

CAMILA MIRANDA BARBOSA

**AMBIENTE E RELAÇÕES ECOLÓGICAS MOLDANDO TRAÇOS FLORAIS E
GENÉTICOS DE *Bionia pedicellata*, UMA FABACEAE ENDÊMICA DA CAATINGA**

RECIFE

2020

CAMILA MIRANDA BARBOSA

**AMBIENTE E RELAÇÕES ECOLÓGICAS MOLDANDO TRAÇOS FLORAIS E
GENÉTICOS DE *Bionia pedicellata*, UMA FABACEAE ENDÊMICA DA CAATINGA**

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Vegetal do Centro de Biociências da
Universidade Federal de Pernambuco como um dos
requisitos para obtenção do título de Doutora em Biologia
Vegetal.

Área de concentração: Ecologia Vegetal

Linha de Pesquisa: Ecologia de Populações e
Comunidades

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sobreira Machado

Co-orientador: Prof. Dr. Diego Sotero de Barros Pinangé

RECIFE

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Barbosa, Camila Miranda

Ambiente e relações ecológicas moldando traços florais e genéticos de *Bionia pedicellata*, uma fabaceae endêmica da Caatinga / Camila Miranda Barbosa – 2020.

96 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Isabel Cristina Sobreira Machado

Coorientador: Diego Sotero de Barros Pinangé

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, 2020.

Inclui referências e apêndices.

1. Biogeografia 2. Florestas secas 3. Genética de populações I. Machado, Isabel Cristina Sobreira (orient.) II. Pinangé, Diego Sotero de Barros (coorient.) III. Título

578.09

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-191

CAMILA MIRANDA BARBOSA

**AMBIENTE E RELAÇÕES ECOLÓGICAS MOLDANDO TRAÇOS FLORAIS E
GENÉTICOS DE *BIONIA PEDICELLATA*, UMA FABACEAE ENDÊMICA DA
CAATINGA**

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Vegetal do Centro de Biociências da
Universidade Federal de Pernambuco como um dos
requisitos para obtenção do título de Doutora em Biologia
Vegetal.

APROVADA EM: __ / __ / ____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Isabel Cristina Sobreira Machado (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Andrea Pedrosa Harand (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Geyner Alves dos Santos Cruz (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Dr. Liedson Tavares de Sousa Carneiro (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Artur Maia Wanderley (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico à minha mãe, que é a mulher mais forte e incrível que já conheci.

A ela devo todas as minhas conquistas e tudo que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma estiveram presentes ao longo desses quatro anos, que foram responsáveis para que eu levasse adiante meu amor pela ciência e pela Biologia, que me deram carinho e foram ouvidos das minhas longas conversas.

À minha orientadora, Isabel, que me acompanha desde o mestrado e que é um exemplo de mulher na ciência. Obrigada por cada ensinamento e por orientar meu caminho na pesquisa ao longo desses anos.

Ao meu coorientador, Diego, que além do papel formal foi um grande amigo e apoio durante esse doutorado. Obrigada pelos debates de ideias, pelo ombro e pelas alegrias proporcionadas que também fizeram parte desse processo.

À minha família, nuclear, mamis e Heitor, vocês sempre serão meu norte e abrigo. À minha família, nada tradicional, que se construiu e se estruturou junto com esses anos de pós-graduação: Catão, Cata, Liloca e Martha. E ao meu pai, pelo recomeço.

Aos integrantes da casinha, minha família de amigos, Lara, Lucas, Caio e Marx, por todo amor compartilhado, pelas conversas, risadas e gritarias misturadas com as festinhas, idas ao shopping e pizzas às terças. Vocês são meus alicerces!

À minha família recifense, que me adotou, me deu abrigo, amor e muito carinho: Tia Dora, Roger, Mari, Thaís e Joaquim. Vocês são luz na minha vida!

À Lara, que foi amiga, irmã, filha, mãe, tudo ao mesmo tempo, que salvou minha vida e me fez conhecer Dr. Lourenço, a quem sou mais que grata por me acompanhar e cuidar de mim. Definitivamente, sem vocês, eu não estaria aqui.

À Nayara, que foi além de amiga, apoio e ajuda nessa jornada, essencial nesse doutorado e, sem ela, nada disso teria sido possível.

Aos meus amigos, de Fortaleza, Paraíba, Recife, Belém, do mundo, e primos que foram essenciais nas horas de alegrias e de tristezas também. Impossível citar nomes, mas cada um sabe a diferença que fez nesse processo.

Aos meus companheiros de pós-graduação Lucas, Sil, Silvia, Bruno, Dani, Liginha, Fernando, Rodolfo, que trilharam esse caminho juntos comigo sendo força e apoio incondicional.

A Brands, Borbinha, Léo e Cardoso que estão sendo mais do que essenciais nessa reta final, obrigada por serem apoio, amor e cuidado.

Ao POLINIZAR, especialmente a Nando e Arthur pelas ajudas e conversas científicas e à Lara e Will pela força e amizade.

Ao LGBV e todos seus integrantes que me receberam com carinho, especialmente à Jéssica e Stephani que foram minhas companheiras de bancada e aprendizados na molecular.

Ao ITV, especialmente à Santelmo que me acolheu, me ensinou e me apoiou durante o ano que passei lá; à Mariana que foi apoio e amor, me escutou, ensinou e ajudou, indo além da relação de amiga; e ao Manoel que é a essência do laboratório e estava lá todos os dias para ajudar e dar aquela palavra de conforto ‘vai dar certo, num te esqueeente’.

A esses três laboratórios também agradeço por toda estrutura fornecida e financiamento do meu projeto, especialmente a Ana Benko e Guilherme Oliveira pela recepção e acolhida.

A todos que me ajudaram nas coletas de campo, na análise das amostras, no processamento dos dados e nas discussões científicas.

A todos que avaliaram meu projeto, manuscritos e versões dessa tese, especialmente minha banca de qualificação, que fizeram críticas essenciais para a construção desse trabalho.

Ao PPGBV pelo suporte, à CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Levanta essa cabeça, enxuga essas lágrimas, certo?
Respira fundo e volta pro ringue, 'cê vai sair dessa prisão
'Cê vai atrás desse diploma com a fúria da beleza do sol, entendeu?
Faz isso por nós, faz essa por nós, te vejo no pódio.
Ano passado eu morri, mas esse ano eu não morro.

Emicida/ Belchior

RESUMO

Compreender os processos adaptativos das espécies em ambientes restritivos, como a Caatinga, onde há um longo período de seca, é fundamental para entender padrões biogeográficos dessa floresta seca e, por sua vez, traçar estratégias de conservação nesses ambientes. São necessários estudos integrativos, como por exemplo, ecologia reprodutiva e genética de populações para entender como fatores bióticos e abióticos moldam a distribuição das espécies. Dessa forma, essa tese teve como objetivo analisar como o ambiente biótico e abiótico exercem influência nos traços florais e genéticos de *Bionia pedicelatta* (Fabaceae), espécie endêmica e amplamente distribuída na Caatinga. A tese está dividida em dois capítulos que tem por objetivos de (1) avaliar a variação no fenótipo floral, guilda de polinizadores e produção de néctar e (2) analisar a estruturação populacional, distribuição de haplótipos e nicho efetivo da espécie. Nesse intuito, foram realizadas coletas de dados em populações do Ceará, Pernambuco e Bahia abrangendo toda a área de ocorrência da espécie. Observou-se diferenciação nos traços florais, na produção de néctar e na guilda de polinizadores quando comparamos três populações estudadas e um acoplamento entre os comprimentos do tubo floral, estames e pistilos e o comprimento do bico de alguns polinizadores. Ao longo dos anos houve uma drástica redução de nicho efetivo da espécie; analisando os dados de marcadores plastidiais foram encontrados nove haplótipos, sendo dois centrais, e uma estruturação populacional demonstrada pelo valor significativo do F_{ST} e, apesar de não haver relação entre a distância genética e geográfica, a maior variação genética ocorreu entre as populações. Destacamos a capacidade da espécie em se adaptar às pressões seletivas do ambiente modificando traços responsáveis por sua reprodução, entretanto, a perturbação antrópica constante pode levar à perda de hábitat e causar erosão genética. Desse modo, sugerimos mais estudos integrativos nesse direcionamento e a implementação de ações de conservação na Caatinga.

Palavras-chaves: Biogeografia. Florestas Secas. Genética de populações. Ornitofilia. Modelagem de nicho. Dispersão autocórica.

ABSTRACT

Understanding the adaptive processes of species in restrictive environments, such as the Caatinga, which have a long dry season, is essential to understand biogeographic patterns of this dry forest and to elaborate conservation strategies in these environments. Integrative studies, as reproductive ecology and population genetics are needed to comprehend how biotic and abiotic factors shape species distribution. Thus, this thesis aimed to analyze how the biotic and abiotic environment influences the floral and genetic traits of *Bionia pedicellata* (Fabaceae), an endemic species widely distributed in the Caatinga. The thesis is divided into two chapters which aimed (1) to evaluate the variation in the floral phenotype, pollinator guild and nectar production and (2) to analyze the population structure, distribution of haplotypes and effective niche of the species. For this purpose, data collections were carried out in populations from Ceará, Pernambuco and Bahia covering entire area of occurrence of the species. Differentiation was observed in floral traits, in the production of nectar and in the pollinator guild when we compared three studied populations and a coupling between the lengths of the floral tube, stamens and pistils and the length of the bill of some pollinators. Over the years there has been a drastic reduction in the species' effective niche; analyzing the data of plastid markers, nine haplotypes were found, two of which were central, and a population structure demonstrated by the significative value of the F_{ST} and, although there is no relationship between genetic and geographic distance, the greatest genetic variation occurred between populations. We highlight the species' ability to adapt to the selective pressures of the environment by modifying traits responsible for their reproduction, however, the constant anthropic disturbance can lead to habitat loss and cause genetic erosion. Thus, we suggest more integrative studies in this direction and the implementation of conservation actions in the Caatinga.

Keywords: Biogeography. Dry Forests. Population genetics. Ornithophily. Niche modeling. Autochory.

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	10
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1 Biogeografia	12
2.2 Filogeografia de Florestas Neotropicais e Florestas Tropicais Sazonalmente Secas (FTSS)	14
2.3 Caatinga	16
2.4 Polinização e variações em traços florais	18
2.5 Deriva genética e variações em traços genéticos	20
2.6 <i>Bionia pedicellata</i> (Benth) L.P. Queiroz (Fabaceae) como modelo de estudo	21
3. Are the differences in floral traits and nectar production shaped by the pollinators guild in populations of the self-incompatible and ornithophilous <i>Bionia pedicellata</i> (Fabaceae)?	22
4. Deriva genética e redução histórica de nicho efetivo em <i>Bionia pedicellata</i> (Fabaceae), uma espécie com dispersão limitada e endêmica da Caatinga	53
5. CONCLUSÕES	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO	95

1 APRESENTAÇÃO

A distribuição das espécies não ocorre uniformemente, uma vez que vem sendo historicamente moldada por fatores bióticos e abióticos (BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2007). Durante a história de vida das espécies, processos ambientais e biológicos tais como movimentos tectônicos, soerguimento de crostas, ciclos climáticos, barreiras reprodutivas, deram origem a diversos ecossistemas com peculiaridades de clima, solo, disponibilidade hídrica (WIENS; DONOGHUE, 2004). Esses ambientes selecionaram naturalmente espécies mais aptas e as relações ecológicas se tornaram cada vez mais estritas e, desse modo, alguns organismos como plantas, por exemplo, tornaram-se dependentes delas para realização de seus processos reprodutivos. Ao longo do tempo evolutivo, aspectos morfológicos, ecológicos e genéticos das plantas vêm sendo moldados pelas relações bióticas e pelo ambiente em que as plantas ocorrem (MARTINS, 2013). Essa modelagem pode agir de diferentes modos causando modificações em traços morfológicos vegetais e nas linhagens genealógicas das espécies que podem variar dentro e entre populações e influenciar dinâmicas dentro de ecossistemas (NATTERO; COCUCCI, 2007; KLIMAN; SHEEHY; SCHULTZ, 2008).

