, Simmons & Ochoterena 2000), implementado em programa SeqState (Müller 2005).

As características das sequências de cada região e as diversidades haplotípica (*h*) e nucleotídica (π) foram calculadas utilizando DnaSP 5.10 (Librado & Rozas 2009) e Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010). Com o intuito de evitar que os valores de diversidade nucleotídica fossem superestimados, indivíduos com uma deleção de 414 pb na região *trnQ-5'-rps16* foram excluídos do cálculo das diversidades haplotípica e nucleotídica.

Estruturação genética e geográfica

A detecção de grupos genéticos foi realizada pela inferência bayesiana de agrupamentos populacionais com limites máximos de 5, 10, 15, 20, 25 e 29 grupos no software BAPS 6.0 (Corander & Tang 2007; Corander *et al.* 2008). A análise de variância molecular (AMOVA) foi hierarquizada de acordo com os grupos genéticos inferidos na análise bayesiana de agrupamentos populacionais (BAPS) e realizada com o programa Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010).

O teste de Mantel (Mantel 1967) foi realizado a partir dos números médios de substituições sítio a sítio na matriz concatenada das regiões *psbA-trnH* e *trnQ-5'-rps16* (sítios com gaps foram eliminados nas relações par a par) e das distâncias geográficas entre as populações. As análises foram desenvolvidas em níveis populacional, regional (BAPS) e para as populações dos grupos constituídos por mais que duas populações (MEGA 6, Tamura *et al.* 2013). Para as análises em nível populacional foram utilizadas as distâncias geográficas e genéticas entre as populações e para as análises em nível regional foram utilizadas as distâncias geográficas e genéticas médias entre as populações de cada um dos grupos genéticos. Para os grupos constituídos por mais que duas populações, foram utilizadas as distâncias geográficas e genéticas entre as populações de cada um deles. Indivíduos com a deleção de 414 pb na região *trnQ-5'-rps16* foram excluídos dos cálculos.

Relações evolutivas e tempos de divergência entre os haplótipos de cpDNA

A rede haplotípica das regiões *psbA-trnH* e *trnQ-5'-rps16* concatenadas foi inferida com o algoritmo *Integer Neighbour-Joining Networks* sem tolerância à reticulação (French *et al.* 2013) implementado no programa PopArt 1.6 beta (<http://popart.otago.ac.nz>). A codificação binária de indels foi incluída na matriz.

A inferência filogenética bayesiana foi especificada com a ferramenta BEAUti 1.8.1 e realizada com o programa BEAST 1.8.1 (Drummond *et al.* 2012). A caracterização da análise encontram-se em anexo. Sequências dos gêneros *Chautemsia* (Gloxiniinae), *Seemannia* (Gloxiniinae) e *Sphaerorrhiza* (Sphaerorrhizinae) da tribo Gesnerieae foram utilizadas como grupo externo e a inferência filogenética foi datada a partir do T_{mrca} obtido por Perret *et al.* (2013) para *Mandirola* e a partir da idade inferida para o nó 52 da árvore obtida por Roalson *et al.* (2008) para Gloxiniinae (antiga tribo Gloxinieae, Gesneriaceae). A convergência dos resultados foi verificada com o programa Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond 2009) e as árvores foram sumarizadas com a ferramenta TreeAnnotator 1.8.1; a árvore obtida foi visualizada utilizando FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Demografia histórica dos grupos

Para avaliar evidências de expansões populacionais foram calculados os índices F_s (Fu 1997) e D (Tajima 1989) com o programa Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010) e R_2 (Ramos-Onsins & Rozas 2002) com o programa DnaSP 5.10 (Librado & Rozas 2009). A dinâmica demográfica dos grupos também foi explorada com *skyline plots* (Drummond *et al.* 2005), os quais foram especificados com a ferramenta BEAUti 1.8.1 e realizados com o programa BEAST 1.8.1 (Drummond *et al.* 2012) com as mesmas características da inferência filogenética bayesiana, exceto que as árvores foram inferidas sob o modelo coalescente de "Bayesian Skyline", com quatro grupos. A inferência foi calibrada a partir da taxa de substituição obtida na inferência filogenética bayesiana. Foram realizadas 5×10^7 iterações, com amostragem de árvores a cada 5×10^3 gerações. A convergência dos resultados foi verificada com o programa Tracer v1.5, o qual também foi utilizado para a inferência e exibição dos *skyline plots* (Rambaut & Drummond 2009).

Resultados

Características das sequências e diversidade

O alinhamento da regiões *psbA-trnH* abrangeu uma sequência de 285 nucleotídeos e o da região *trnQ-5'-rps16* uma sequência de 1004 nucleotídeos (tabela 4), considerando os indels. Os sítios localizados entre as posições 80 e 106 da região *psbA-trnH* não foram considerados nas análises devido à impossibilidade de estabelecer um alinhamento não ambíguo. Após a concatenação das regiões, foram observados 17 indels e 73 substituições, os quais se combinaram em 29 haplótipos (tabela anexa 1). Na região *trnQ-5'-rps16*, os haplótipos H4 e H9 apresentaram uma deleção de 414pb. O haplótipo H9 ocorre exclusivamente na população M04, onde ocorre também o haplótipo H8, e o haplótipo H9 está fixado nas populações M05 e M08.

Tabela 4. Características das regiões intergênicas de cpDNA *psbA-trnH* e *trnQ-5'-rps16*.

	Amplitude	Sítios invariáveis	Sítios com substituições	Indels (amplitude total)	Composição nucleotídica (%)			
					A	T	C	G
<i>psbA-trnH</i>	285 pb	234	33	7 (20)	32,6	36,4	14,6	16,1
<i>trnQ-rps16</i>	1004 pb	538	40	10 (448)	35,0	38,2	13,1	13,5

As diversidades haplotípica e nucleotídica observadas e a distribuição dos haplótipos nas populações estudadas são apresentadas na tabela 5. No total as diversidades haplotípica e nucleotídica observadas para as regiões concatenadas foram 0,9494 ($\sigma=0,0069$) e 0,015579 ($\sigma=0,007674$), respectivamente. Nas populações a diversidade haplotípica variou de 0 a 0,8333 ($\sigma=0,2224$) e a nucleotídica de 0 a 0,007552 ($\sigma=0,005256$), sendo as populações M03 e M18 as mais diversas para ambos os índices. Dezoito das 25 populações possuem ao menos um haplótipo exclusivo e apenas três haplótipos foram compartilhados por mais de uma população: H4, H12 e H15 (tabela 5).

Tabela 5. Distribuição de haplótipos e índices de diversidade das populações. Grupo: grupos genéticos sugeridos pela BAPS, N: número amostral, h: diversidade haplotípica, π : diversidade nucleotídica, σ = desvio padrão da probabilidade.

População	Grupo	N	Haplótipos	h	π
M01	I	6	H1(5), H2(1)	0,3333 ($\sigma=0,2152$)	0,001050 ($\sigma=0,000868$)
M02	I	8	H3 (8)	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M03	I	4	H5(2), H6(1), H7(1)	0,8333 ($\sigma=0,2224$)	0,007552 ($\sigma=0,005256$)
M04	I e II	3	H8(2), H9(1)	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M05	II	6	H4 (6) [#]	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M06	II	4	H11 (4)	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M07	II	4	H12 (4) [#]	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M08	II	5	H4 (5) [#]	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M09	II	6	H12 (2) [#] , H18 (4)	0,5333 ($\sigma=0,1721$)	0,000848 ($\sigma=0,000744$)
M10	II	6	H19 (6)	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M11	II	4	H20 (4)	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M12	III	8	H21 (6), H22 (2)	0,4286 ($\sigma=0,1687$)	0,000341 ($\sigma=0,000388$)
M13	III	6	H23 (5), H24 (1)	0,3333 ($\sigma=0,2152$)	0,002120 ($\sigma=0,001511$)
M14	II	4	H12 (4) [#]	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M15	II	4	H12 (4) [#]	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M16	IV	6	H10 (6)	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M17	IV	4	H13 (4)	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M18	IV	14	H14 (4), H15 (4) [#] , H16 (1), H17 (5)	0,7582 ($\sigma=0,0601$)	0,004826 ($\sigma=0,002743$)
M19	IV	6	H15 (6) [#]	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M20	IV	6	H15 (6) [#]	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M21	V	3	H25 (3)	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M22	V	4	H26 (4)	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M23	VI	8	H27 (8)	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M24	VII	4	H28 (4)	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
M25	VII	6	H29 (6)	0,0000 ($\sigma=0,0000$)	0,000000 ($\sigma=0,000000$)
Total*		139		0,9494 ($\sigma=0,0069$)	0,015579 ($\sigma=0,007674$)

* valores calculados excluindo indivíduos com haplótipos apresentando a deleção de 414pb na região *trnQ-5'-rps16*.

[#]haplótipo compartilhado

Estrutura populacional

Foram identificados sete grupos de haplótipos na BAPS com probabilidade de 0,99998 (figura 3a). A figura 3b exibe a distribuição geográfica dos grupos; as populações de cada um deles se distribuem de forma coesa no espaço geográfico. Apenas a população M04 tem composição mista, com haplótipos de dois grupos genéticos (figura 3).