Para entender essas mudanças, é necessário avaliar como o ambiente vem se modificando historicamente e como isso pode alterar a distribuição de linhagens genealógicas dentro das populações, além de entender como as relações bióticas ocorrem ao longo da distribuição geográfica e de que modo elas geram variações morfológicas. Nesse intuito, faz-se necessário que os estudos sejam realizados à luz da biogeografia, visando observar processos maiores de estruturação dos ambientes para entender as dinâmicas populacionais (SEGATTO et al., 2014; PINANGÉ et al., 2019). Poucos estudos integrativos são direcionados nesse sentido para populações vegetais e ainda menos quando visam estudar espécies vegetais da Caatinga, um domínio fitogeográfico exclusivamente brasileiro e que conta com uma alta biodiversidade e níveis de endemismo (LEAL et al., 2005; TABARELLI et al., 2017). Sua distribuição ocorre no nordeste do Brasil até o norte de Minas Gerais, sendo o domínio de maior extensão dentro das florestas secas mundiais (AB'SABER, 1999; TABARELLI et al., 2017). Além de apresentar um longo período de seca, o que torna o ambiente restritivo, a Caatinga está em constante pressão antrópica, o que vem gerando um processo de fragmentação, perda de serviços ecossistêmicos e pode levar a extinção de espécies, principalmente as endêmicas desse ambiente (RIBEIRO et al., 2015; RITO et al., 2017; ARNAN et al., 2018).

Nesse contexto, *Bionia pedicellata* (Benth) L.P. Queiroz (Fabaceae) apresentou-se como um potencial modelo de estudo para entender como uma espécie endêmica de Caatinga vem sendo histórico e contemporaneamente modelada pelo ambiente em que ela ocorre e pelas relações ecológicas nas quais ela está envolvida. Essa espécie tem ampla distribuição na Caatinga, sendo endêmica desse domínio, apresenta dispersão limitada do tipo autocórica explosiva e depende de polinizadores (beija-flores) para seu sucesso reprodutivo, uma vez que é auto incompatível (DEMETRIO, 2008; QUEIROZ, 2008). Dessa forma, essa tese apresenta-se dividida em dois capítulos que avaliaram variações geográficas em traços ligados à reprodução e em traços genéticos dentro e entre as populações de *B. pedicellata*. O primeiro capítulo trata de uma análise contemporânea e geográfica das populações de *B. pedicellata* do ponto de vista reprodutivo, de modo a identificar e caracterizar a guilda de polinizadores, avaliar as variações nos traços florais, incluindo a produção de recursos, analisando se esses traços são moldados pelos polinizadores. O segundo capítulo avaliou a distribuição histórica de nicho da espécie, além de avaliar sob o ponto de vista da genética de populações, como estão distribuídas e estruturadas as linhagens genealógicas. Ambos têm por intuito revelar padrões quanto a história evolutiva e da ecologia reprodutiva contemporânea de *B. pedicellata* através da análise de suas populações naturais.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biogeografia

A biogeografia envolve uma complexidade de temas de investigações que visam realizar o estudo da distribuição geográfica dos seres vivos (CRISCI; KATINAS; POSADAS, 2003). Dansereau (1949) define biogeografia como a área que estuda a distribuição dos seres vivos no espaço através do tempo. Ridley (2006) destaca que essa distribuição pode ser influenciada por movimentos individuais de curta duração intrínsecos das espécies ou por processos geológicos de ações lentas.

Uma das principais ferramentas utilizadas para responder questões biogeográficas é a modelagem de distribuição de espécies ou, também chamada, modelagem de nicho ecológico (GIANINNI et al., 2012). Com ela é possível inferir processos e responder questionamentos relacionados à paleobiologia (SVENNING, 2011; COLLEVATI et al., 2012), avaliar ameaças à fauna e à flora e estabelecer estratégias de conservação (JIMÉNEZ-ALFARO; DRAPER; NOGUÉS-BRAVO, 2008; PAROLO; ROSSI; FERRARINI, 2008; MARINI et al., 2009), delimitar espécies (RAXWORTHY et al., 2009), prever invasões biológicas (PETERSON, 2003; THUILLER et al., 2009), prever o impacto das mudanças climáticas futuras na distribuição de espécies (BROENNIMANN et al., 2011), além de entender eventos passados, tais como extinções em massa (NOGUÉS-BRAVO et al., 2008) e glaciações (ARAÚJO et al., 2008).

Estudos de modelagem de distribuição são comumente realizados em fauna (PETERSON; BALL; COHOON, 2002; SATTler et al., 2007; PAROLO; ROSSI; FERRARINI, 2008; MARINI et al., 2009; THORN et al., 2009). Em plantas, principalmente as brasileiras, esse número é menor, ressaltando a relevância ainda maior de esforços neste campo de análise (FIASCHI; PIRANI, 2009). Além da necessidade de um maior número de investigações em grupos vegetais também é importante que se estabeleçam modelos que considerem conjuntamente os climas históricos e contemporâneos, pois ambos são responsáveis pelos padrões de riqueza de espécies e diversificação geográfica populacional (ARAÚJO et al., 2008).

Estudos biogeográficos vegetacionais em Florestas Tropicais Sazonalmente Secas (FTTS) são ainda mais escassos (VIEIRA et al., 2005; CAETANO et al., 2008; COLLEVATTI et al., 2012; BONATELLI et al., 2014; GONÇALVES-OLIVEIRA et al., 2017; PINANGÉ et

al., 2019), apesar de necessários para entender o processo de formação dessas regiões. Prado e Gibbs (1993) propuseram a teoria do Arco Pleistocênico, que foi posteriormente apoiada por Pennington, Prado e Pendry (2000), para entender como se deu a formação das FTSS com as oscilações climáticas do último Quaternário. A partir da análise de distribuição disjunta de espécies vegetais das FTSS, os autores chegaram à conclusão de que esses padrões são vestígios de uma formação florestal extensa ocorrente devido à retração da espécies de florestas úmidas durante o Último Máximo Glacial, que apresentou um período climático seco e frio, propiciando a expansão de espécies vegetais da Caatinga e do Chaco formando um grande arco vegetacional.

Estudos biogeográficos dentro da Caatinga são necessários para avaliar processos como vicariância ou expansões e ver como isso pode modificar a distribuição das espécies das FTSS, uma vez que a flora e a fauna da Caatinga têm histórias complexas e diferentes origens (QUEIROZ, 2006; GREGORIN; CARMIGNOTTO; PERCEQUILLO, 2008; GUEDES; SAWAYA; NOGUEIRA, 2014; CARVALHO et al., 2013). Turchetto-Zolet e colaboradores (2013) atentam para o fato que esses estudos têm que ser direcionados a nível de espécie, uma vez que não há um padrão biogeográfico estabelecido para a Caatinga como um todo, sendo bem provável que essas variações sejam determinadas por características intrínsecas de cada espécie. Para o melhor entendimento desses padrões é preciso examiná-los à luz dos acontecimentos geomorfológicos e das profundas mudanças climáticas ocorridas no passado, associando estes aos dados genético-evolutivos das linhagens genealógicas, a partir das informações de conectividade histórica (AVISE, 2000; SAKURAGUI, 2001).

Análises biogeográficas realizadas a partir de modelagem são responsáveis por avaliar nicho efetivo da espécie. Esse nicho é a parte do ambiente em que a espécie é capaz de ocupar de acordo com os fatores abióticos que influenciam esse ambiente (SILVERTOWN, 2004). Sendo assim, espera-se que a constante pressão antrópica gerando fragmentação de habitats leve a uma redução de nicho efetivo em espécies endêmicas e a consequência disso é ainda pior quando há um tipo de sistema de polinização bastante especializado e uma síndrome de dispersão limitada (SEGATTO et al., 2014; SILVA et al., 2019). Essa redução de nicho pode afetar diretamente a estruturação local das populações gerando consequências para as linhagens genealógicas das espécies (DENG et al., 2020).

2.2 Filogeografia de Florestas Neotropicais e Florestas Tropicais Sazonalmente Secas (FTSS)

A distribuição das espécies é extremamente influenciada por fatores abióticos como o clima (DUNSON; TRAVIS, 1991; GUIBAN; THUILLER, 2005; RIDLEY, 2006), tendo havido, durante o Quaternário, grandes mudanças climáticas com profundas oscilações de temperatura onde ocorreram as chamadas glaciações do Pleistoceno, as quais causaram profundas mudanças nas espécies e em suas respectivas distribuições (BERGER, 1989; WEBB; BARTLEIN, 1992). Três padrões de mudanças biogeográficas foram identificados que ocorreram nesse período: retração, manutenção e expansão. Cada espécie pode ter tido um padrão de mudanças e, por isso, faz-se necessário investigá-las isoladamente (MARTINS; DOMINGUES, 2011; TURCHETTO-ZOLET ET AL., 2013).

Haffer (1969) em sua célebre teoria de refúgios, propôs que durante os períodos glaciais, alguns locais do globo formaram as chamadas zonas de refúgio, regiões que mantinham a umidade e conservavam um pouco do clima pretérito. Assim, espécies que se dispersaram para essas regiões conseguiam sobreviver, ao passo que aquelas que não obtiveram êxito na ocupação desses refúgios acabaram sendo extintas. Quando a Terra voltou a aquecer e entrou no período interglacial, as espécies que tinham se mantido nessas zonas, voltaram a se dispersar e ocupar novos ambientes. Webb e Bartlein (1992) afirmam que essas mudanças climáticas foram acompanhadas de intensas migrações de espécies.

Esse padrão de retração para as áreas de refúgios seguido de dispersão é bastante documentado para áreas úmidas (CONNOR, 1986; AIDE; RIVERA, 1998; HOOGHIESTR; HAMMEN, 1998; COLINVAUX; OLIVEIRA; BUSH, 2000; CRESPI; LESLIE; BROWNE, 2003; SCHÖNSWETTER et al., 2005; CARNAVAL et al., 2009; TURCHETTO-ZOLET et al., 2012; LIMA et al., 2014; CAZÉ et al., 2016), principalmente na zona Holártica, e foi responsável por uma grande proporção de eventos de especiação (AVISE; WALKER, 1998). Em contrapartida, Bush e Oliveira (2006) publicaram um artigo que aponta falhas na teoria dos refúgios para a região Amazônica do ponto de vista palinológico e paleobotânico, o que mostra que apesar de ser uma teoria bem consolidada ainda há controvérsias sobre como os paleoclimas afetaram as regiões neotropicais.

Ainda há uma segunda teoria que explica a formação vegetacional durante o último máximo glacial (UMG) e foi proposta por Prado e Gibbs (1993): a teoria do Arco Pleistocênico. Essa teoria foi proposta no intuito de entender como se deu a formação das FTSS com as oscilações climáticas do último Quaternário. A partir da análise de distribuição disjuntas de espécies vegetais das FTSS, os autores chegaram à conclusão de que esses padrões são vestígios

de uma formação florestal extensa ocorrente devido à retração da espécies de florestas úmidas durante o UMG, que apresentou um período climático seco e frio, propiciando a expansão de espécies vegetais da Caatinga e do Chaco formando um grande arco vegetacional.

Pennington e colaboradores (2000) propuseram um modelo de vicariância para explicar os processos que moldaram as florestas secas durante o UMG, de acordo com os dados contemporâneos de distribuição de espécies das FTSS na Amazônia e dados palinológicos: uma mistura de espécies de florestas secas, florestas úmidas e de montana confinadas a matas de galeria. Em contrapartida, Mayle (2004), de acordo com dados de estudos palinológicos, sugere que o atual padrão biogeográfico das florestas secas na América do Sul pode ser explicado por dispersão a longa distância e não por vicariância.

Portanto, para florestas secas, aparentemente não há um consenso de como as espécies responderam às glaciações do Pleistoceno: se houve vicariância ou expansões por dispersão a longa distância modificando a distribuição das espécies das FTSS, sendo bem provável que esse comportamento seja determinado por características intrínsecas de cada espécie (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013). Além disso, também não há um padrão que explique como de fato ocorreu a distribuição dessas espécies nos Neotrópicos (LOHMAN et al., 2013). Para o melhor entendimento desses padrões é preciso examiná-los à luz dos acontecimentos geomorfológicos e das profundas mudanças climáticas ocorridas no passado, associando estes aos dados genético-evolutivos das linhagens genealógicas, a partir das informações de conectividade histórica (SAKURAGUI, 2001; AVISE, 2000).

Diversos estudos filogeográficos vem sendo conduzidos no Neotrópico ao longo dos últimos anos, muito embora eles ainda sejam escassos quando postos em contraste com outras regiões do globo (PALMA-SILVA et al., 2009; TURCHETTO-ZOLET et al., 2013). Um levantamento com os principais resultados dos trabalhos filogeográficos realizados nas regiões tropicais e subtropicais baseado no trabalho de revisão de Turchetto-Zolet e colaboradores (2013) foi realizado e pode ser observado na Tabela 1.

A maioria dos artigos publicados sobre filogeografia das plantas do Neotrópico focam seus estudos nas Florestas Úmidas como a Floresta Atlântica (PALMA-SILVA et al., 2009; NOVAES et al., 2010; RIBEIRO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2011; TURCHETTO-ZOLET et al., 2012; MÄDER et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013; LIMA et al., 2014; CAZÉ et al., 2016) ou mais especificamente na região amazônica (DICK; HEUERTZ, 2008; LIMA et al., 2014). Esses estudos demonstram expansão como principal processo demográfico, embora também descrevam padrões de retração (PINHEIRO et al., 2013; LIMA et al., 2014), com fuga

para diversos refúgios incluindo para algumas áreas de Cerrado como já documentado por Garcia e colaboradores (2011).

Além disso, destaca-se a documentação de distribuição disjunta de algumas espécies ocasionada por barreiras ribeirinhas (CAZÉ et al., 2016) e pelo corredor seco formado pelo eixo Caatinga-Cerrado que separa a Floresta Amazônica da Floresta Atlântica (TURCHETTO-ZOLET et al., 2012; NOVAES et al., 2013). Em um estudo com a espécie *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne, Ramos e colaboradores (2007) observaram a formação de grupos dentro do Cerrado e viram a ocorrência de uma retração dessa árvore para refúgios da porção central e sul do Cerrado devido a expansões de espécies provindas de florestas úmidas.

Caetano e colaboradores (2008) realizaram um estudo filogeográfico de *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl., árvore que apresenta ampla distribuição na Caatinga e observaram a formação de dois grupos isolados por distância, um grupo central e a existência de expansões de alcance argumentando a favor da existência de uma formação pretérita contínua dessa floresta. Esse padrão de paleodistribuição contínua também foi corroborado por Collevatti e colaboradores (2012) ao estudarem *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl. na Caatinga. Já Vieira et al (2005), avaliando a biogeografia e filogeografia de *Ficus bonijesulapensis* R.M.Castro, também encontraram grupos dentro da Caatinga, mas afirmam que os grupos encontrados que hoje correspondem a caatinga arbórea e afloramentos rochosos eram potenciais refúgios durante as mudanças climáticas do Quaternário. O padrão de refúgios também foi observado para o complexo *Pilosocereus* em regiões de Caatinga e Cerrado (BONATELLI et al., 2014).

Dessa forma, não há um padrão histórico bem determinado para as Florestas Secas. Pennington e colaboradores (2009) sugerem que a distribuição irregular desse bioma no globo tem estruturado de forma distinta a história e biogeografia das espécies vegetais presentes nele. Portanto, faz-se de fundamental importância estudos que foquem em compreender os padrões filogenéticos, populacionais, ecológicos e biogeográficos dessas espécies individualmente para que se possa entender a história mais ampla desse bioma (CAVERS; DICK, 2013).

2.3 Caatinga

O Brasil detém a maior biodiversidade do mundo (PEIXOTO; MORIM, 2003) englobando domínios fitogeográficos que vão desde florestas secas e úmidas até campos e pantanal, os quais abrigam 14% da diversidade mundial de plantas (SHEPERD, 2002; FIASCHI; PIRANI, 2009). Myers et al. (2000) destacaram áreas prioritárias para conservação

que, são aquelas que apresentam uma grande concentração de espécies e grande perda de habitats. Essas áreas foram denominadas *hotspots* e, no Brasil, os ecossistemas prioritários são a Floresta Atlântica e o Cerrado. Entretanto, Leal e colaboradores (2005) destacaram a grande biodiversidade da fauna e flora presente na Caatinga que é pouco protegida apesar de também sofrer grande perda de habitats. Boa parte do fato da Caatinga não ser um ecossistema prioritário para conservação é que ainda há poucos estudos que investiguem e descrevam sua biodiversidade, bem como pouco investimento de ciência que suportem estudos e pesquisas nessa região (SANTOS et al., 2011).

A Caatinga ocupa cerca de 11% do território nacional incluindo Nordeste do Brasil e Norte de Minas Gerais (AB'SABER, 1999) e é um dos domínios fitogeográficos, dentro das FTSS, com maiores índices de biodiversidade do mundo. Também é o domínio com maior extensão dentro das FTSS e abriga uma alta densidade de pessoas que utilizam seus recursos de forma extrativista (TABARELLI et al., 2017). Essa exploração vem gerando uma perturbação nesse ambiente, que por sua vez proporciona uma transformação em larga escala dentro do ecossistema (LEAL et al., 2005; ARAÚJO; CASTRO; ALBUQUERQUE, 2007; RIBEIRO et al., 2015; RITO et al., 2017; TABARELLI et al., 2017). A principal pressão antrópica ocorrente dentro da Caatinga é a perturbação crônica que consiste em distúrbios humanos constantes e de baixa intensidade que podem levar a um processo de fragmentação e extinção gradual das espécies (RIBEIRO et al., 2015; ARNAN et al., 2018). Além disso, gera uma redução em serviços ecossistêmicos (TABARELLI et al., 2017) afetando a dinâmica e estrutura das comunidades (ARAÚJO et al., 2007). Ao longo dos anos o processo de fragmentação e perda de hábitat vem sendo documentado na Caatinga (LEAL et al., 2005; QUEIROZ, 2006; ARAÚJO et al., 2007; GUEDES; SAWAYA; NOGUEIRA, 2014; RIBEIRO et al., 2015; RITO et al., 2017; TABARELLI et al., 2017).

A fragmentação e consequente perda de hábitat afeta diretamente espécies endêmicas (MYERS et al., 2000; BROOKS et al., 2002; DIRNBÖCK; ESSL; RABITSCH, 2011; HADLEY et al., 2017). A Caatinga detém um alto número de espécies endêmicas e dentro das plantas vasculares e dos grupos de animais essa endemia varia de 7 a 57% (LEAL et al. 2005). Queiroz (2006) avaliou os padrões de distribuição geográfica das espécies de Fabaceae na Caatinga e revelou a presença de sete centros de endemismo dentro desse domínio. A perda de hábitat pode gerar consequências drásticas para espécies endêmicas e, principalmente, para aquelas que apresentam relações bióticas especializadas (SILVA et al., 2019). Desse modo, faz-se necessário estudos que avaliem essas espécies endêmicas, seus padrões de distribuição e

relações bióticas envolvidas para definição de estratégias de conservação e desaceleramento desse processo de fragmentação dentro da Caatinga (LEAL et al., 2005).

2.4 Polinização e variações em traços florais

Variações morfológicas podem ser moldadas não só por fatores abióticos, como pressões seletivas do ambiente (HERRERA, 2006; GILES et al., 2006; SÁNCHEZ-LAFUENTE, 2007), mas também pelas relações bióticas que os seres vivos mantêm uns com os outros (HARDY; SONKÉ, 2004). Dentre essas relações destacam-se a competição por recurso, herbivoria, a dispersão de sementes e a polinização (RIDLEY, 2006; GILES et al., 2006; BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2007; MEHANNA; PENHA, 2011). No caso das plantas, a polinização representa uma interação imprescindível para que haja reprodução cruzada e a formação do fruto e, conseqüentemente, a dispersão da semente e colonização de novos habitats. Entender como esse processo ocorre, como ele varia com as condições ambientais e como isso afeta a morfologia da planta é uma questão central na ecologia de populações (BROWN, 1984).

Entender a dinâmica do polinizador também é de fundamental importância para inferir questões ecológicas relacionadas à essa interação (WOLF; HAINSWORTH; STILES, 1972; LINHART, 1987; MCDADE; WEEKS, 2004). Sendo assim, dados sobre horário, tipo, qualidade e frequência das visitas dos polinizadores às flores (HAINSWORTH; WOLF, 1972), como eles se distribuem ao longo do dia, geograficamente (NATTERO; COCUCCI, 2007) e qual seu comportamento e modo de forrageamento, que pode ser determinante na forma de distribuição do pólen (LINHART, 1987; LONGO; FISCHER, 2006; TORRES-VENEGAS et al., 2019), fornecem importantes respostas quando se trata da compreensão da polinização e importância da mesma contemporaneamente direcionando mudanças evolutivas e modelagem nas paisagens.

As aves são os principais vertebrados polinizadores (OLLERTON, 2017) e dentro desse grupo as espécies mais representativas são os beija-flores (Trochilidae). Os beija-flores são espécies de aves que só ocorrem no Neotrópico e são responsáveis pela polinização de, pelo menos, 15% das espécies de plantas dessa região (FEISINGER, 1983; MACHADO, 2009; LAS-CASAS; AZEVEDO; DIAS, 2012) por serem as aves mais especializadas na visitação de flores (FISCHER et al., 2014). O comportamento dessas aves está diretamente ligado ao fluxo de pólen: beija-flores que apresentam comportamento territorialista (i.e. Trochilinae) podem

restringir esse fluxo e ser pouco eficientes quando comparados com os que apresentam rotas de visita  o (i.e. Phaethornithinae) e que acabam por visitarem uma amplitude maior de flores (LONGO; FISCHER, 2006; TORRES-VENEGAS et al., 2019). As flores ornitófilas geralmente são robustas, produzem néctar rico em sacarose e pólen em abundância, são inodoras, com antese diurna, comumente com colora  o vermelha, alaranjada (FISCHER et al., 2014) e geralmente são longas, tubulares e curvadas (FAEGRI; VAN DER PIJL, 1980; DALSGAARD et al., 2009).

Além de analisar o comportamento do polinizador,    necessário entender como o recurso é disponibilizado para ele temporal e espacialmente (CRUZ et al., 2006) para avaliarmos como essa relação pode modelar variações geográficas em traços florais. O principal recurso oferecido pela planta para os beija-flores é o néctar, que é geralmente pouco concentrado, com a porcentagem de a    ar variando de 20~25% (ROBERTS, 1996), sendo mais diluído do que o néctar oferecido por plantas polinizadas por abelhas (PYKE; WASER, 1981). Alguns trabalhos clássicos demonstram que em testes de escolhas realizados em laboratório, a preferência dos beija-flores é por um néctar mais concentrado do que aquele oferecido por espécies ornitófilas, com a porcentagem de sacarose superior a 45% (BOLTEN; FEINSINGER, 1978; TAMM; GASS, 1986; ROBERTS, 1996; MCDADE; WEEKS, 2004), o que demonstra uma plasticidade na estratégia de disponibilidade e uso desse recurso.

Aspectos morfológicos e morfofisiológicos das plantas e de seus respectivos polinizadores evoluíram ao longo do tempo e isso vem tornando a polinização um processo cada vez mais efetivo (FAEGRI; VAN DER PIJL, 1980; MACHADO et al., 2007; MARTINS, 2013). Dessa forma, ajustes na morfologia floral, disponibilidade de recurso temporal e espacialmente por parte da planta e no modo de forrageamento do animal são cruciais para a manutenção dessa relação ecológica e consequente manutenção das espécies nos ambientes (McDADE; WEEKS, 2004; CRUZ et al., 2006; CAPUCHO et al., 2006; DALSGAARD et al., 2009). As diferenças morfológicas nos traços florais podem estar relacionadas ao principal polinizador de cada população e podem ocorrer entre as populações e dentro delas (NATTERO; COCCUCI, 2007), além de também poderem ser uma estratégia para manter a relação fenotípica planta-polinizador em áreas heterog  neas (COSACOV; COCCUCI; SÉRSIC, 2014).

A morfologia dos traços florais também está ligada ao recurso disponível para o polinizador. Estudos demonstram que há uma correlação positiva entre os tamanhos florais e a recompensa oferecida (BERG, 1959; GALLETO; BERNARDELLO, 2004; KACZOROWSKI; GARDENER; HOLTSFORD, 2005; FENSTER et al., 2006; CASTRO; SILVEIRA; NAVARRO, 2009) e que, assim, os polinizadores são capazes de discriminar flores com

diferentes tipos de néctar (SCHEMSKE; BRADSHAW, 1999; KACZOROWSKI; GARDENER; HOLTSFORD, 2005). Dessa forma, os polinizadores são capazes de modelar traços florais, a partir do depósito de pólen no seu corpo (BERG, 1959), criando variações intraespecíficas e geográficas e mediando seleções (HERRERA, 1990; FENSTER et al., 2006; CASTRO; SILVEIRA; NAVARRO, 2009).