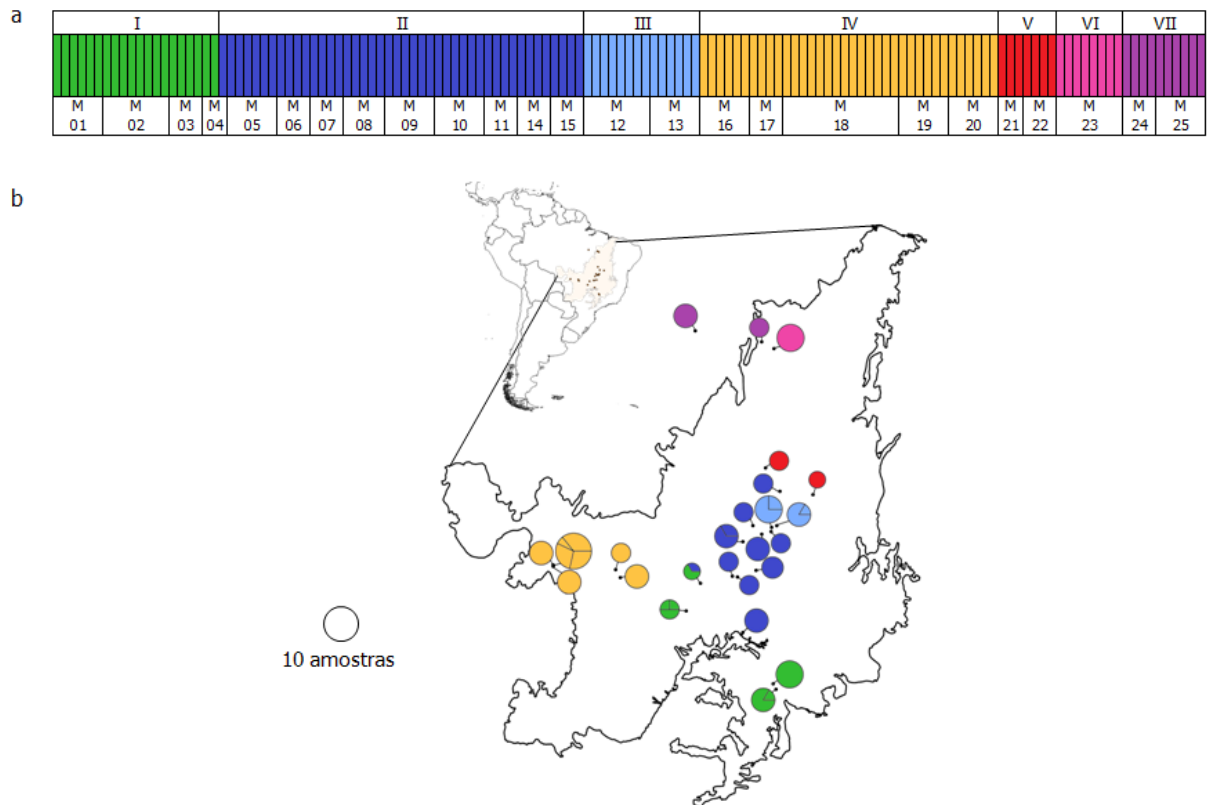


Figura 3. Grupos genéticos de *Mandirola* a) Grupos inferidos pela BAPS (barras representam indivíduos e as cores grupos); b) Distribuição geográfica dos grupos.

A Análise de Variância Molecular hierarquizada (AMOVA, tabela 6) indica que 73% da variação é devida à diferenciação entre os grupos indicados pela BAPS (figura 3), 21% entre as populações dentro dos grupos e apenas 6% dentro das populações.

Tabela 6. Análise de Variância Molecular hierarquizada. As populações foram agrupadas de acordo com a figura 3 ($p < 0,001$).

Fonte de variação	Varição
Entre grupos	73%
Populações dentro dos grupos	21%
Dentro de populações	6%
Φ_{ST}	0,940

O teste de Mantel considerando todas as populações indicou que há correlação positiva e significativa entre as matrizes de distâncias genética e geográfica ($R=0,615$, $p=0,010$, figura 4a). No entanto, a figura 4 mostra que os pontos estão separados em dois grupos, o que invalida a significância da regressão (Drummond & Vowler 2012). Entre os sete grupos a correlação não foi significativa ($R=0,084$, $p=0,382$, figura 4b) e entre os três grupos inferidos pela BAPS compostos por mais de duas populações, a correlação foi positiva e baixa para o grupo I ($R=0,411$, $p=0,043$, figura 5a) e não foi significativa para os grupos II e IV (figura 5b e 5c, respectivamente). Contudo, no grupo I os pontos também estão agrupados em dois grupos tornando a correlação inválida. As matrizes utilizadas nos testes de Mantel são apresentadas nas tabelas anexas de 2 a 6.

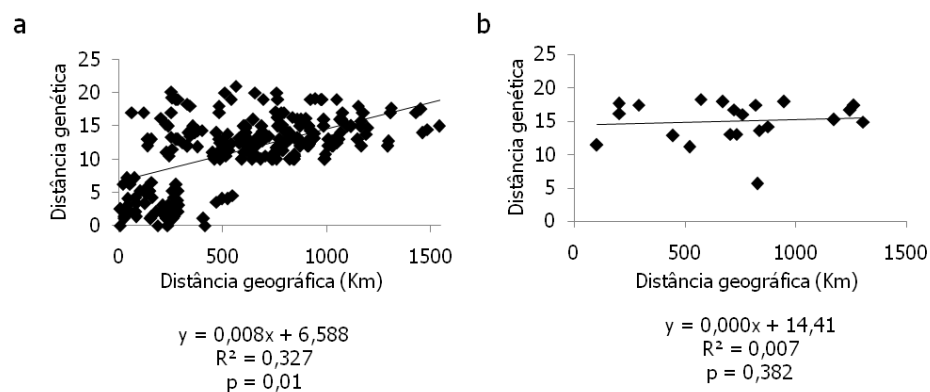


Figura 4. Correlação entre distâncias genética (número médio de substituições) e geográfica (Km); a) Interpopulacional; b) Entre grupos.

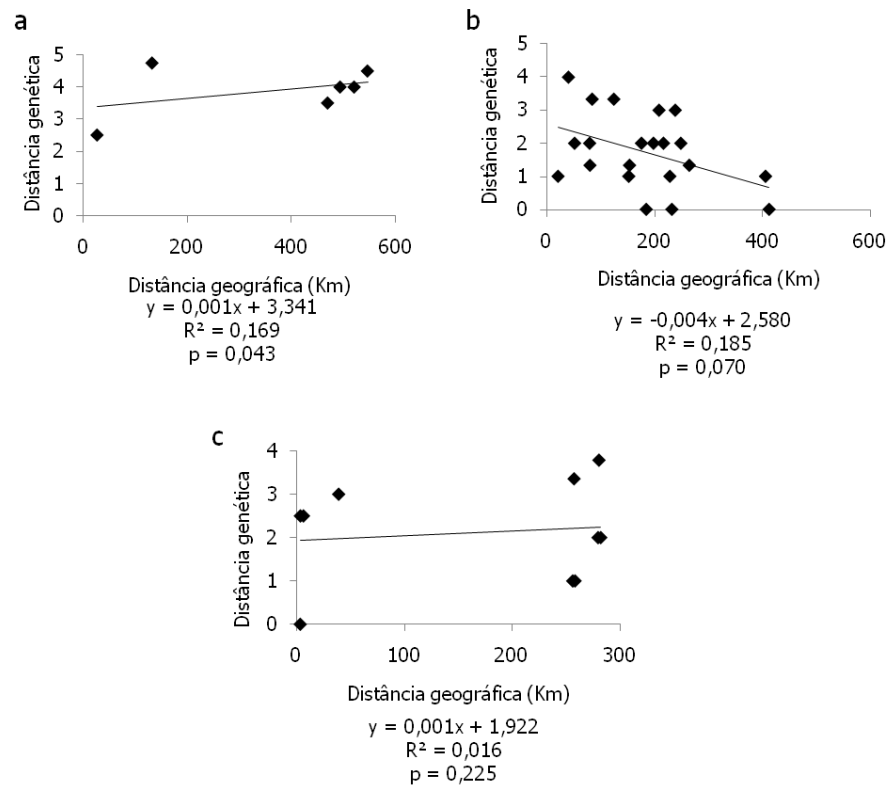


Figura 5. Correlação entre distâncias genética (número médio de substituições) e geográfica (Km) nos grupos que apresentam mais que duas populações.; a) grupo I; b) grupo II; c) grupo IV.

Relações evolutivas e tempos de divergência e entre os haplótipos

A figura 6 apresenta a rede haplotípica das sequências concatenadas. Devido à existência da deleção de 414 pb em H4 e H9 a posição desses haplótipos na rede foi inferida a partir da construção de uma rede haplotípica utilizando uma matriz que desconsiderava a região da deleção para todos os demais indivíduos e está apresentada em linha pontilhada. Essa metodologia foi utilizada pois o indel de 414 pb se sobrepõe a diversas substituições, de forma que optamos por manter essa região para os demais haplótipos. Tal procedimento não provocou alterações na topologia geral e apenas aumentou a resolução das relações entre os haplótipos. A topologia da rede reflete a distribuição geográfica dos grupos de populações inferidos pela BAPS. Apenas a população M04 é composta por haplótipos provenientes de linhagens distintas, H8 e H9, ambos exclusivos dessa população (figura 3b, tabela 5). Os sete grupos são apresentados de acordo com as cores da figura 3.