2.5 Deriva genética e variações em traços genéticos

A estruturação genética das populações vegetais é bastante complexa, uma vez que é influenciada tanto pelos eventos passados quanto pelos padrões atuais de mudanças genéticas interpopulacionais (SCHAAL et al., 1998). Em um estudo sobre estruturação genética espacial de *Phacelia dubia* (L.) Trel., Levy e Neal (1999) observaram que as populações estavam estruturadas de acordo com a intensidade e o tipo de distúrbio antrópico e isso gerou perda alélica e isolamento populacional, afetando a dispersão das sementes e frequência de genes nos cloroplastos. Além disso, a fragmentação de habitats é capaz de reduzir o tamanho populacional, causar erosão de variação gênica, aumentar a endogamia e deriva genética podendo levar à extinção local das espécies (YOUNG et al., 1996).

Associando a documentada perda de habitat na Caatinga analisada através da biogeografia é possível também observar consequências desses processos na genética das espécies (CHEVIN et al., 2010; WANG; BRADBURD, 2014), uma vez que essa pressão antrópica afeta as relações bióticas responsáveis pelo sucesso reprodutivo das plantas (CASTILLA et al., 2017; HADLEY et al., 2017). A estruturação das populações pode ser afetada pelos processos de fragmentação e a principal consequência disso é a perda de haplótipos e alelos a partir da deriva genética (YOUNG et al., 1996; KLIMAN; SHEEHY; SCHULTZ, 2008; GANDARA et al., 2019). Desse modo, é necessário avaliar a estruturação genética das populações frente a um cenário de pressão antrópica e perda de habitat ocorrente na Caatinga. Para isso, a aplicação de marcadores de origens distintas que respondam como processos bióticos foram modificados evolutivamente por essas mudanças no ambiente é importante (SEGATTO et al., 2014).

Processos de dinâmica populacional sob o ponto de vista da polinização e da dispersão de sementes podem ser inferidos através da aplicação de marcadores nucleares e plastidiais e nos permitem obter respostas sobre fluxo gênico, estruturação populacional, inferir processos demográficos pretéritos e avaliar a diversidade genética das populações (WORTH et al., 2011;

WANG; BRABURD, 2014; PINANGÉ et al., 2019; DENG et al., 2020). Portanto, faz-se de fundamental importância estudos que foquem em compreender os padrões filogenéticos, populacionais, ecológicos e biogeográficos das espécies ocorrentes na Caatinga, especialmente as endêmicas, para que se possa entender a história mais ampla desse domínio (CAVERS; DICK, 2013), como a perturbação vem historicamente afetando as espécies (LEAL et al., 2005) e como isso pode estar afetando as relações bióticas ocorrentes nesse ambiente (CANUTO et al., 2014).

2.6 *Bionia pedicellata* (Benth) L.P. Queiroz (Fabaceae) como modelo de estudo

A família Fabaceae possui mais de 18.000 espécies distribuídas em 650 gêneros (SOUZA; LORENZI, 2012), apresenta ampla distribuição geográfica, principalmente, nos trópicos e é dividida em seis subfamílias: Caesalpinioideae, Detarioideae, Cercidoideae, Duparquetioideae, Dialioideae e Papilionoideae (LPWG, 2017). Possui grande importância ecológica na dinâmica das comunidades, principalmente em Florestas Secas, com várias espécies nativas, além de ser bastante importante na recuperação de áreas degradadas e manutenção da sustentabilidade dos solos, uma vez que participa ativamente na fixação e ciclagem do nitrogênio atmosférico (YAHARA et al., 2013).

Dentro da subfamília Papilionoideae, encontra-se *Bionia pedicellata* que antes era denominada *Camptosema pedicellatum*, mas que foi reestabelecida em uma revisão do gênero *Bionia* (QUEIROZ, 2008). É uma espécie de ocorrência neotropical, semi-lenhosa, arbustiva com folhas unifolioladas (QUEIROZ, 2008; TEIXEIRA et al., 2012). Suas flores estão dispostas em uma inflorescência racemosa, apical e axial e são pentâmeras, tubulares, com pétalas vermelhas e possuem câmara nectarífera. Cada indivíduo apresenta cerca de 26 inflorescências e 12 flores por inflorescência (DEMETRIO, 2008), seus frutos são do tipo legume e possuem deiscência elástica ou explosiva (QUEIROZ, 2008).

Demetrio (2008) analisou a fenologia, biologia floral e sistema reprodutivo da população de *B. pedicellata* no Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco, Brasil) e os principais resultados desse trabalho foram que o pico de floração é no mês de agosto, a antese dura três dias com alta produção de um néctar concentrado, a viabilidade polínica é alta e cinco espécies de beija-flores são os polinizadores. Além disso, destaca-se que *B. pedicellata* é uma espécie auto-incompatível apresentando um baixo percentual de formação de frutos.

3 CAPÍTULO I

(Manuscrito a ser enviado para o periódico **Plant Ecology & Diversity**)

Are the differences in floral traits and nectar production shaped by the pollinators guild in populations of the self-incompatible and ornithophilous *Bionia pedicellata* (Fabaceae)?

Camila Miranda Barbosa¹, Nayara Silva Lins de Albuquerque¹, Diego Sotero de Barros Pinangé², Lucas Erickson Nascimento da Costa¹, Isabel Cristina Machado¹

¹Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, Pernambuco, Brasil.

²Departamento de Genética, Universidade Federal do Amazonas, Manaus 69077-000, Amazonas, Brasil.

Abstract

Background: Plant morphological characteristics are shaped by both abiotic and biotic factors and these changes can lead to greater adaptability of the species to their environment, which interferes in their ecological processes.

Aims: We chose *Bionia pedicellata* in order to understand the morphological variation in the floral traits and reproductive population ecological aspects of this species throughout its distribution.

Methods: We evaluated three different populations throughout its distribution in Caatinga, monitoring their floral visitors, differences in their floral traits and the patterns of nectar production and supply and how all these aspects relate within and between populations.

Results: We found significant differences in floral traits between populations, a geographic variation in the pollinator guild, and differences in concentration and volume of whole nectar between populations. We did not find differences in nectar patterns within populations and throughout the day and mixed model analysis showed no relationship between pollinator bill size and corolla tube size. However, it is possible to observe a coupling of the size distribution of the pollinating hummingbird's bill with the size of the floral traits.

Conclusions: The differences observed between populations should be explained by phenotypic plasticity of floral traits in response to an environmental adjustment in each habitat where the species is found. However, with the coupling of floral traits linked to reproduction with the size of the pollinator's bill, we believe that hummingbirds may also be exerting selective pressure and, therefore, we suggest further studies in this regard.

Keywords: floral biology, adaptability, reproductive ecology, Dry Forest

Introduction

Pollination stands out as a necessary ecological process for plant reproduction, increased genetic variability through cross-pollination and consequent adaptation to the habitats where they occur (Hanski 1989; Begon et al. 2007; Mehanna and Penha 2011). These adaptations usually occur in traits directly linked to plant reproductive success and, therefore, it is possible to observe morphological variations in floral traits and resource production so that plant species suit their local pollinators (Hanski 1991; Nattero and Cocucci 2007; Cosacov et al. 2014). This process depends on the adjustments between flowers and pollen vectors, which can evolve in one direction to ensure the frequency of pollinators' visit to plants and pollinator resources, making pollination a more effective process (Faegri and van der Pijl 1979; Machado et al. 2007, Martins 2013).

Nevertheless, the same plant species may have different pollinators along with its range, which may modify its reproductive success and, consequently, its adaptation and evolution in different populations within ecosystems (Brown 1984; Slatkin 1985). As a result, morphological variation in flowers is often observed among plant populations that interact with different sets of pollinators (Capucho et al. 2006; Dalsgaard et al. 2009) and this may be reflected in intraspecific changes in morphology with pollinators changing floral traits and driving evolutionary processes (Whitall and Hodges 2007). Changes in floral traits are usually accompanied by changes in the supply of resources, with a relationship between flower sizes and the amount of resource produced (Berg 1959; Herrera 1990; Galleto and Bernardello 2004; Kaczorowski et al. 2005). This integration contributes to the selective pressure on the part of the pollinators, who select individuals with floral traits directly linked to the greater production of the resource (Fenster et al. 2006).

In the Neotropics, the main bird pollinators are hummingbirds (Proctor et al. 1996; Machado 2009; Las-Casas et al. 2012) and studies have shown a structure between flower morphology, hummingbird bill size and efficiency of resource use in the plant-pollinator relationship (Maglianesi et al. 2014). Their behaviors - territorialist or traplining (Longo and Fischer 2006) - are directly related to pollen flow and it is essential to understand how they behave during flower visits to understand how this ecological relationship happens (Linhart 1987). Understanding how these pollinators behave, how they pollinate flower patches, how often and how effective their visits are, is crucial to knowing which floral traits can be modified and to understanding how this process shapes flower characteristics (Hainsworth and

Wolf 1972; Linhart 1987; Longo and Fischer 2006; Nattero and Cocucci 2007; Niet and Johnson 2012).

However, not only floral attributes can be shaped by biotic agents such as pollinators, but they can also be influenced by abiotic factors such as rainfall and temperature. According to Chevin and Hoffmann (2017), environments with extreme characteristics can generate and accelerate phenotypic plasticity in plant species by changing floral traits that determine their survival. This can be applied when dealing with an ecosystem such as Seasonally Tropical Dry Forests, which has two different seasons, rainy and dry, throughout the year (Leal et al. 2005). This modeling of floral traits can also be influenced by genetic events such as genetic drift (Wanderley et al. 2017).

It is interesting that there is a balance between the action of the environment on the ontogeny of floral characters and the pressure of agents directly linked to the reproductive success of the plant, as pollinators (Herrera 1990; Fenster et al. 2006), causing the maintenance of lineages and adaptive evolution to the restrictive environment in which this species occurs. In this direction, the present work evaluates possible modifications in floral traits of a Caatinga species, analyzing its floral phenotype, its pollinators and the production and supply of resources. We chose *Bionia pedicellata* (L.P. Queiroz) (Fabaceae), a widespread shrub in Brazilian dry forests, as a model for understanding how a self-incompatible and ornithophilous species has its floral traits modeled geographically by its pollinators and environment.

We try to understand population differentiation from the point of view of reproductive ecology and, for this, we evaluated three different and distant populations of *B. pedicellata*, and, aiming: (1) to characterize and compare the pollinator guilds found among the populations; (2) to verify if there are differences between floral traits and resource production; (3) to assess whether resource production and supply differ within and between populations; (4) to analyze whether floral attributes are shaped by the pollinators. Our hypothesis are: (a) there is a geographic differentiation in the pollinator guilds; (b) there is an intra and interpopulation differentiation between floral phenotype and nectar production; (c) the nectar production and supply differs between and inside populations and (d) the floral traits and nectar production are shaped by the pollinators guild.

Materials and Methods

Study areas

The fieldwork was carried out in three areas of natural occurrence of *Bionia pedicellata* in the Caatinga in northeastern Brazil. The Caatinga is characterized by the presence of two marked dry and wet seasons, and the last one is concentrated in only three months per year (Sampaio 1995), and a semiarid climate (BSh – Köppen 1948). The three selected areas are located in the municipalities of Crato at Ceará state at Araripe National Forest (7°14'3.012"S 39°24'33.840"W), Buíque (Catimbau National Park) at Pernambuco state (8°31'55.992"S 37°14'34.008"W), and Caetité at Bahia state (14°07'53.972"S 42°30'14.879"W); the main characteristics of the areas are plotted at Table 1 and the location points are showed at the map at Figure 1. The populations are distributed in paths and were founded at rock outcrops, usually nearby roads.

Study species

Bionia pedicellata is a shrub with flowers distributed in a raceme inflorescence (Queiroz 2008; Figure 2A). The flowers have an average of eight ovules per ovary, ten fused stamens with almost all the pollen grains viable (95,81%) and a nectariferous chamber at the intern base of corolla (Demetrio 2008). We chose this species because it has known phenology, wide distribution in the Caatinga, being endemic to this domain, it depends on hummingbirds for its pollination and because it has morphological variations previously described in collections, which made it a great model for testing our hypotheses. The field data were collected at the flowering season between July and September of 2017 during the wet season. The methods below were applied to each study area, except the accumulated nectar and pollinator data of Buíque population, which was taken for comparison from a previous study (Demetrio 2008).