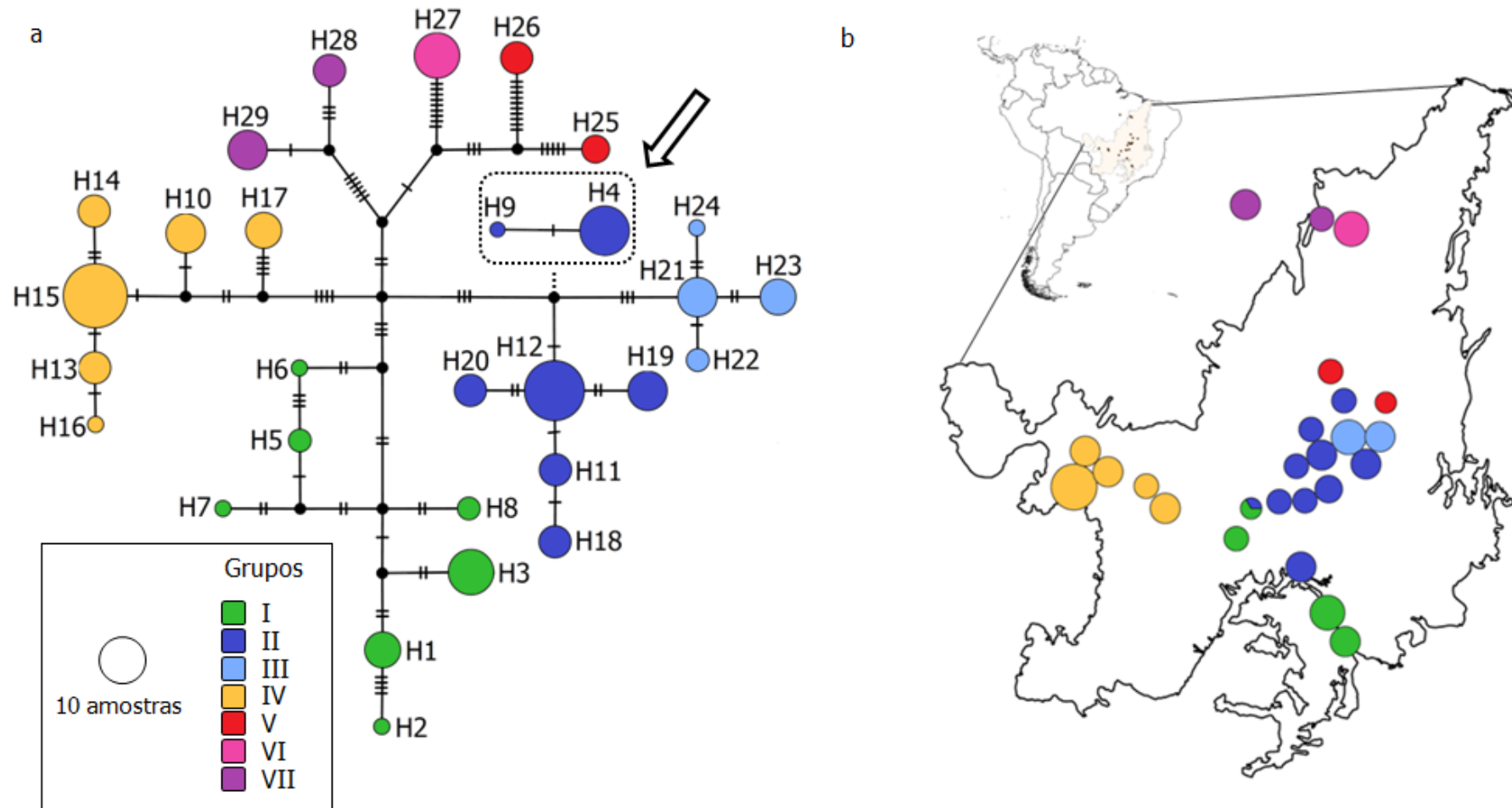


Figura 6. Rede de haplótipos das sequências (a) e distribuição geográfica dos grupos (b). - passos mutacionais hipotéticos, • haplótipos inferidos. As cores indicam grupos genéticos (figura 3). A seta indica os haplótipos H9 e H4, portadores da deleção de 414 pb.

O cladograma da inferência filogenética bayesiana é apresentada na figura 7. Cada um dos sete grupos identificados pela BAPS forma uma linhagem monofilética com Probabilidade Posterior maior ou igual a 97% e as relações entre essas linhagens têm Probabilidades Posteriores superiores a 90%, com exceção da relação entre V e VI. Os grupos estão representados de acordo as cores da figura 3. Os intervalos de 95% de *Highest Posterior Density* (HPD) para os tempos de divergência dos grupos se sobrepõe. A taxa de substituição inferida foi de 0,001016 substituições/sítio/10⁶ anos.

Demografia histórica dos clados principais

Os índices D (Tajima 1989), Fs (Fu 1997) e R2 (Ramos-Onsins & Rozas 2002) não foram significativos para *Mandirola* como um todo ou para os grupos (tabela 7). A variação demográfica populacional dos *skyline plots* não ultrapassou os intervalos de confiança e, portanto, mesmo nos casos onde é observada uma tendência à redução demográfica recente é possível que os tamanhos populacionais tenham se mantido constantes ao longo do tempo (figura 8). Com exceção do grupo III, os histogramas de diferenças par a par (*mismatch distributions*) são multimodais (Figura 8); no grupo III, apesar de unimodal, o histograma observado não se ajusta ao esperado no caso de expansão populacional recente. Dessa forma, os histogramas de diferenças par a par também indicam estabilidade populacional.

Tabela 7. Testes de neutralidade dos marcadores plastidiais concatenados. Valores calculados excluindo indivíduos com haplótipos com a deleção de 414pb na região *trnQ-5'-rps16*.

Grupo	N	D		Fs		R2	
		teste	p-valor	teste	p-valor	teste	p-valor
I*	20	-0,9650	0,1900	6,7987	0,9900	0,1035	0,1960
II*	32	0,3841	0,6720	0,9000	0,7440	0,1411	0,6900
III	14	-0,5601	0,2710	2,8694	0,9050	0,1599	0,5400
IV	36	0,0035	0,5600	2,9871	0,8850	0,1191	0,5630
V	7	2,1634	0,9980	8,5875	0,9990	0,2857	0,9440
VI	8	-	-	-	-	-	-
VII	10	1,8305	0,9810	6,8586	0,9920	0,2667	0,9370
Total*	127	-0,5399	0,3480	6,7440	0,9280	0,0788	0,3810

* valores calculados excluindo indivíduos com haplótipos apresentando a deleção de 414pb na região *trnQ-5'-rps16*.

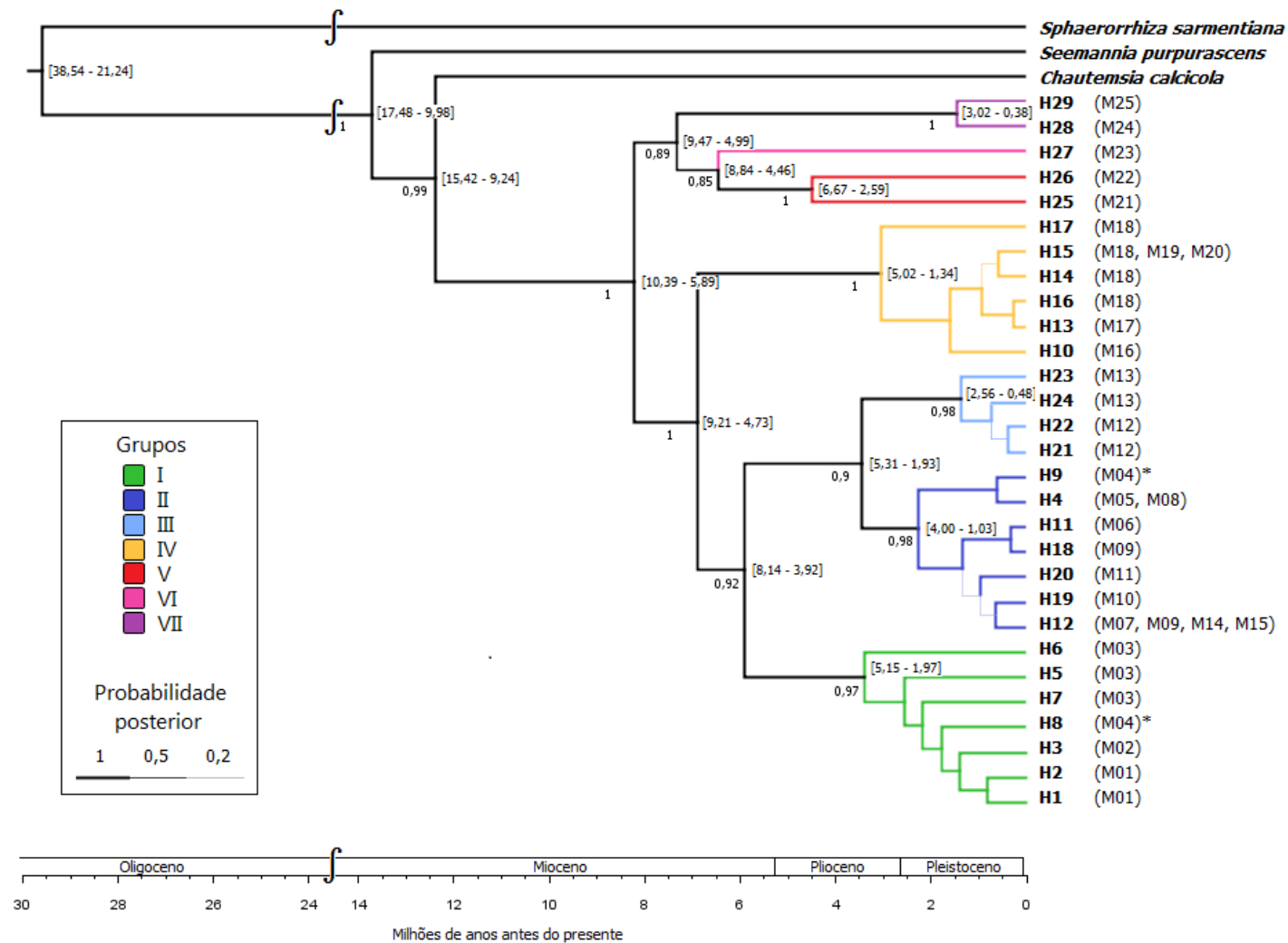


Figura 7. Inferência filogenética bayesiana dos haplótipos. Os intervalos de 95% de HPD para os tempos de divergência são indicados a direita dos nós e a Probabilidade Posterior sob os ramos. A distribuição dos haplótipos nas populações é apresentada entre parênteses. * única localidade que possui haplótipos de grupos genéticos distintos

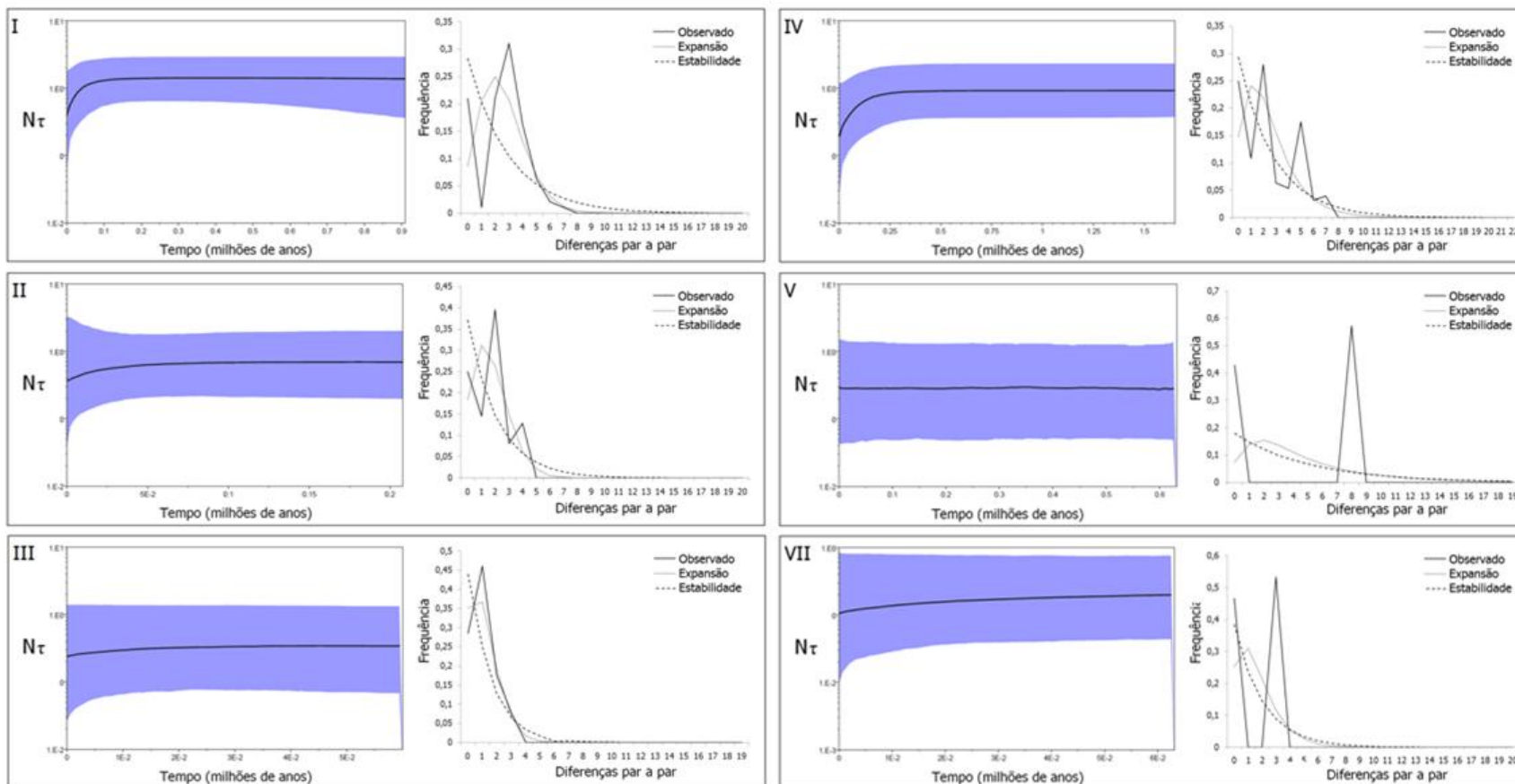


Figura 8. Skyline plots e histogramas de diferenças par a par dos seis grupos que apresentam mais que um haplótipo.

Discussão

De modo geral, *Mandirola* apresenta valores de variabilidade genética superiores aos que encontramos em outros trabalhos com plantas que se distribuem ao longo do Cerrado (tabela 8).

Tabela 8. Exemplos de diversidade genética de plantas ocorrentes nas fisionomias do bioma Cerrado. h : diversidade haplotípica, π : diversidade nucleotídica, s.s.: *sensu stricto*. Quando mais que um valor total é apresentado na publicação, o valor apresentado na tabela foi o maior.

Grupo	Fitofisionomia (distribuição)	Dispersão de sementes	h	π	Referência
<i>Plathymenia reticulata</i>	Cerrado s.s. (continua)	Anemocoria	0,900	0,00250	Novaes <i>et al.</i> 2010
<i>Dalbergia miscolobium</i>	Cerrado s.s.(continua)	Anemocoria	0,794	0,00289	Novaes <i>et al.</i> 2013
<i>Caryocar brasiliense</i>	Cerrado s.s.(continua)	Zoocoria	0,624	0,00290	Collevatti <i>et al.</i> 2012b
<i>Hymenaea stignocarpa</i>	Cerrado s.s.(continua)	Zoocoria (cutia)	0,840	0,00300	Ramos <i>et al.</i> 2007
<i>Mauritia flexuosa</i>	Vereda (disjunta)	Hidrocoria e zoocoria	0,786	0,00370	de Lima <i>et al.</i> 2014
<i>Vellozia hirsuta</i>	Campos rupestres (disjunta)	?	0,802	0,00390	Barbosa <i>et al.</i> 2012
<i>Pilosocereus aurisetus</i>	Cerrado rupestres (disjunta)	?	-	0,00430	Bonatelli <i>et al.</i> 2014
<i>Tibouchina papyrus</i>	Cerrado rupestres (disjunta)	Autocoria	0,775	0,00460	Collevatti <i>et al.</i> 2012a
<i>Lychnophora ericoides</i>	Cerrado rupestres (disjunta)	Anemocoria	0,399	0,00600	Collevatti <i>et al.</i> 2009
<i>Mandirola</i>	Cerrado rupestres (disjunta)	?	0,949	0,01558	

As elevadas diversidades haplotípica e nucleotídica totais de *Mandirola* contrastam-se com as baixas diversidades intrapopulacionais, com 18 das 25 populações fixadas para algum haplótipo. Esse contraste pode ter sido ocasionado por deriva genética atuando sobre populações pequenas e isoladas em um grupo com ampla área de ocorrência. Outras plantas do Cerrado também exibem um padrão semelhante, com baixa variabilidade intrapopulacional e maior diversidade total, como a palmeira *Mauritia flexuosa* (de Lima *et al.* 2014), que apresenta 62% das populações monomórficas, e o complexo *Pilosocereus aurisetus* (Cactaceae), que apresenta, em 33 populações, 29 monomórficas (Bonatelli *et al.* 2014).

Em *Mandirola* não ocorre isolamento por distância. A diferenciação é alta mesmo entre populações geograficamente próximas, indicando que a dispersão em *Mandirola* deve ser rara e limitada. Como as sementes de *Mandirola* não têm adaptações aparentes para dispersão de longa distância é esperado que marcadores de cpDNA indiquem baixa

conectividade entre as populações. Além disso, a matriz entre as manchas de habitat pode agir como uma barreira ao fluxo gênico para *Mandirola*. No Cerrado é comum encontrar haplótipos exclusivos mesmo em populações de plantas com alta capacidade de dispersão de sementes (Ramos *et al.* 2007; Novaes *et al.* 2010, 2013; Collevatti *et al.* 2012b; de Lima *et al.* 2014) e a diferenciação em marcadores citoplasmáticos é ainda mais acentuada em plantas ocorrentes em fitofisionomias disjuntas e rupestres. O padrão de elevada diferenciação em organismos de afloramentos rochosos tem sido associado ao caráter descontínuo desse ambiente, propício à divergência populacional por deriva genética (Palma-Silva *et al.* 2011; Barbosa *et al.* 2012; Collevatti *et al.* 2012a; Werneck *et al.* 2012; Bonatelli *et al.* 2014; Pinheiro *et al.* 2014; Tapper *et al.* 2014a; b; Nistelberger *et al.* 2015).

A variabilidade genética está estruturada em sete grupos, cada um deles geograficamente bem delimitado. A AMOVA indica que 73% da variabilidade total observada está entre esses grupos. Todas as populações possuem haplótipos de um único grupo genético com exceção da população M04, que apresenta haplótipos dos grupos I e II e localiza-se entre eles, em posição centro-sul na distribuição de *Mandirola*. Contudo, os dois haplótipos nela observados (H8 e H9) são exclusivos, indicando que o evento de migração que resultou na composição mista dessa população não é recente. No Cerrado a ocorrência de estruturação geográfica é comum tanto em plantas com distribuição contínua (Lacerda *et al.* 2001; Zucchi *et al.* 2003; Ramos *et al.* 2007; Novaes *et al.* 2010, 2013; Viana & Lovato 2010; de Mendonça *et al.* 2012; Diniz-Filho *et al.* 2013) quanto em plantas apresentando distribuição disjunta (Jesus *et al.* 2001; Franceschinelli *et al.* 2006; Ribeiro *et al.* 2008; Collevatti *et al.* 2009, 2012a; Barbosa *et al.* 2010, 2012; Lousada *et al.* 2011, 2013; Bonatelli *et al.* 2014; de Lima *et al.* 2014), o que foi evidenciado com o uso de diversos tipos de marcadores moleculares (como alozimas, SSR, RAPD, ISSR, cpDNA).

A rede haplotípica de *Mandirola* destaca-se por apresentar a maior parte dos haplótipos amostrados em posição terminal. Associado ao fato de que apenas três dos 25 haplótipos são compartilhados, tal padrão reforça um longo tempo de isolamento entre as populações. Além disso, os testes de neutralidade não indicam expansões populacionais, os *skyline plots* indicaram estabilidade populacional e os histogramas de diferenças par a par também apontaram história demográfica constante ao longo do Pleistoceno. Diferente do que é observado em *Mandirola*, a expansão da distribuição geográfica a partir de refúgios pleistocênicos tem sido descrita para alguns grupos de plantas ocorrentes no Cerrado (Ramos *et al.* 2007, 2009; Collevatti *et al.* 2009; Barbosa *et al.* 2012; Novaes *et al.* 2013). Contudo, o padrão de persistência local durante os ciclos glaciais pleistocênicos e elevado isolamento têm

sido relatados para organismos ocorrentes em afloramentos rochosos e inselbergs (Byrne & Hopper 2008; Werneck *et al.* 2012; Pinheiro *et al.* 2014; Tapper *et al.* 2014a; b).