Floral visitors

We realized 60 hours of focal observation (according to protocols suggested by Altmann 1974) in each study area. A previous study (Demetrio 2008) determined the range time of pollinators' activities and, based on this information, the observations were done between 6 am and 4 pm for three days, which corresponded to the anthesis period. The plant with the highest number of flowers in the population was chosen as a focal plant with a range of 15 to 20 flowers per inflorescence, varying for each population. During the observation we

collected data of pollinators' species, visit hour and frequency, pollinator's behavior and type of visit (i.e., whether pollination or nectar robber). The hummingbirds and its foraging behavior were identified by photos and comparisons with specialized literature (Erize et al. 2006).

Floral morphometry and bill length

Three flowers of ten individuals per population of *B. pedicellata* were collected and stored in alcohol 70%. Later, the morphometry analysis and measures of floral traits were made in the laboratory, using photographs of both the whole and dismembered flowers with a scale. These ten floral traits were measured from the photographs using ImageJ software (Rasband 2016): flower size (FS), calyx length (CL), standard length (SL), standard width (SW), wings length (WL), wings width (WW), keel length (KL), keel width (KW), stamen length (STL) and pistil length (PL) (Figure 3).

The pollinators' bill size measurements were obtained by measuring individuals collected by specialists and deposited in the Collection of the Birds Division of the Zoological Museum of the Feira de Santana State University (DAMUEFS), which were provided by the curator, and in the collection of birds of the Federal University of Pernambuco, both in Brazil.

Nectar

To the nectar measurement, other different three flowers from ten individuals per population were bagged at the beginning of anthesis to avoid any visit and nectar removal. At the end of the day, the accumulate nectar was taken from the nectar chamber using a micro calibrated syringe 25µl (Microliter ®) to measure the total volume and, after that, using a pocket refractometer of 0-50% (Atago ®), we measure the sugar concentration. The nectar production inside populations was also taken from open flowers by protocol standing-crop established by Dafni et al. (2005) during three intervals across the day (08:00-10:59, 11:00-13h59, 14:00-16:00h) in ten individuals without measuring the nectar volume more than once in a single flower.

Data analysis

In order to analyze general differences in floral traits intra- and between populations, we applied a nested MANOVA with Bonferroni corrections in the post hoc test for each trait individually (Weinfurt 1995). We analyzed general relationships between floral traits and resource production among populations with a principal component analysis (PCA), using spectral decomposition in order to analyze the correlations between floral traits considering all

individuals per population in each sampling area. We assume the area factor (populations) capturing environmental differences (altitude, precipitation, temperature) to assess the influence of environmental factors on floral traits.

To evaluate whether there is a relationship of floral traits with the pollinator, histograms were made with the frequency distribution of the floral tube, stamen and pistil lengths and the pollinator bill length for each population studied. The data were transformed into log10 to fit the normal distribution and the graphs were placed on the same scale allowing comparison of sizes. To evaluate the coupling between plant-pollinator, the frequency distribution area of the floral traits was plotted on the graph and plotted over on the pollinator bill size graphs.

To test whether there is a relationship of floral traits with the most frequent pollinator, a mixed generalized model (GLMM) was applied using the R package ‘lm4’ (Bates et al. 2014). To run the model, we considered the size of the bill as a fixed factor, the populations as a random factor and the length of the floral tube as the dependent variable.

The nectar data were tested by Shapiro-Wilk normality test, after that differences in nectar volume and concentration and energetic availability within and between the study areas were analyzed using Kruskal-Wallis test; when significant differences were found, the post hoc test Student-Newman-Keuls was performed on R software. The amount of sugar per flower (energetic availability) was calculated for each area according to protocols established by Dafni et al. (2005).

Results

We found geographic variation between populations in floral traits, pollinators' guild and nectar production. The results from MANOVA test showed differences between populations in all floral traits and in nectar concentration. Interestingly, floral traits diverged more within rather between populations, as can be seen from the low value of the Wilks test for intrapopulation analysis (Table 2). Considering the interpopulation variation, Buíque was the most different population with most of the measured floral traits differing from other populations. When we observed the intrapopulation variation, the Crato population showed variation between individuals for all measured floral traits, except for nectar volume (Table 2).

Buíque X Caetité

Most floral traits measured differentiated these populations, except wing width, keel width, stamen length, pistil length, volume and concentration of nectar (Table 2). Analysis of the accumulated volume and concentration of nectar did not differentiate these populations ($H = 5.5446$; $p = 0.382$ and $H = 7.3148$; $p = 0.2488$, respectively; Figure 4). Energy availability also did not differ between areas ($H = 6.8367$; $p = 0.2811$), once Buíque had an average of available joules of $216.02J (\pm 116.19)$ and Caetité an average of $166.25J (\pm 81.95)$.

Buíque X Crato

These two populations were the most divergent in all analysis of floral traits and nectar production. Except for the trait nectar volume, all floral traits were able to differentiate these populations (Table 2). Crato showed a lower amount and quality of accumulated nectar when compared to Buíque ($H = 22.2407$; $p < 0.001$; Figure 4) and this was maintained when the energy availability of both populations was analyzed with discrepant averages of $93.33J (\pm 51.92)$ for Crato and $216.02J (\pm 116.19)$ for Buíque.

Crato X Caetité

Standard wing width, keel width, and stamen length were the floral traits that showed differences between Crato and Caetité populations (Table 2). These differences can also be observed in the accumulated nectar measurements ($H = 14,9259$; $p = 0.013$; Figure 4) and in the average of energy availability ($15,3704$; $p < 0.001$).

When observed overall trait relationships related to populations, the principal component analysis explained 72.8% of the variation in the first two axes and showed that most of the floral traits were correlated and had a low contribution to the first two axes (Figure 5). The most important floral traits to explain the first axis was keel length, wings length, flower size, stamen length, calyx length, and pistil length, while the second axis was majorly explained by both nectar volume and concentration (Figure 5). Although the phenotype of the populations of the three areas were overlapped, it was possible to visualize a trend to the differentiation between the populations of Buíque and Crato, while the population of Caetité was placed in the middle of the gradient overlapping the populations of Buíque and Crato (Figure 5).

For the standing-crop nectar analysis, the Kruskal-Wallis test values showed no differences throughout the day within either population for nectar concentration or volume, as can be seen in Table 3. Volume and concentration of accumulated nectar showed a clear difference between Crato population and the others (vol.: $H = 8.668$; $p < 0.01$ and con.: $H =$

13.1835; $p < 0.01$; Figure 4). We found significant differences in almost all the floral traits, nectar, and pollinators between the populations.

In total, six hummingbird species were observed pollinating the flowers of *B. pedicellata*, but the richness of hummingbirds per population is variable, besides one wasp, two butterfly (Figure 2C) and one bee species were observed but did not pollinate the flowers (Table 4). In Crato population, the only pollinator was *Phaethornis pretrei* (Figure 2B) a hummingbird that exhibits a trap-line behavior, which was responsible for more than 70% of the visits. During the observation period, always at the beginning of the day, the species performed a reconnaissance flight and then begin the route of visits to *B. pedicellata* flowers, making at least one visit per hour until 16h. In all visits, the hummingbird contacted the stigma and anthers of flowers and visited more than one individual per route. In addition to *P. pretrei*, visits were observed of two species of butterflies, a wasp, and *Trigona spinipes* that only robbing the nectar, damaging the sepals to access the nectar chamber without contacting the reproductive floral parts.

Phaethornis pretrei was also pollinator, with 25% of visitation rate along with *Amazilia fimbriata*, responsible for the 75% remain of visitation rate in Caetité population (Table 4). Different from *P. pretrei*, *A. fimbriata* presents a territorialist behavior, which caused that this bird visited few individuals of *B. pedicellata* and prevented the approach of the other hummingbirds. The visits of *P. pretrei* always occurred in the late afternoon when *A. fimbriata* left the territory near the flowers. Both introduced the bills in the corolla to reach the nectariferous chamber and consequently contacted the reproductive structures of the flowers. At the Buíque population, *Chlorostilbon lucidus*, *P. pretrei*, *A. fimbriata*, *Eupetomena macroura* and *Anopetia gounellei* pollinated the flowers of *B. pedicellata* (Table 4) as found by Demetrio (2008), but *C. lucidus* also act as pillagers sometimes (Figure 2D). The average bill size of pollinators is described in Table 4.

We found no relationship between bill length and corolla tube among populations in the mixed model test ($\beta = 31.35$; $p = 0.699$; Figure 6), however, when comparing the histograms with the frequency distribution of pollinators' bills and floral traits directly linked to pollination, it was possible to observe coupling. The size of *P. pretrei* bill coupled with the three traits evaluated: corolla tube size, pistil length and stamen length in the three populations (Figures 7, 8 and 9). It was also possible to observe this coupling with *A. gounellei* in the population of

Buíque and the size of the hummingbird bill *E. macroura* coupled, also in this population, with the length of the stamen and the pistil (Figure 8).

Discussion

B. pedicellata showed variations on its floral traits (Table 2), resource production (Table 2, Figure 4) and pollinator guild (Table 4) and this occurred both among and within the populations studied here, with the exception of nectar production which did not vary within populations (Table 3). In this way, we corroborate the hypotheses that there are geographical differences in the pollinator guild and that these variations can also be observed in floral traits and in the production of interpopulation nectar. It was not possible to statistically corroborate the hypothesis that pollinators shape these variations, but we observed a coupling between the size distribution of the floral traits (corolla, pistil and stamen lengths) with the distribution of the size of the bill of some pollinators.

Although there was much variation in floral traits between and within populations and a geographic differentiation between pollinators, they were not statistically able to differentiate the three populations. However, when comparing populations pairwise, we can see differentiation in floral traits. It is also possible to observe differentiation in floral traits within populations, especially in the lengths of flowers, petals and calyx, which are characteristics both linked to the direct attraction of pollinators and associated with plant growth according to its environment. Yet, the phenotype might be influenced by many factors such as pollinator morphology, including bill size and environmental patterns (Dalsgaard et al. 2009).

Evaluating the main floral traits that show differences between populations, we can see that most are directly related to characteristics of pollinators, such as corolla, stamen and pistil sizes. Extreme environments with some type of abiotic stress, such as Caatinga and its drought regime can generate a high level of plasticity in traits of plants capable of changing the environment (Chevin and Hoffman 2017). Thus, changes in floral traits, which are related to reproduction and consequent maintenance of plant species in ecosystems, can directly affect ecological relationships, bringing greater adaptability as we are seeing in *B. pedicellata*.

Nectar did not show any correlation with the floral traits, in fact, it was orthogonally related, which shows different directions for the size of the floral traits and the resource production. Over the years, several researches have demonstrated that there is a direct

correlation between the floral size and resource production (Berg 1959; Harder et al. 1985; Galleto and Bernardello 2004; Kaczorowski et al. 2005; Fenster et al. 2006). Fenster and collaborators (2006) affirm that this relationship must be reflected in a pollinator's ability to discriminate individuals within a population. However, it was not the pattern found here and this may be related to the restrictive environment in which *B. pedicellata* is found. Thus, the pollinator looking for what it is available to feed without necessarily distinguishing the size of the flowers and their relationship with the nectar production.

The intrapopulation variation in nectar production and in floral traits observed here is more an intrinsic variation of the species in response to the environment than a selective pressure exercised by the pollinator. This intrapopulation change in floral traits and in the supply of resources is considered as a first step in the selection of floral visitors (Herrera 1996; Fenster et al. 2006). Subsequently, pollinators act by selecting individuals with different sizes of the corolla tube, length of the stamen and pistil according to the location of deposit of pollen in the body, which generates a balance between the influence of the environment on the occurrence of floral traits and the selection by biotic agents responsible for the pollination process (Berg 1959).

Standing-crop nectar measurements provide results on the true reward available to pollinators (Galleto and Bernardello 2005), however, nectar production did not vary throughout the day among individuals within the same population. In contrast, when we analyze the total nectar production in each population and compare this production between populations, it can be seen that both the concentration and volume of nectar accumulated throughout the day and the energy availability is lower in the Crato population than in the other two that do not show differences between them. Crato is the only population that presented only one pollinator, *P. pretrei*, which exhibits trap-line behavior. Lower quality and amount of nectar and energy available in each flower ensures more than one individual can visit (Longo and Fisher 2006).

P. pretrei is a large hummingbird and has a higher energy demand (Mc Dade and Weeks 2004) when compared to the other species found in this study, and this can optimize cross-pollination (Torres-Venegas et al. 2019). The production of a small volume and less concentrated nectar per flower and the existence of many available flowers may be related to the crossing guarantee, since the hummingbird requires a large amount of food and energy to survive and, to supply that, must visit many flowers at the same time (Bolten and Feinsinger 1978).