Ainda que os sete grupos indicados pela BAPS apresentem distribuição geográfica não sobreposta, as causas dessa distribuição não parecem estar associadas às bacias hidrográficas ou a regiões biogeográficas do Cerrado. O padrão observado em *Mandirola* não está relacionado às bacias hidrográficas, como ocorre com a palmeira *Mauritia flexuosa* (de Lima *et al.* 2014), pois populações de todos os grupos ocorrem na bacia do Tocantins e populações dos grupos I, II, IV e V ocorrem em mais de uma bacia hidrográfica. O padrão também não está associado às regiões do Cerrado propostas por Ratter *et al.* (2003), como ocorre com a árvore *Dalbergia miscolobium* (Novaes *et al.* 2013), pois a maior parte das populações de *Mandirola* ocorre nos limites entre essas regiões e alguns grupos ocorrem em mais de uma região. Além disso, em alguns casos a distribuição dos grupos no espaço geográfico não segue as suas relações filogenéticas. Por exemplo, os grupos V e VI, ainda que agrupados na filogenia, encontram-se separados por uma grande distância geográfica. Dentro de cada um dos grupos também não parece haver um padrão filogeográfico, o que pode estar relacionada ao processo de dispersão de *Mandirola*. Roalson *et al.* (2008) sugerem que nesse grupo a dispersão estaria associada a eventos raros e incidentais ocasionados por animais e cursos d'água, o que explicaria a causa da estocasticidade na distribuição geográfica dos haplótipos pertencentes a cada grupo.

A inferência filogenética bayesiana indica que parte da diversificação de cada uma das linhagens principais do grupo *Mandirola* ocorreu durante o último milhão de anos, mas que o surgimento dos grupos foi anterior. A origem de *Mandirola* remonta a cerca de 8 Ma, quando o clima tornou-se mais seco, frio e sazonal em todo o mundo (Micheels *et al.* 2007, 2011; Potter & Szatmari 2009; Knorr *et al.* 2011). Além disso, a expansão das gramíneas C4, um dos fatores mais relevantes no surgimento das savanas, ocorreu entre de 6 Ma e 8 Ma atrás (Keeley & Rundel 2005). Micheels *et al.* (2007) sugerem que grande parte da região hoje ocupada pelo Cerrado foi ocupada por florestas até o Mioceno e Fanton *et al.* (2012) descreveram fósseis de árvores com características de florestas tropicais úmidas que remontam ao Eoceno/Oligoceno em regiões hoje ocupadas pelo Cerrado. Ainda que ocorra quase que exclusivamente no bioma Cerrado, *Mandirola* está associada a micro-habitats úmidos de afloramentos rochosos; é possível que sua dispersão geográfica tenha ocorrido antes do estabelecimento da matriz savânica atual. A capacidade dos afloramentos rochosos de conservarem micro-habitats úmidos mesmo em matrizes secas (Main 1997; Schut *et al.* 2014) pode ter propiciado a manutenção de *Mandirola* ao longo dos últimos milhões de anos.

A expansão das savanas parece ter fragmentado e impedido a conectividade entre áreas potenciais de ocorrência do grupo, levando à compartimentalização e à elevada estruturação que é observada. Além das características de seu habitat, a permanência de *Mandirola* ao longo dos últimos 8 Ma pode ter sido favorecida pelo ciclo fenológico de Gloxinieae, com um período de dormência anual, que em *Mandirola* coincide com a estação seca e ocorre de julho a novembro.

Os padrões de diversidade, distribuição geográfica das linhagens de cpDNA e demografia de *Mandirola* dão suporte à hipótese de fragmentação de uma distribuição previamente conectada, não sendo indicativos de sucessivos eventos de colonização e expansão recentes. Os resultados apontam que *Mandirola* possivelmente ocupou o espaço geográfico de maneira mais contínua no passado e sugerem que mudanças na matriz que envolve os afloramentos rochosos durante o Mioceno podem ter levado ao isolamento por longos períodos de tempo e à consequente diferenciação populacional associada à redução de fluxo gênico.

A utilização de marcadores de cpDNA para testar as hipóteses de “fragmentação” e “sucessivos eventos de colonização” em *Mandirola* ofereceu uma primeira avaliação dos padrões de diversificação de um grupo herbáceo ocorrente em formações úmidas do Cerrado. O estudo genético de organismos não modelo, como é o caso de *Mandirola*, ainda apresenta desafios técnicos, porém superáveis. O estudo dos padrões genéticos plastidiais do grupo *Mandirola* forneceu informações relevantes sobre a história evolutiva desse grupo e abriu caminho para uma melhor compreensão dos padrões que originaram a diversidade de espécies do Cerrado. Estudos futuros utilizando marcadores nucleares poderão complementar o presente trabalho.

Conclusões

Os resultados permitem concluir que em *Mandirola hirsuta*:

- A alta diferenciação interpopulacional indica baixa capacidade de dispersão de sementes;
- A variabilidade genética está estruturada em sete grupos geograficamente bem delimitados que formam linhagens monofiléticas;
- A diferenciação entre as linhagens ocorreu entre o Mioceno tardio e Plioceno;
- A distribuição da variabilidade genética sugere um cenário de isolamento entre os grupos e intensa deriva genética;
- Os resultados apóiam a hipótese de uma distribuição passada mais ampla, fragmentado com a expansão das vegetações savânicas do Cerrado.

Referências

- Antonelli A, Sanmartín I (2011) Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon*, 60, 403–414.
- Araujo A (2007) Estudos Taxonômicos em *Gloxinia* L' Hér. sensu lato (Gesneriaceae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Araujo AO, Souza VC, Chautems A (2012) Estudos taxonômicos em Gloxinieae (Gesneriaceae) – notas nomenclaturais. *Acta Botanica Brasilica*, 26, 891–900.
- Armijo R, Lacassin R, Coudurier-curveur A, Carrizo D (2015) Coupled tectonic evolution of Andean orogeny and global climate. *Earth-Science Reviews*, 143, 1–35.
- Barbosa AR, Fiorini CF, Silva-Pereira V, Mello-Silva R, Borba EL (2012) Geographical genetic structuring and phenotypic variation in the *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) ochlopecies complex. *American Journal of Botany*, 99, 1477–1488.
- Barbosa TCS, Sibov ST, Telles MPC, Soares TN (2010) Genetic characterization of natural populations of the medicinal plant *Palicourea coriacea* (Rubiaceae) with molecular markers. *Genetics and Molecular Research*, 9, 695–704.
- Bonatelli IAS, Perez MF, Peterson AT et al. (2014) Interglacial microrefugia and diversification of a cactus species complex: Phylogeography and palaeodistributional reconstructions for *Pilosocereus aurisetus* and allies. *Molecular Ecology*, 23, 3044–3063.
- Bouckaert R, Heled J, Kühnert D et al. (2014) BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology*, 10, 1–6.
- Burnham RJ, Graham A (1999) The History of Neotropical Vegetation: New Developments and Status. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 86, 546–589.
- Bush M, Flenley J (2007) *Tropical Rainforest Responses to Climatic Change*. Springer Berlin Heidelberg.
- Byrne M, Hopper SD (2008) Granite outcrops as ancient islands in old landscapes: Evidence from the phylogeography and population genetics of *Eucalyptus caesia* (Myrtaceae) in Western Australia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93, 177–188.
- Carvalho GH, Batalha MA, Silva IA, Cianciaruso MV, Petchey OL (2014) Are fire, soil fertility and toxicity, water availability, plant functional diversity, and litter decomposition related in a Neotropical savanna? *Oecologia*, 175, 923–935.
- Collevatti RG, de Castro TG, Lima JDS, Telles MPDC (2012a) Phylogeography of *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae), an endangered tree species from rocky savannas,

- suggests bidirectional expansion due to climate cooling in the pleistocene. *Ecology and Evolution*, 2, 1024–1035.
- Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD (2003) Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. *Molecular Ecology*, 12, 105–115.
- Collevatti RG, Lima-Ribeiro MS, Souza-Neto AC et al. (2012b) Recovering the demographical history of a Brazilian cerrado tree species *Caryocar brasiliense*: Coupling ecological niche modeling and coalescent analyses. *Natureza e Conservação*, 10, 169–176.
- Collevatti RG, Rabelo SG, Vieira RF (2009) Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. *Annals of Botany*, 655–664.
- Corander J, Marttinen P, Sirén J, Tang J (2008) Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC bioinformatics*, 9, 539.
- Corander J, Tang J (2007) Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Mathematical Biosciences*, 205, 19–31.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*, 9, 772.
- D’Amen M, Zimmermann NE, Pearman PB (2013) Conservation of phylogeographic lineages under climate change. *Global Ecology and Biogeography*, 22, 93–104.
- Decaisne J (1848) Gesneriaceae. *Revue Horticole*, 20, 461–469.
- Diniz-Filho JAF, de Campos Telles MP, Bonatto SL et al. (2008) Mapping the evolutionary twilight zone: Molecular markers, populations and geography. *Journal of Biogeography*, 35, 753–763.
- Diniz-Filho JAF, Soares TN, Lima JS et al. (2013) Mantel test in population genetics. *Genetics and Molecular Biology*, 36, 475–485.
- Doyle J, Doyle J (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 1185–1192.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1969–1973.
- Drummond GB, Vowler SL (2012) Categorized or continuous? Strength of an association and linear regression. *AJP: Advances in Physiology Education*, 36, 89–92.

- Edgar RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792–1797.
- Excoffier L, Lischer HEL (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.
- Fanton JCM, Ricardi-Branco F, Silva AM (2012) *Terminalia palaeopubescens* sp. nov. (Combretaceae) da Formação Fonseca (Eoceno/Oligoceno) de Minas Gerais, Brasil: Morfologia Foliar, Fungos Epifílicos Associados e Paleoclima. *Ameghiniana*, 49, 273–288.
- Feres F, Zucchi MI, Souza AP, Amaral M do CE, Bittrich V (2009) Phylogeographic studies of Brazilian “campo-rupestre” species: *Wunderlichia mirabilis* Riedel ex Baker (Asteraceae). *Biotemas*, 22, 17–26.
- Franceschinelli EV, Jacobi CM, Drummond MG, Resende MFS (2006) The genetic diversity of two Brazilian *Vellozia* (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. *Annals of Botany*, 97, 585–592.
- Frankham R, Ballou J, Briscoe, D (2008) *Fundamentos de Genética da Conservação*. Sociedade Brasileira de Genética.
- French N, Yu S, Biggs Pet al.(2013) Evolution of *Campylobacter* species in New Zealand. Horizon Scientific Press.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915–925.
- Gouveia SEM, Pessenda LCR, Aravena R et al. (2002) Carbon isotopes in charcoal and soils in studies of paleovegetation and climate changes during the late Pleistocene and the Holocene in the southeast and centerwest regions of Brazil. *Global and Planetary Change*, 33, 95–106.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hanstein, J (1864) Gesneriaceae. In: Martius, C. (Ed.). *Flora Brasiliensis*, 8, 342–428.
- Hickerson MJ, Carstens BC, Cavender-Bares J et al. (2010) Phylogeography’s past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 291–301.
- IBGE(2004) Mapa de Biomas do Brasil, primeira aproximação. Acessível em ftp://geofp.ibge.gov.br/mapas_tematicos/mapas_murais/biomas.pdf. Acessado em 23 de abril de 2015.
- Jesus FF, Solferini VN, Semir J, Prado PI (2001) Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, 226, 59–68.