According to Lanna et al. (2017), a territorialist behavior, such as that of pollinating hummingbird species found in the populations of Buíque and Caetité, ensures greater access to resources. Different of trapline hummingbirds which tend to adjust visiting times according to nectar availability and possible competitive losses (Gill 1988), offsetting their energy demand by visiting a larger number of flower spots. In addition, the availability of nectar with a high sugar concentration can maintain an efficient proportion of pollinators, despite the available volume, the hummingbird continues to visit the flowers (Matias et al. 2019). The hummingbird is able to changes its visitation rates according to the quantity and quality of nectar available (Garrison and Gass 1999), which corroborates our assumption that there is an adjustment made by the plant that ensures visitation rate, since the pollinator guild can adjust its foraging strategies by demonstrating resilience to different environments as suggested by Chevin and Hoffmann (2017).

The relationship of *B. pedicellata* with its pollinators is not species-specific, although this species has ornithophilous flowers. We have seen a pollinator guild variation along with geographic distribution and this may be directly related to the process of adaptability of this species to their local habitats, which is already well documented in the literature (Faegri and van der Pijl 1979; Schluter 2000; Schiestl 2012; Sun et al. 2014). The plant plasticity can also be driven by the pollinators guild's resilience to change their foraging strategies in the face of environmental changes, which makes for a bilateral adjustment (Chevin and Hoffmann 2017).

Analyzing the relationship between flower size and pollinator bill size in all populations we did not observe a significant relationship between these two traits, however, when comparing the frequency distributions of these traits we can observe that there is a coupling between floral traits and the size of the pollinator's bills. This positive relationship between floral trait and pollinating hummingbird bill is already documented in other studies on the plant-pollinating geographical relationship with another ornithophilous species (Nattero and Cocucci 2007). According to the authors, the positive correlation between pollinator corolla and bill morphologies and the incidence of high variation among populations support the hypothesis that flowers are shaped by local pollinators and assume that there is a unilateral adaptation of flowers to their pollinators.

When we compare the populations with each other, we can see that there is no geographical differentiation of the characteristics of the individuals of *B. pedicellata*, because we observed Caetité, the most distant population geographically, as a 'middle term' between

Crato and Buíque, which are the two most next. However, by evaluating the pollinator guild of each population we can observe a relationship between these patterns. Caetité and Crato have the most frequent pollinator, *P. pretrei*, a trapline hummingbird, while Buíque shows *C. lucidus*, a territorialist pollinator, as the most frequent, which may be leading to a differentiation of this population from others through phenotypic selection.

Territorial hummingbirds defend and collect resources from small flowering patches and consequently end up pollinating close individuals, which can lead to self-pollination or consanguinity, reducing pollen flow (Linhart 1987; Hadley et al. 2017). In contrast, trapline-foraging hummingbirds tend to exploit different patches of flowers within a population, reaching long distances and facilitating cross-pollination, and increasing intrapopulation pollen flow (Taylor and White 2007). In addition, there is a relationship between hummingbird bill size and foraging type, since territorialists have short bills while trapline have long ones (Torres-Venegas et al. 2019). Thus, the type of foraging not only interferes with pollen flow in populations but may also select floral phenotypes, as we can see in our study, as there are differences in the most frequent pollinators of each population and their types of foraging and pollen also, in the associated floral traits.

We can observe that there is a coupling between the floral traits of *B. pedicellata* and *P. pretrei*. This tendency is easily observed in the population of Crato, where this hummingbird is the only pollinator. However, it is also possible to see this happening with the other two populations, although this hummingbird is not the most common. Pollinators with territorialist behavior can reduce the number of visits of trapline pollinators (Torres-Venegas et al. 2019), as observed in the population of Caetité and Buíque and this may directly influence the size of floral traits and the plant-pollinator relationship occurring in these two populations.

Further studies

We suggest additional studies on phenotypic selection including a further analysis on the relationship between the morphological characteristics of pollinating hummingbirds and floral traits. Studies evaluating the distribution of genetic lineages are also important to help to understand the life history of *B. pedicellata*, how they are behaving in the evolutionary time and how the abiotic environment is shaping their reproductive characteristics. Our study demonstrated variations between populations of *B. pedicellata*, which makes it interesting to evaluate conservation strategies for maintaining these peculiar characteristics of each population.

Acknowledgments

We thank Karina Linhares (Crato-CE) and Sinzinando Albuquerque (PPGBV-UFPE) for help with data and field collection, Caio Graco Machado from Universidade Federal de Feira de Santana and Flor Maria Guedes from Universidade Federal de Pernambuco both for kindly handing over data from the bird collection. We also thank CNPq for a productivity research grant to ICM (number: 311021/2014-0) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério de Educação do Brasil – Finance Code 001 to provide the fellowship to the first author.

References

- Altmann J. 1974. Observational study of behavior: Sampling methods. *Behaviour*. 49: 227-267.
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*. 67:1-48.
- Begon M, Townsend BR, Harper JL. 2007. *Ecologia: de indivíduos a ecossistemas*. 4ed. Porto Alegre (BR): Artmed.
- Berg, LR. 1959. A general evolutionary principle underlying the origin of developmental homeostasis. *American Society of Naturalists*. 93: 103-105
- Bolten A, Feinsinger P. 1978. Why do hummingbird flowers secrete dilute nectar? *Biotropica*. 10: 307-309.
- Brown JH. 1984. On the relationship between abundance and distribution of species. *The American Naturalist*. 124: 255-279.
- Capucho LC, Dalcolmo S, Formigoni TH, Silva AG. 2007. Bromélias e beija-flores: um modelo observacional para testar hipóteses sobre correlações e adaptações morfológicas recíprocas. *Rodriguésia*. 58: 49-58.
- Chevin LM, Hoffmann AA. 2017. Evolution of phenotypic plasticity in extreme environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 372: 20160138
- Cosacov A, Cocucci AA, Sérsic AN. 2014. Geographical differentiation in floral traits across the distribution range of the Patagonian oil-secreting *Calceolaria polyrhiza*: do pollinators matter? *Annals of Botany*. 113: 251-266.

- Dafni A, Kevan PG, Husband BC. 2005. Practical pollination biology. Ontario: Enviroquest Ltd.
- Dalsgaard B, González AMM, Olesen JM, Ollerton J, Timmermann A, Andersen LH, Tossas AG. 2009. Plant-hummingbird interactions in the West Indies: floral specialisation gradients associated with environment and hummingbird size. *Oecologia*. 159: 757-766.
- Demetrio KM. 2008. Fenologia e biologia reprodutiva de duas espécies ornitófilas do Parque Nacional do Catimbau, Buíque/PE [master's thesis]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco.
- Erize F, Mata JRR, Rumboll M. 2006. Birds of South America non passerines: Rheas to Woodpeckers. Princeton: Princeton University Press.
- Faegri K, Van Der Pijl L. 1980. Principles of pollination ecology. New York (TO): Pergamon.
- Fenster CB, Cheely G, Dudash MR, Reynolds RJ. 2006. Nectar reward and advertisement in hummingbird-pollinated *Silene virginica* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany*. 93: 1800-1807.
- Galetto L, Bernardello G. 2004. Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six *Ipomoea* species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of Botany*. 94: 269-280.
- Galetto L, Bernardello G. 2005. Nectar. In: Dafni A, Kevan P, Husband BC, editors. Practical Pollination Biology. Ontario: Enviroquest; p. 261-313.
- Garrison JSE and Gass CL. 1999. Response of traplining hummingbird to changes in nectar availability. *Behavioral Ecology*. 10: 714-725.
- Guisan A, Thuiller W. 2005. Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecology Letters*. 8: 993-1009.
- Hadley AS, Frey SJK, Robinson WD, Betts MG. 2017. Forest fragmentation and loss reduce richness, availability, and specialization in tropical hummingbird communities. *Biotropica*. 0:1-10.
- Hainsworth FR, Wolf LL. 1972. Crop volume, nectar concentration and hummingbird energetics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 42: 359-366.
- Hanski I, Simberloff D. 1997. The metapopulation approach, its history, conceptual domain, and application to conservation. In: Hanski I, Gilpin ME, editors. *Metapopulation Biology*. [place unknown]: Academic Press; p. 5-26.

- Hanski I. 1989. Metapopulation dynamics: does it help to have more of the same? *Tree*. 4: 113-114.
- Hanski I. 1991. Single-species metapopulation dynamics: concepts, models and observations. *Biological Journal of Linnean Society*. 42: 17-38.
- Herrera CM. 1990. The adaptedness of the floral phenotype in a relict endemic, hawkmoth-pollinated violet. 1. Reproductive correlates of floral variation. *Biological Journal of the Linnean Society*. 40: 263-274.
- Köppen W. 1948. *Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra*. Fondo de Cultura Econômica. México: Fondo de Cultura Econômica.
- Kaczorowski RL, Gardener M, Holtsford TP. 2005. Nectar traits in *Nicotiana* section *Alatae* (Solanaceae) in relation to floral traits, pollinators, and mating system. *American Journal of Botany*. 92: 1270-1283
- Lanna LL, Azevedo CS, Claudino RM, Oliveira R, Antonini Y. 2017. Feeding behavior by hummingbirds (Aves: Trochilidae) in artificial food patches in an Atlantic Forest remnant in southeastern Brazil. *Zoologia*. 34: 1-9.
- Las-Casas FMG, Azevedo SM, Dias MM. 2012. The community of hummingbirds (Aves: Trochilidae) and the assemblage of flowers in a Caatinga vegetation. *Brazilian Journal of Biology*. 72: 51-58.
- Leal IR, Silva JMC, Tabarelli M, Lacher Jr TE. 2005. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. *Megadiversidade*. 1: 139-146.
- Levins R. 1969. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bulletin of the Entomological Society of America*. 15: 237-240.
- Linhart Y, Busby W, Beach J, Feinsinger P. 1987. Forager behavior, pollen dispersal, and inbreeding in two species of hummingbird-pollinated plants. *Evolution*. 41: 679-682.
- Longo JM, Fischer E. 2006. Efeito da taxa de secreção de néctar sobre a polinização e a produção de sementes em flores de *Passiflora speciosa* Gardn. (Passifloraceae) no Pantanal. *Revista Brasileira de Botânica*. 29: 481-488.
- Machado CG, Coelho AG, Santana CS, Rodrigues M. 2007. Beija-flores e seus recursos florais em uma área de campo rupestre da Chapada Diamantina, Bahia. *Revista Brasileira de Ornitologia*. 15: 267-279.

- Machado CG. 2009 Beija-flores (Aves: Trochilidae) e seus recursos florais em uma área de caatinga da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Zoologia*. 26: 255-265.
- Maglianesi MA, Blüthge N, Böhning-Gaese K, Schleuning M. 2014. Morphological traits determine specialization and resource use in plant–hummingbird networks in the Neotropics. *Ecology*. 95: 3325-3334.
- Martins AB. 2013. Abordagens históricas no estudo das interações planta-polinizador. *Oecologia Australis*. 17: 39-52.
- Matias R, Furtado MT, Rodrigues SB, Consolaro H. 2019. Floral resource availability of *Dicliptera squarrosa* (Acanthaceae) and its dependence on hummingbirds for fruit formation in a forest fragment of Central Brazil. *Plant Ecology and Evolution*. 152: 68-77.
- McDade L, Weeks J. 2004. Nectar in hummingbird-pollinated neotropical plants ii: interactions with flower visitors. *Biotropica*. 36: 216-230.
- Mehanna M, Penha J. 2011. Fatores abióticos que afetam a distribuição do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 em riachos de cabeceiras de Chapada dos Guimarães, Bacia do Rio Cuiabá, Mato Grosso. *Bioscience Journal*. 27: 125-137.
- Nattero J, Coccuci AA. 2007. Geographical variation in floral traits of the tree tobacco in relation to its hummingbird pollinator fauna. *Biological Journal of the Linnean Society*. 90: 657-667.
- Niet T, Johnson SD. 2012. Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. *Trends in Ecology and Evolution*. 27: 353-361.
- Proctor M, Yeo P, Lack A. 1996. The natural history of pollination. Portland: Timber Press.
- Queiroz LP. 2008. Re-establishment, synopsis and new combinations in the genus *Bionia* Mart. Ex. Benth. (Leguminosae: Papilionoideae). *Neodiversity*. 3: 13-18.
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.
- Sampaio E. 1995. Overview of the Brazilian Caatinga. In: S.H. Bullock; H.A. Mooney & E. Medina, editors. Seasonally dry tropical forest. Cambridge: Cambridge University Press; p. 35-63.