- Keeley JE, Rundel PW (2005) Fire and the Miocene expansion of C4 grasslands. *Ecology Letters*, 8, 683–690.
- Kelchner SA, Clark LG (1997) Molecular evolution and phylogenetic utility of the chloroplast rpl16 intron in *Chusquea* and the Bambusoideae (Poaceae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 8, 385–397.
- Kline KL, Martinelli FS, Mayer AL et al. (2015) Bioenergy and Biodiversity: Key Lessons from the Pan American Region. *Environmental Management*.
- Knorr G, Butzin M, Micheels A, Lohmann G (2011) A warm Miocene climate at low atmospheric CO₂ levels. *Geophysical Research Letters*, 38, 1–5.
- Lacerda DR, Acedo MD, Filho JP, Lovato MB (2001) Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymania reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. *Molecular ecology*, 10, 1143–1152.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Lima NE, Lima-Ribeiro MS, Tinoco CF, Terribile LC, Collevatti RG (2014) Phylogeography and ecological niche modelling, coupled with the fossil pollen record, unravel the demographic history of a Neotropical swamp palm through the Quaternary. *Journal of Biogeography*, 41, 673–686.
- Lousada JM, Borba EL, Ribeiro KT, Ribeiro LC, Lovato MB (2011) Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: Implications for conservation. *Genetica*, 139, 431–440.
- Lousada JM, Lovato MB, Borba EL (2013) High genetic divergence and low genetic variability in disjunct populations of the endemic *Vellozia compacta* (Velloziaceae) occurring in two edaphic environments of Brazilian campos rupestres. *Revista Brasileira de Botânica*, 36, 45–53.
- Main BY (1997) Granite outcrops: a collective ecosystem. *Journal of the Royal Society of Western Australia*, 80, 113–122.
- Mantel N (1967) The detection of disease Clustering and Generalized Regression Approach. *Cancer research*, 209–220.
- Marchant R, Cleef A, Harrison SP et al. (2009) Pollen-based biome reconstructions for Latin America at 0, 6000 and 18 000 radiocarbon years ago. , 725–767.
- Maurin O, Davies TJ, Burrows JE et al. (2014) Savanna fire and the origins of the “underground forests” of Africa. *The New phytologist*, 201–214.

- Mendonça PC, Bertoni BW, Amui SF et al. (2012) Genetic diversity of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville determined by AFLP molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 41, 16–20.
- Micheels A, Bruch AA, Eronen J et al. (2011) Analysis of heat transport mechanisms from a Late Miocene model experiment with a fully-coupled atmosphere-ocean general circulation model. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 304, 337–350.
- Micheels A, Bruch AA, Uhl D, Utescher T, Mosbrugger V (2007) A Late Miocene climate model simulation with ECHAM4/ML and its quantitative validation with terrestrial proxy data. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 253, 267–286.
- Müller K (2005) SeqState: Primer Design and Sequence Statistics for Phylogenetic DNA Datasets. *Applied Bioinformatics*, 4, 65–69.
- Myers N, Fonseca GAB, Mittermeier RA, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–8.
- Nistelberger HM, Byrne M, Coates D, Roberts JD (2015) Genetic drift drives evolution in the bird-pollinated, terrestrial island endemic *Grevillea georgeana* (Proteaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 178, 155–168.
- Novaes RML, Lemos Filho JP de, Ribeiro RA, Lovato MB (2010) Phylogeography of *Plathyminia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology*, 19, 985–998.
- Novaes RML, Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Lovato MB (2013) Concordance between phylogeographical and biogeographical patterns in the Brazilian Cerrado: Diversification of the endemic tree *Dalbergia miscolobium* (Fabaceae). *PLoS ONE*, 8.
- Oliveira G, Lima-Ribeiro MS, Terribile LC et al. (2015) Conservation biogeography of the Cerrado's wild edible plants under climate change: Linking biotic stability with agricultural expansion. *American Journal of Botany*, 102, 1–8.
- Olsen KM (2002) Population history of *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) inferred from nuclear DNA sequences. *Molecular Ecology*, 11, 901–911.
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F et al. (2011) Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology*, 20, 3185–3201.
- Pennington RT, Hughes CE (2014) The remarkable congruence of New and Old World savanna origins. *New Phytologist*, 204, 4–6.

- Pennington, RT & Ratter JA (2006) Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography, and conservation. CRC Press.
- Perret M, Chautems A, Araujo AO, Salamin N (2013) Temporal and spatial origin of Gesneriaceae in the New World inferred from plastid DNA sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171, 61–79.
- Pinheiro F, Cozzolino S, Draper D et al. (2014) Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. *BMC evolutionary biology*, 14, 49.
- Potter PE, Szatmari P (2009) Global Miocene tectonics and the modern world. *Earth-Science Reviews*, 96, 279–295.
- Rambaut A, Drummond AJ (2009) Tracer v1.5. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramos ACS, De Lemos-Filho JP, Lovato MB (2009) Phylogeographical structure of the neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. *Journal of Heredity*, 100, 206–216.
- Ramos ACS, Lemos-Filho JP, Ribeiro RA, Santos FR, Lovato MB (2007) Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian cerrado. *Annals of Botany*, 100, 1219–1228.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular biology and evolution*, 19, 2092–2100.
- Ratter JA, Bridgewater S, Ribeiro JF (2003) Analysis of the Floristic Composition of the Brazilian Cerrado Vegetation III: Comparison of the Woody Vegetation of 376 Areas. *Edinburgh Journal of Botany*, 60, 57–109.
- Ribeiro PL, Borba EL, Smidt EC et al. (2008) Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: Implications for taxonomy and biogeography. *Plant Systematics and Evolution*, 270, 109–137.
- Roalson EH, Boggan JK, Skog LE, Zimmer EA. (2005) Untangling Gloxinieae (Gesneriaceae). I. Phylogenetic patterns and generic boundaries inferred from nuclear, chloroplast, and morphological cladistic datasets. *Taxon*, 54, 389–410.
- Roalson EH, Skog LE, Zimmer EA. (2008) Untangling Gloxinieae (Gesneriaceae). II. Reconstructing Biogeographic Patterns and Estimating Divergence Times Among New World Continental and Island Lineages. *Systematic Botany*, 33, 159–175.
- Sano EE, Rosa R, Brito JLS, Ferreira LG (2010) Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environmental monitoring and assessment*, 166, 113–124.

- Schut AGT, Wardell-Johnson GW, Yates CJ et al. (2014) Rapid characterisation of vegetation structure to predict refugia and climate change impacts across a global biodiversity hotspot. *PLoS ONE*, 9.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT et al. (2005) The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92, 142–166.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The Tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94, 275–288.
- Silva JF, Fariñas MR, Felfili JM, Klink CA. (2006) Spatial heterogeneity, land use and conservation in the cerrado region of Brazil. *Journal of Biogeography*, 33, 536–548.
- Simmons MP, Ochoterena H (2000) Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic biology*, 49, 369–381.
- Simon MF, Grether R, de Queiroz LP et al. (2009) Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 20359–20364.
- Staden R (1996) The Staden sequence analysis package. *Molecular biotechnology*, 5, 233–241.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105–1109.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
- Tapper SL, Byrne M, Yates CJ et al. (2014a) Prolonged isolation and persistence of a common endemic on granite outcrops in both mesic and semi-arid environments in south-western Australia. *Journal of Biogeography*, 2032–2044.
- Tapper SL, Byrne M, Yates CJ et al. (2014b) Isolated with persistence or dynamically connected? Genetic patterns in a common granite outcrop endemic. *Diversity and Distributions*, 20, 987–1001.
- Tate JA, Simpson BB (2003) Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany*, 28, 723–737.
- Terribile LC, Lima-Ribeiro MS, Araújo MB et al. (2012) Areas of climate stability of species ranges in the Brazilian cerrado: Disentangling uncertainties through time. *Natureza e Conservação*, 10, 152–159.

- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22, 1193–1213.
- Viana HA, Lovato MB (2010) Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: Implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 49–56.
- Weber A (2004) Flowering Plants - Dicotyledons (JW Kadereit, Ed.). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Weber A, Skog L (2007 onwards). The genera of Gesneriaceae: basic information with illustration of selected species. Acessível em: <http://www.genera-gesneriaceae.at/> Acessado em 3 de março de 2013.
- Werneck FP (2011) The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Reviews*, 30, 1630–1648.
- Werneck FP, Gamble T, Colli GR, Rodrigues MT, Sites JW (2012) Deep diversification and long-term persistence in the south american “dry diagonal”: Integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. *Evolution*, 66, 3014–3034.
- Whittaker, RJ & Fernández-Palacios, JM (2007) Island biogeography. Ecology, evolution and conservation. Oxford University Press.
- Wiehler, H (1976) A report on the classification of *Achimenes*, *Eucodonia*, *Gloxinia*, *Goyazia* and *Anetanthus* (Gesneriaceae). *Selbyana*, 1, 374–404.
- Zucchi MI, Brondani RPV, Pinheiro JB et al. (2003) Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genetics and Molecular Biology*, 26, 449–457.

Anexos

Especificações da inferência filogenética bayesiana

A codificação binária de indels de cada uma das regiões estudadas foi incluída como partição independente de dados. A seleção de modelos foi baseada no Critério de Informação Bayesiana (BIC) implementada pelos programas MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013) e JModelTest2 (Darriba *et al.* 2012). Os modelos HKY e HKY+G foram selecionados para as partições de sequências nucleotídicas *psbA-trnH* e *trnQ-5'-rps16*, respectivamente. A frequência das bases foi empiricamente calculada e fixada para as proporções observadas no conjunto de dados. Para as partições binárias foi utilizado o modelo estocástico de Dollo, sob a premissa de que caracteres perdidos em uma deleção não serão readquiridos. As árvores foram inferidas sob os modelos de "constant size" e o relógio utilizado foi estrito. Para o grupo *Mandirola* foi utilizado T_{mrca} de 7,1196 Ma, com 1,6 desvios padrão (Perret *et al.* 2013), e para o grupo *Seemannia+Sphaerorrhiza* T_{mrca} de 35,0000 Ma, com 6,5 desvios padrão (Roalson *et al.* 2008). Foram realizadas 10^7 iterações, com amostragem de árvores a cada 10^3 gerações.

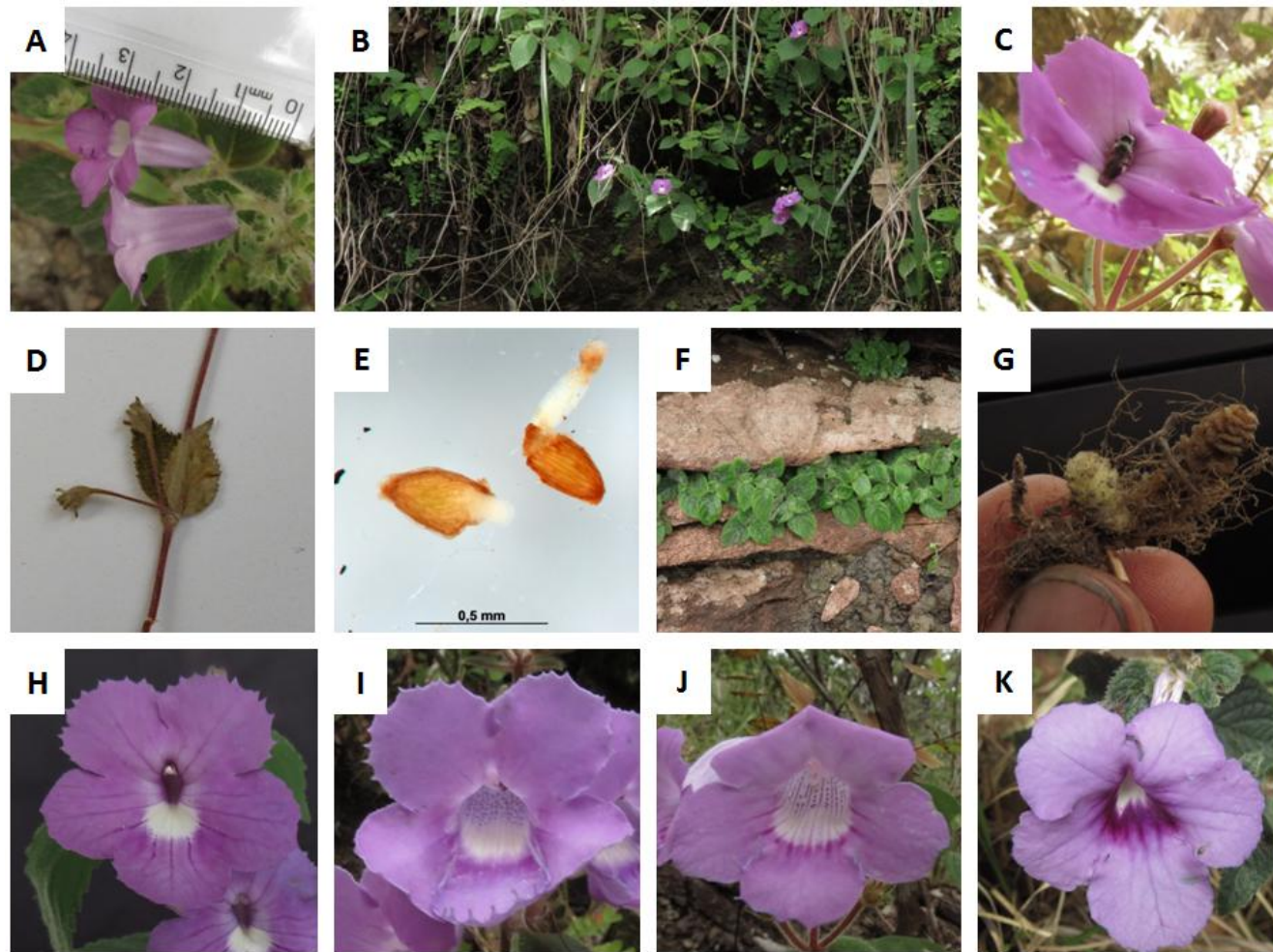


Figura anexa 1. *Mandirola hirsuta*. a) Corola; b) Parte da população M01; c) Visitante floral; d) Frutos; e) Sementes; f) Substrato na população M17; g) Rizoma; h) Indivíduo da população M01; i) Indivíduo da população M07; j) Indivíduo da população M11; k) Indivíduo da população M24.

Tabela anexa 1. Descrição dos 29 haplótipos do grupo *Mandirola* originados da concatenação dos alinhamentos das regiões intergênicas de cpDNA *psbA-trnH* e *trnQ-5'-rps16*. Pontos indicam que o caráter é o mesmo que o do haplótipo H1.

*	<i>psbA-trnH</i>																																											
	22	24	36	42	51	53	62	64	78	79	83	85	87	123-124	125	127	129	135	141-145	144	162	164	165	171	178	179	189	226	228	237	247	250-254	250	253	258	262	264	268	270-274	279				
H1	A	C	1	A	C	T	A	A	T	G	T	A	T	0	G	G	G	G	1	T	G	A	0	T	A	T	C	T	A	0	T	1	T	T	T	G	A	T	1	G				
H2	.	.	0	G		
H3	G	C		
H4	G		
H5	G	0		
H6	G	0		
H7	G		
H8	G	A		
H9	G	A		
H10	.	.	.	C	G	A	.	.	A	T	.	.	G	A		
H11	G	
H12	G	
H13	.	.	.	C	G	.	.	.	A	A	.	.	A	T	A		
H14	.	.	.	C	G	A	.	.	A	T	A	A		
H15	.	.	.	C	G	A	.	.	A	T	A		
H16	.	.	.	C	G	.	.	.	A	A	.	.	A	T	A		
H17	.	.	.	C	G	T	A	.	A	A	0	.	
H18	G	
H19	G	
H20	C	.	.	.	G	
H21	G	T	C	.
H22	G	T
H23	G	0	.	.	T	.	.	.	A
H24	G	T	G
H25	G	C	C	1
H26	G	A	.	.	.	1	A	A	T	T	1	.	G	1
H27	G	G	C	1	.	G	G	.	T	
H28	.	T	.	.	G	.	.	G	1	0	.	.	.	A	A
H29	.	T	.	.	G	.	.	G	1	A	A

(continua)

* Os sítios foram numerados a partir do início das regiões *psbA-trnH* e *trnQ-rps16* após a remoção das extremidades das sequências. Sítios polimórficos removidos do alinhamento da região *psbA-trnH* por proporcionarem alinhamento ambíguo não são apresentados.

Tabela anexa 1. Descrição dos 29 haplótipos do grupo *Mandirola* originados da concatenação dos alinhamentos das regiões intergênicas de cpDNA *psbA-trnH* e *trnQ-5'-rps1*. Pontos indicam que o caráter é o mesmo que o do haplótipo H1.

*	<i>trnQ-rps16</i>																								
	3-10	53	56-68	106	115	121	134	159	295-304	298	354	387	388	395	433	436	437-847	439	454	460	461	487	516	537	542
H1	0	A	1	G	C	C	G	G	1	C	T	T	0	T	C	A	1	T	A	C	T	C	T	A	T
H2	G
H3	.	.	0
H4	.	.	0	A	1	G	.	.	0
H5	.	.	0	1
H6	.	.	0	1	G
H7	.	.	0	0	.	.	.	1
H8	.	.	0	1	A	.	.
H9	.	.	0	A	1	G	.	.	0
H10	1	.	0	1	G	C
H11	.	C	0	A	1	G	G	.	.	.	C
H12	.	C	0	A	1	G	G	.	.	.	C
H13	1	.	0	.	.	.	C	1	G	C
H14	1	.	0	.	.	.	C	1	G	A	.	C
H15	1	.	0	.	.	.	C	1	G	C
H16	1	.	0	.	.	.	C	1	G	C
H17	1	.	0	1	G	C
H18	.	C	0	A	1	G	G	G	.	.	.	C
H19	.	C	0	A	1	G	.	.	.	C
H20	.	C	0	A	1	G	G	.	.	.	C
H21	.	.	0	.	.	A	.	A	1	G	G	.	.	.	C
H22	.	.	0	.	.	A	.	A	1	G	G	.	.	.	C
H23	.	.	0	.	.	A	.	A	1	G	G	.	.	.	C
H24	.	.	0	.	.	A	.	A	1	G	T	.	G	.	.	.	C
H25	.	.	0	1	G	C
H26	.	.	0	C	.	1	G	.	.	.	G	C
H27	.	.	0	.	A	1	G	A	C	T	C
H28	.	.	0	C	T	.	.	1	G	C
H29	.	.	0	C	T	.	.	1	G	C

(continua)

*Os sítios foram numerados a partir do início das regiões *psbA-trnH* e *trnQ-rps16* após a remoção das extremidades das sequências.

Tabela anexa 1. Descrição dos 29 haplótipos do grupo *Mandirola* originados da concatenação dos alinhamentos das regiões intergênicas de cpDNA *psbA-trnH* e *trnQ-5'-rps16*. Pontos indicam que o caráter é o mesmo que o do haplótipo H1.