- Schiestl FP. 2012. Animal pollination and speciation in plants: general mechanisms and examples from the orchids. In: Patiny S, editor. Evolution of plant-pollinator relationships. New York: Cambridge University Press; p. 263-278.
- Schluter D. 2000. The ecology of adaptive radiation. Oxford: Oxford University Press.
- Slatkin M. 1985. Gene flow in natural populations. Annual Review of Ecology and Systematics; 16: 393-430.
- Sun M, Gross K, Schiestl FP. 2014. Floral adaptation to local pollinator guilds in a terrestrial orchid. Annals of Botany. 113: 289-300.
- Taylor J, White S. 2007. Observations of hummingbird feeding behavior at flowers of *Heliconia beckneri* and *H. tortuosa* in southern Costa Rica. Ornitologia Neotropical. 18: 133–138.
- Torres-Vanegas F, Hadley AS, Kormann UG. 2019. The landscape genetic signature of pollination by trapliners: evidence from the tropical herb, *Heliconia tortuosa*. Frontiers in Genetics. 10: 1-12.
- Wanderley AM, Machado ICS, Almeida EM, Félix LP, Galetto L, Benko-Iseppon A, Sork VL. 2017. The roles of geography and environment in divergence within and between two closely related plant species inhabiting an island-like habitat. Journal of Biogeography. 45: 381-393.
- Weinfurt KP. 1995. Multivariate analysis of variance. In Grimm LG and Yarnold PR, editors. Massachusetts. American Psychological Association; p. 245–276.
- Whitall JB, Hodges SA. 2007. Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. Nature. 447: 706-709.

Table 1. Abiotic characteristics of the three studied areas. All the data were taken from climate-data.org.

<i>Study areas</i>	<i>Geographic coordinates</i>	<i>Altitude</i>	<i>Annual precipitation</i>	<i>Annual temperature</i>
<i>Crato (CE)</i>	7°14'3.012"S 39°24'33.840"W	446m	1086mm	25,1°C
<i>Buíque (PE)</i>	8°31'55.992"S 37°14'34.008"W	914m	926mm	21°C
<i>Caetité (BA)</i>	14°07'53.972"S 42°30'14.879"W	1011,7m	862mm	21,8°C

Table 2. Results of the nested MANOVA and *post hoc* one-way ANOVA tests with Bonferroni correction comparing differences in floral traits of three populations of *B. pedicellata* (Fabaceae) in areas of Caatinga in the Northeastern of Brazil. Significant values ($p \leq 0.05$) are highlighted in bold, different letters indicates differences between the groups and the asterisks indicates differences between individuals within populations.

	Crato, Ceará	Buíque, Pernambuco	Caetité, Bahia
	mean $\pm$ SD	mean $\pm$ SD	mean $\pm$ SD
Floral traits	<i>N</i> = 10	<i>N</i> = 10	<i>N</i> = 10
<i>Flower size (mm)</i>	33.2$\pm$2^{a*}	31.1$\pm$1.5^{b*}	33.9$\pm$1.4^a
<i>Calyx length (mm)</i>	15.9$\pm$1.4^{a*}	13.4$\pm$1.4^{b*}	15.7$\pm$1.4^{a*}
<i>Standard length (mm)</i>	29.6$\pm$2.5^{a*}	26.4$\pm$1.8^b	29.9$\pm$1.2^a
<i>Standard width (mm)</i>	17.9$\pm$1.3^{a*}	15.2$\pm$0.7^b	16.6$\pm$1.4^c
<i>Wings length (mm)</i>	28.9$\pm$2^{a*}	25.9$\pm$2^{b*}	28.3$\pm$1^{c*}
<i>Wings width (mm)</i>	4.7$\pm$0.2^{a*}	4.3$\pm$0.3^{b*}	4.3$\pm$0.5^{b*}
<i>Keel length (mm)</i>	30.8$\pm$2.1^{a*}	27.7$\pm$2.2^{b*}	31$\pm$1.4^{a*}
<i>Keel width (mm)</i>	12.2$\pm$0.6^{a*}	10.6$\pm$0.4^{b*}	11.1$\pm$1.2^{b*}
<i>Stamen length (mm)</i>	29.1$\pm$1.3^{a*}	26.6$\pm$1.9^{b*}	28.7$\pm$1.5^{a*}
<i>Pistil length (mm)</i>	30$\pm$1.4^{a*}	27.4$\pm$1.2^b	30$\pm$1.4^c
<i>Nectar volume (μl)</i>	17 $\pm$ 6.5	27.4 $\pm$ 7.3	26.1 $\pm$ 7.1
<i>Nectar concentration (%)</i>	28$\pm$3.5^{a*}	36.9$\pm$5.9^b	33.8 $\pm$ 3.5
Interpopulation: Wilks = 0.096758, F = 4.61, p < 0.00001			
Intrapopulation: Wilks = 0.000001, F = 2.54, p < 0.00001			

Table 3. Nectar measures of exposed flowers (standing crop) in three different times periods inside of three populations of *B. pedicellata* in areas of Caatinga in the Northeastern of Brazil during the flowering season of 2017.

Nectar measures	Time period			Kruskal-Wallis	
	<i>Standing crop</i>	08:00-10:59	11:00-13:59	14:00-16:00	H p-value
Crato, Ceará					
Volume (µl)		12.4 ± 7.5	8.84 ± 4.2	10.9 ± 4.1	0.9 0.63
Concentration (%)		28 ± 0.03	25.5 ± 0.04	27.9 ± 0.02	4.7 0.09
Buíque, Pernambuco					
Volume (µl)		13.6 ± 6.8	8.8 ± 3.2	9.4 ± 5	1.4 0.5
Concentration (%)		27.9 ± 3.2	31 ± 3.8	31.3 ± 8.8	1.7 0.42
Caetité, Bahia					
Volume (µl)		12.8 ± 7.3	14.7 ± 6.2	16.2 ± 5	0.8 0.67
Concentration (%)		31.1 ± 3.5	31.8 ± 4.5	30.8 ± 3.5	0.02 0.98

Table 4. Informative data about floral visitors, bill size of pollinators, number and percentage of visits of each study site collected at natural populations of *B. pedicellata* (Fabaceae) in areas of Caatinga in Northeast of Brazil during the flowering period at July to September of 2017.

Floral Visitors	Bill size (mm)	Number of visits	Percentage of visits (%)
	Average±DP	Crato/Buíque/Caetité	Crato/Buíque/Caetité
Hummingbirds			
<i>Amazilia fimbriata</i>	19±1.3	0 / 1 / 9	0.0 / 0.8 / 75.0
<i>Anopetia gounellei</i>	27.1±1.0	0 / 1 / 0	0.0 / 0.8 / 0.0
<i>Chlorostilbon lucidus</i>	18.8±0.9	0 / 113 / 0	0.0 / 94.2 / 0.0
<i>Eupetomena macroura</i>	23.8±1.1	0 / 2 / 0	0.0 / 1.7 / 0.0
<i>Phaethornis pretrei</i>	32.4±1.2	34 / 3 / 3	70.8 / 2.5 / 25.0
Bees			
<i>Trigona spinipes</i>	-	5 / 0 / 0	10.4 / 0.0 / 0.0
Wasps			
Vespidae	-	2 / 0 / 0	4.2 / 0.0 / 0.0
Butterflies			
Lepidoptera sp 1	-	6 / 0 / 0	12.5 / 0.0 / 0.0
Lepidoptera sp 2	-	1 / 0 / 0	2.1 / 0.0 / 0.0

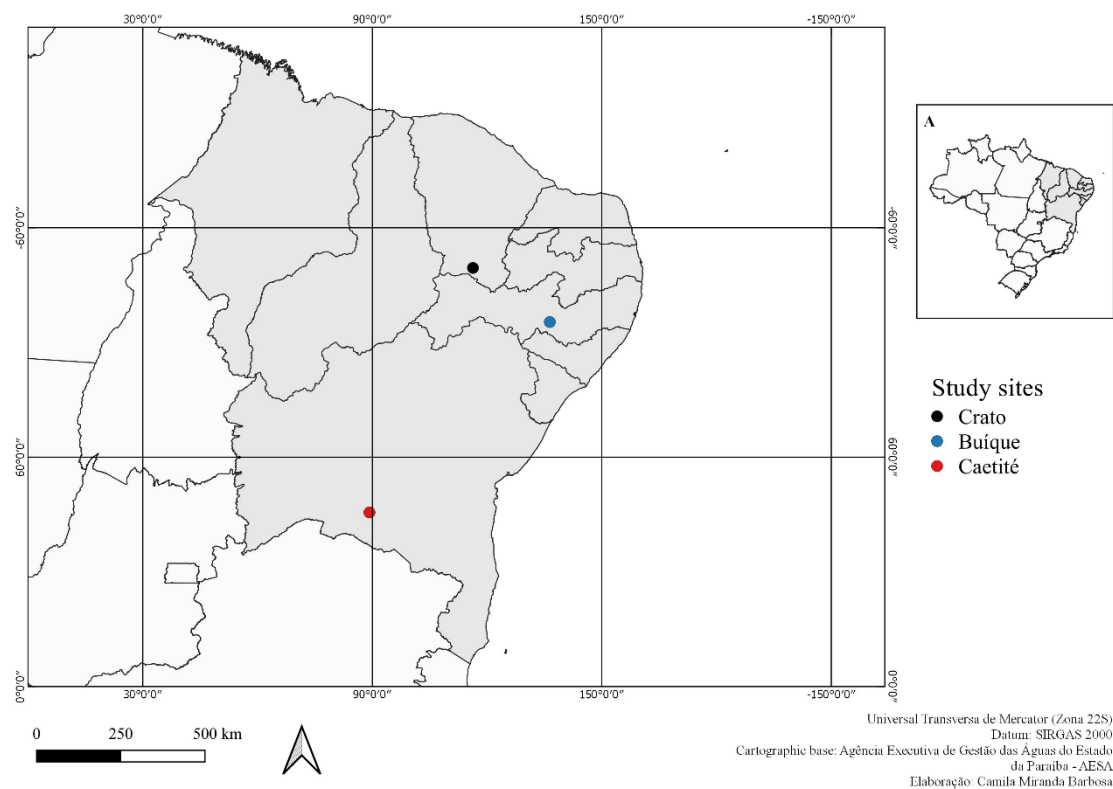


Figure 1. Geographic location of the three studied populations of *B. pedicellata* in Northeast of Brazil.



Figure 2. (A) Inflorescence of *B. pedicellata*; (B) *Phaethornis pretrei* pollinating the flower of *B. pedicellata*; (C) Butterfly and (D) *Chlorostilbon lucidus* acting as nectar robbers at the flowers of *B. pedicellata*.

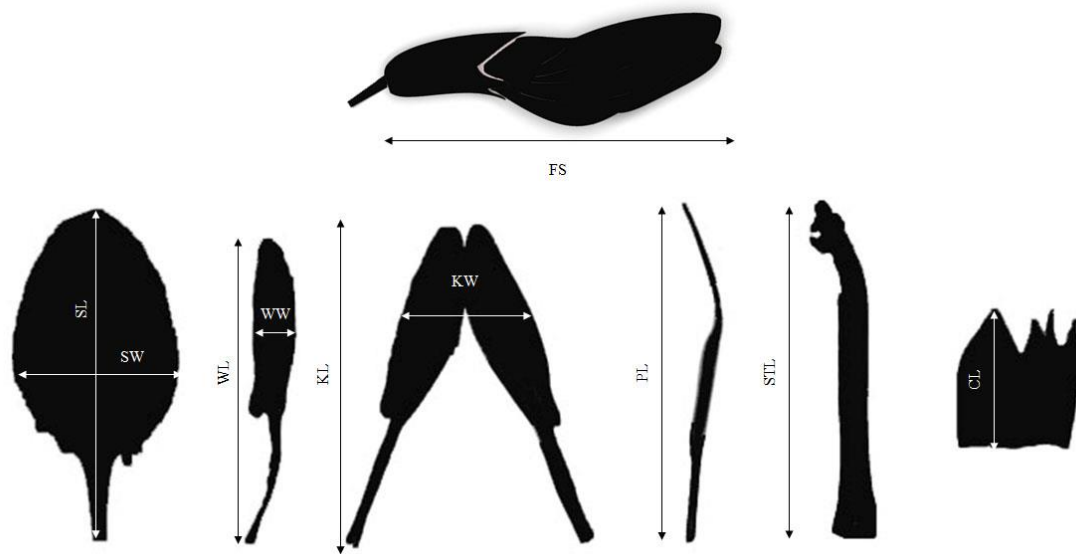


Figure 3. Floral traits collected by whole and dismembered flowers of *B. pedicellata* using the software ImageJ (Rasband 2016). FS: flower size; SL: standard length; SW: standard width; WL: wings length; WW: wings width; KL: keel length; KW: keel width; PL: pistil length; STL: stamen length; CL: calyx length.