(conclusão)

*	<i>trnQ-rps16</i>																								
	563-567	579	580-584	662	665	666	667	668-669	668	669-670	672	675	704	780	782	799	836	874	913	918	919-923	959	966	971	987
H1	1	T	0	A	T	A	A	1	A	1	T	T	A	T	T	A	T	A	T	A	1	A	A	C	C
H2	.	.	.	T
H3	0
H4	C	.	.	.	T	.
H5	T	C	.	.
H6	C	.	T
H7	T	T	C	.	.	.
H8	G
H9	C	.	.	.	T	.
H10	.	C	C	.	.	.	T	.
H11	.	C	G	G	C	.	.	.	T	.
H12	.	C	G	C	.	.	.	T	.
H13	.	C	C	.	.	.	T	.
H14	.	C	C	.	.	.	T	.
H15	.	C	C	.	.	.	T	.
H16	.	C	.	.	G	C	.	.	.	T	.
H17	.	C	A	.	.	C	.	.	.	T	.
H18	.	C	G	G	C	.	.	.	T	.
H19	.	C	G	C	.	.	C	T	.
H20	.	C	G	C	.	.	.	T	.
H21	.	C	G	.	.	.	C	C	.	.	.	T	.
H22	.	C	G	.	.	G	C	C	.	.	.	T	.
H23	.	C	G	.	.	.	C	C	.	.	.	T	.
H24	.	C	G	.	.	.	C	C	.	.	.	T	.
H25	.	C	.	T	.	T	T	0	A	.	.	C	.	.	.	T	T
H26	.	C	.	T	.	T	T	.	T	0	C	.	.	.	T	T
H27	.	C	.	.	.	T	T	C	.	.	.	T	.
H28	0	C	1	.	.	T	C	C	.	.	T	.
H29	0	C	1	.	.	T	G	C	C	.	.	T	.

* Os sítios foram numerados a partir do início das regiões *psbA-trnH* e *trnQ-rps16* após a remoção das extremidades das sequências.

Tabela anexa 2. Matriz de distâncias genética (número de substituições médio para a par, abaixo da diagonal) e geográfica (em quilômetros, acima da diagonal) entre as populações de *Mandirola*.

	M01	M02	M03	M04	M06	M07	M09	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25
M01	-	26,1	493,5	546,3	504,1	513,8	643,9	664,2	673,0	690,7	698,1	704,5	844,5	790,9	827,3	1045,7	1046,2	1049,5	843,7	945,4	1453,3	1483,4	1565,4
M02	2,5	-	469,4	520,5	478,3	487,9	618,6	639,9	649,4	667,1	674,8	679,8	821,5	767,9	804,1	1024,5	1025,0	1028,2	823,0	921,6	1429,8	1459,6	1540,0
M03	4,0	3,5	-	131,7	254,9	240,1	376,1	451,1	486,1	500,1	520,6	455,7	640,0	304,5	338,3	576,8	576,6	579,5	720,3	692,7	1177,2	1190,2	1195,5
M04	4,5	4,0	4,8	-	154,0	134,3	248,8	327,8	365,0	377,7	399,1	327,3	511,4	329,5	353,1	609,0	608,0	610,3	599,0	561,1	1046,8	1061,1	1077,1
M06	11,5	11,0	11,5	13,0	-	21,0	152,0	208,1	238,1	253,9	272,4	228,1	405,2	480,5	501,3	758,3	757,1	759,3	469,7	479,6	985,9	1008,0	1064,7
M07	10,5	10,0	10,5	12,0	1,0	-	153,5	216,3	248,4	263,6	282,9	231,8	412,0	459,8	480,4	737,4	736,2	738,3	481,6	482,1	986,2	1007,2	1058,3
M09	11,8	11,3	11,8	13,3	1,0	1,3	-	84,2	124,4	133,4	155,9	80,1	264,0	527,3	537,9	789,0	787,1	788,7	353,0	328,6	833,8	856,2	921,5
M10	10,5	10,0	11,0	12,0	3,0	2,0	3,3	-	40,3	50,0	72,1	51,7	197,7	611,3	621,2	871,0	869,1	870,6	271,2	283,3	793,3	820,6	911,3
M11	12,5	12,0	12,5	14,0	3,0	2,0	3,3	4,0	-	17,8	34,5	79,6	175,5	651,6	661,5	911,1	909,2	910,7	234,4	272,7	780,6	810,4	913,7
M12	12,8	12,3	12,8	14,3	5,3	4,3	5,6	6,3	6,3	-	22,7	77,9	157,8	659,3	668,3	916,6	914,6	916,0	221,3	255,2	762,8	792,8	897,9
M13	13,7	13,2	13,7	14,3	6,2	5,2	6,5	7,2	7,2	1,4	-	98,9	146,9	681,9	690,9	939,0	937,0	938,4	200,1	250,7	755,3	786,7	898,8
M14	10,5	10,0	10,5	12,0	1,0	0,0	1,3	2,0	2,0	4,3	5,2	-	184,3	589,8	596,8	842,4	840,3	841,6	282,2	251,8	760,2	784,8	865,5
M15	10,5	10,0	10,5	12,0	1,0	0,0	1,3	2,0	2,0	4,3	5,2	0,0	-	755,5	757,5	991,6	989,1	990,0	138,3	116,6	609,3	642,4	771,9
M16	12,2	12,0	12,5	14,0	11,0	10,0	11,3	12,0	12,0	12,3	13,2	10,0	10,0	-	39,2	280,1	279,3	281,7	871,3	762,2	1168,6	1166,2	1098,4
M17	13,5	13,0	13,5	15,0	12,0	11,0	12,3	13,0	13,0	13,3	14,2	11,0	11,0	3,0	-	257,0	255,8	257,9	876,8	758,2	1151,9	1147,7	1071,9
M18	13,2	12,7	13,2	14,7	11,7	10,7	12,0	12,7	12,7	13,0	13,9	10,7	10,7	3,8	3,4	-	3,8	6,6	1117,6	975,8	1309,4	1295,2	1167,6
M19	12,5	12,0	12,5	14,0	11,0	10,0	11,3	12,0	12,0	12,3	13,2	10,0	10,0	2,0	1,0	2,5	-	3,6	1115,3	973,0	1305,9	1291,6	1163,8
M20	12,5	12,0	12,5	14,0	11,0	10,0	11,3	12,0	12,0	12,3	13,2	10,0	10,0	2,0	1,0	2,5	0,0	-	1116,4	973,5	1305,1	1290,7	1162,2
M21	13,2	13,0	13,5	15,0	14,0	13,0	14,3	13,0	15,0	15,3	16,2	13,0	13,0	15,0	16,0	15,0	15,0	15,0	-	228,4	644,3	686,9	856,7
M22	19,2	19,0	19,0	21,0	18,0	17,0	18,3	19,0	19,0	19,3	20,2	17,0	17,0	19,0	20,0	19,0	19,0	19,0	11,0	-	510,0	538,0	655,5
M23	17,5	17,0	17,0	19,0	16,0	15,0	16,3	17,0	17,0	16,3	17,2	15,0	15,0	17,0	18,0	17,7	17,0	17,0	16,0	20,0	-	59,6	342,1
M24	14,5	14,0	13,8	16,0	13,0	12,0	13,3	14,0	14,0	14,3	15,2	12,0	12,0	12,0	13,0	12,7	12,0	12,0	15,0	19,0	17,0	-	285,3
M25	15,5	15,0	14,8	17,0	14,0	13,0	14,3	15,0	15,0	15,3	16,2	13,0	13,0	15,0	16,0	15,7	15,0	15,0	16,0	20,0	18,0	3,0	-

Tabela anexa 3. Matriz de distâncias genética (número de substituições médio para a par, abaixo da diagonal) e geográfica (em quilômetros, acima da diagonal) entre os grupos (BAPS, figura 3) de *Mandirola*.

	I	II	III	IV	V	VI	VII
I	-	443,5	518,7	704,3	721,6	1261,7	1303,4
II	12,8	-	100,3	731,5	288,7	819,2	874,0
III	11,1	11,4	-	824,7	202,9	759,0	833,8
IV	13,1	13,0	5,6	-	946,9	1243,0	1171,9
V	16,7	17,4	16,1	17,9	-	569,6	669,3
VI	17,4	17,4	16,0	16,6	18,3	-	199,8
VII	14,9	14,2	13,6	15,2	17,9	17,6	-

Tabela anexa 4. Matriz de distâncias genética (número de substituições médio para a par, abaixo da diagonal) e geográfica (em quilômetros, acima da diagonal) entre as populações do grupo I (BAPS, figura 3) de *Mandirola*.

	M01	M02	M03	M04
M01	-	26,1	493,5	546,3
M02	2,5	-	469,4	520,5
M03	4,0	3,5	-	131,7
M04	4,5	4,0	4,7	-

Tabela anexa 5. Matriz de distâncias genética (número de substituições médio para a par, abaixo da diagonal) e geográfica (em quilômetros, acima da diagonal) entre as populações do grupo II (BAPS, figura 3) de *Mandirola*.

	M06	M07	M09	M10	M11	M14	M15
M06	-	21,0	152,0	208,1	238,1	228,1	405,2
M07	1,0	-	153,5	216,3	248,4	231,8	412,0
M09	1,0	1,3	-	84,2	124,4	80,1	264,0
M10	3,0	2,0	3,3	-	40,3	51,7	197,7
M11	3,0	2,0	3,3	4,0	-	79,6	175,5
M14	1,0	0,0	1,3	2,0	2,0	-	184,3
M15	1,0	0,0	1,3	2,0	2,0	0,0	-

Tabela anexa 6. Matriz de distâncias genética (número de substituições médio para a par, abaixo da diagonal) e geográfica (em quilômetros, acima da diagonal) entre as populações do grupo IV (BAPS, figura 3) de *Mandirola*.

	M16	M17	M18	M19	M20
M16	-	39,2	280,1	279,3	281,7
M17	3,0	-	257,0	255,8	257,9
M18	3,8	3,4	-	3,8	6,6
M19	2,0	1,0	2,5	-	3,6
M20	2,0	1,0	2,5	0,0	-



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação **CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "*Filogeografia plastidial de *Mandirola hirsuta* (Gesneriaceae)*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Cecilia Fiorini
Nome do(a) aluno(a): Cecilia Fonseca Fiorini

Assinatura: Vera Nisaka Solferini
Nome do(a) orientador(a): Vera Nisaka Solferini

Data: 11/05/2015

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada "Filogeografia plastidial de *Mandirola hirsuta* (Gesneriaceae)", não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 11 / 05 / 2015



Cecilia Fonseca Fiorini
RG n.º MG 14.353.383



Orientador Vera Nisaka Solferini
RG n.º 4763396