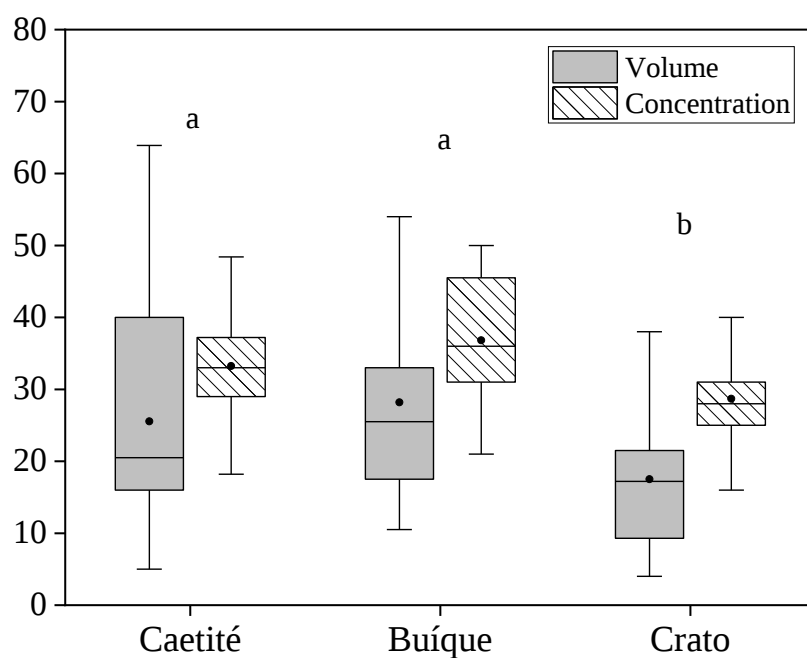


Figure 4. Differences between accumulate nectar measures, volume ($H=8.6680$; $p=0.0131$) and concentration ($H=13.1835$; $p=0.0014$) in the three *B. pedicellata* populations in areas of Caatinga in the Northeastern of Brazil during the flowering season of 2017. Bars with different letters are significantly different (pos hoc Student-Newman-Keuls, $p<0.05$), line into the box represents the median and black dots represents the mean.

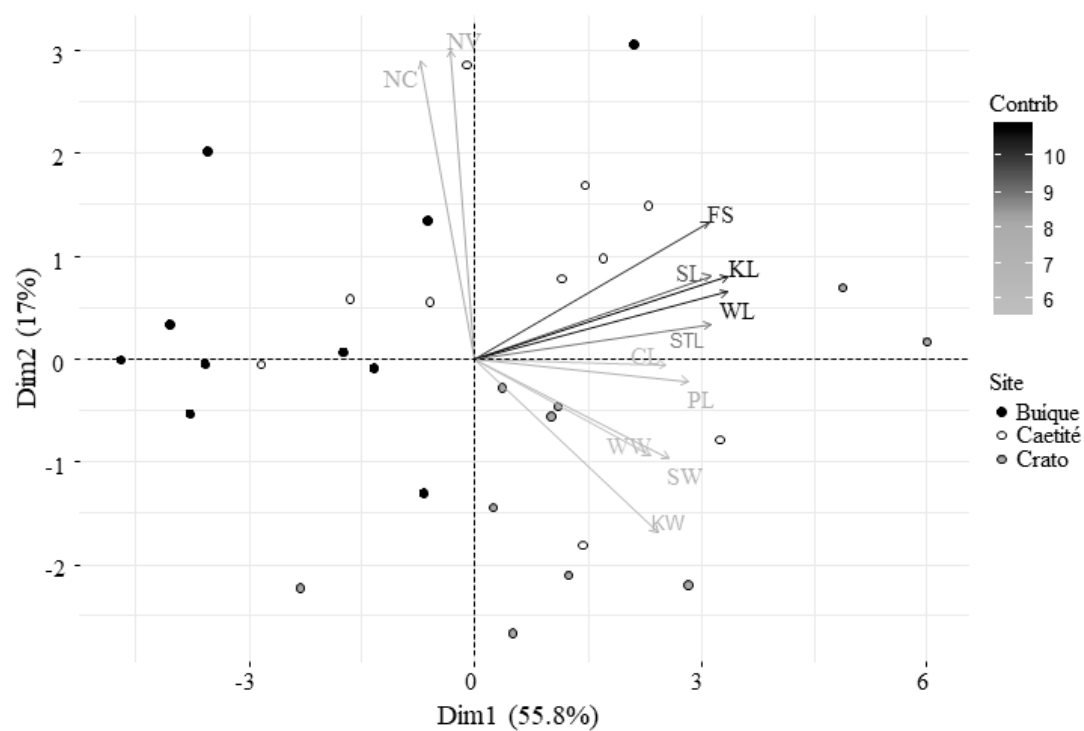


Figure 5. Diagram of the Principal Component Analysis for floral traits relationship in three natural populations of *B. pedicellata*. FS: flower size; SL: standard length; SW: standard width; WL: wings length; WW: wings width; KL: keel length; KW: keel width; PL: pistil length; STL: stamen length; CL: calyx length; NC: nectar concentration; NV: nectar volume.

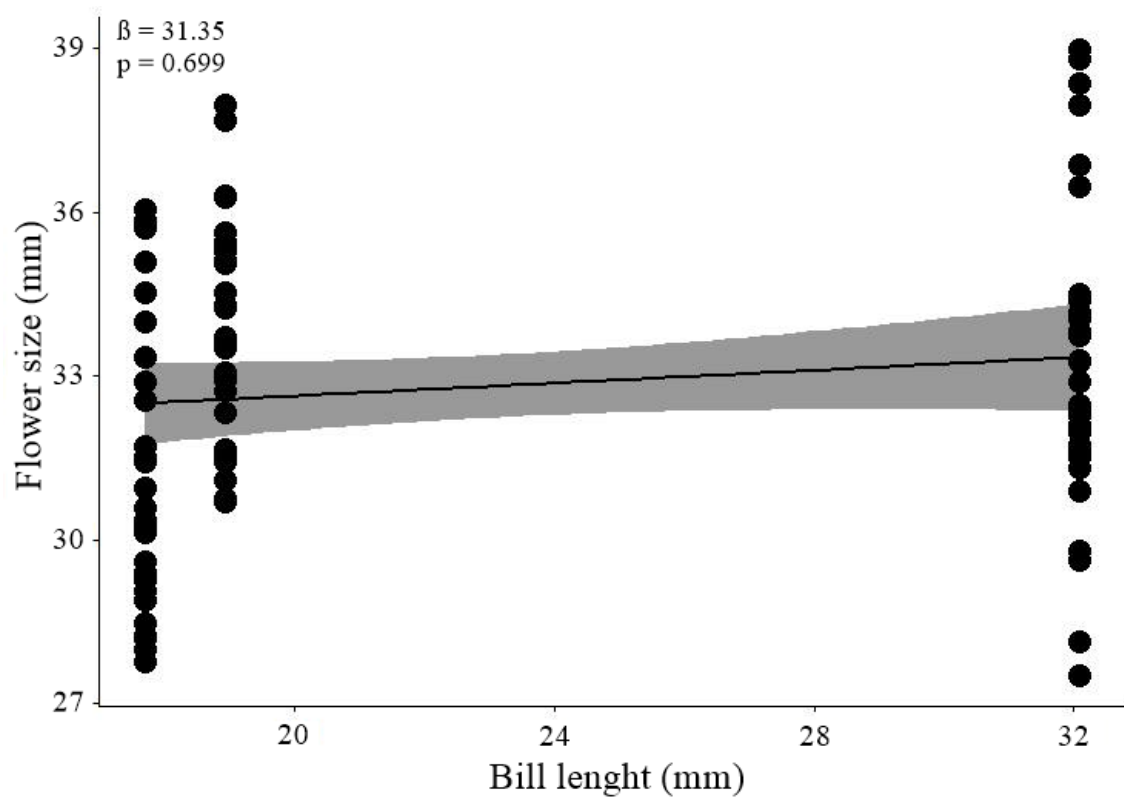


Figure 6. Association between flower size and bill size of the main pollinators of each study population of *B. pedicellata*, evaluated from the construction of a generalized mixed effect model (GLMM) ($\beta = 31.35$; $p=0.699$).

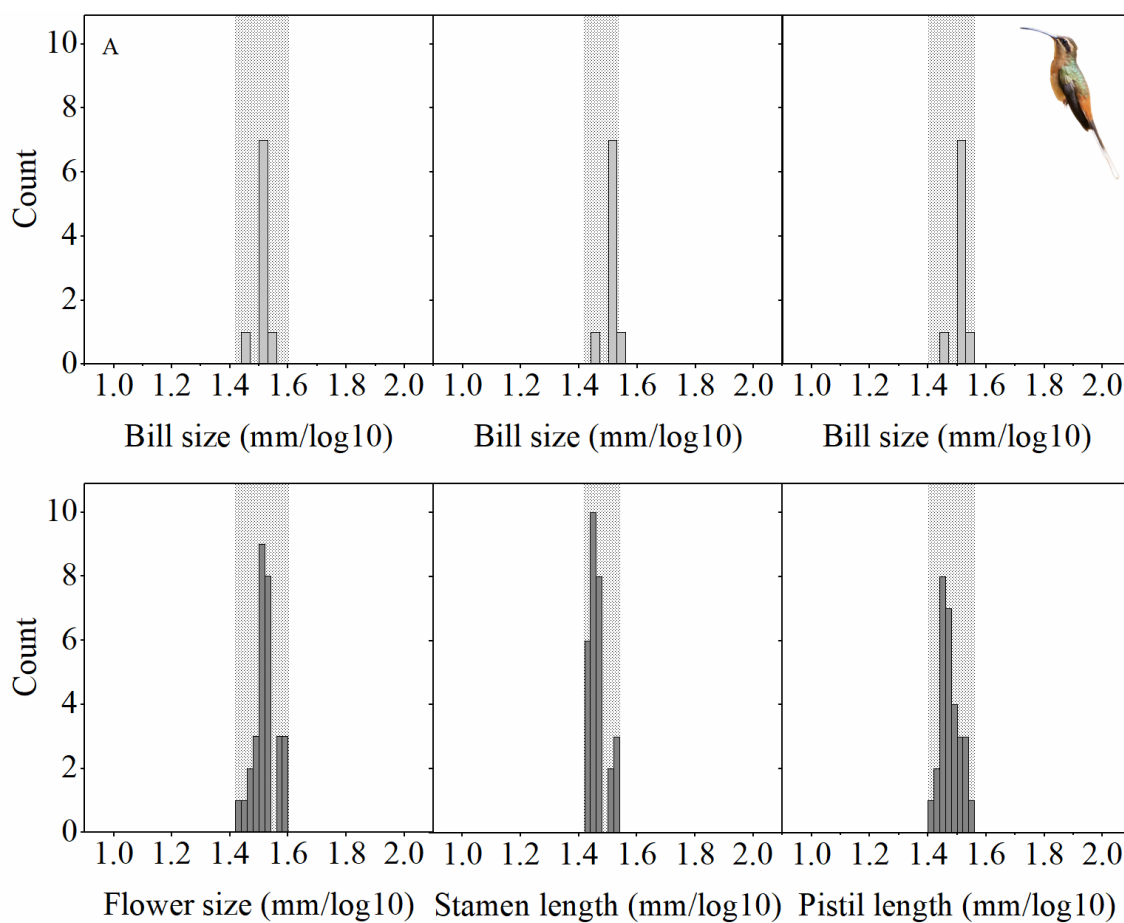


Figure 7. Histograms with the most frequent pollinator bill and floral trait sizes in the Crato population. The gray area shows the coupling between the frequency's distribution. A: *Phaethornis pretrei*.

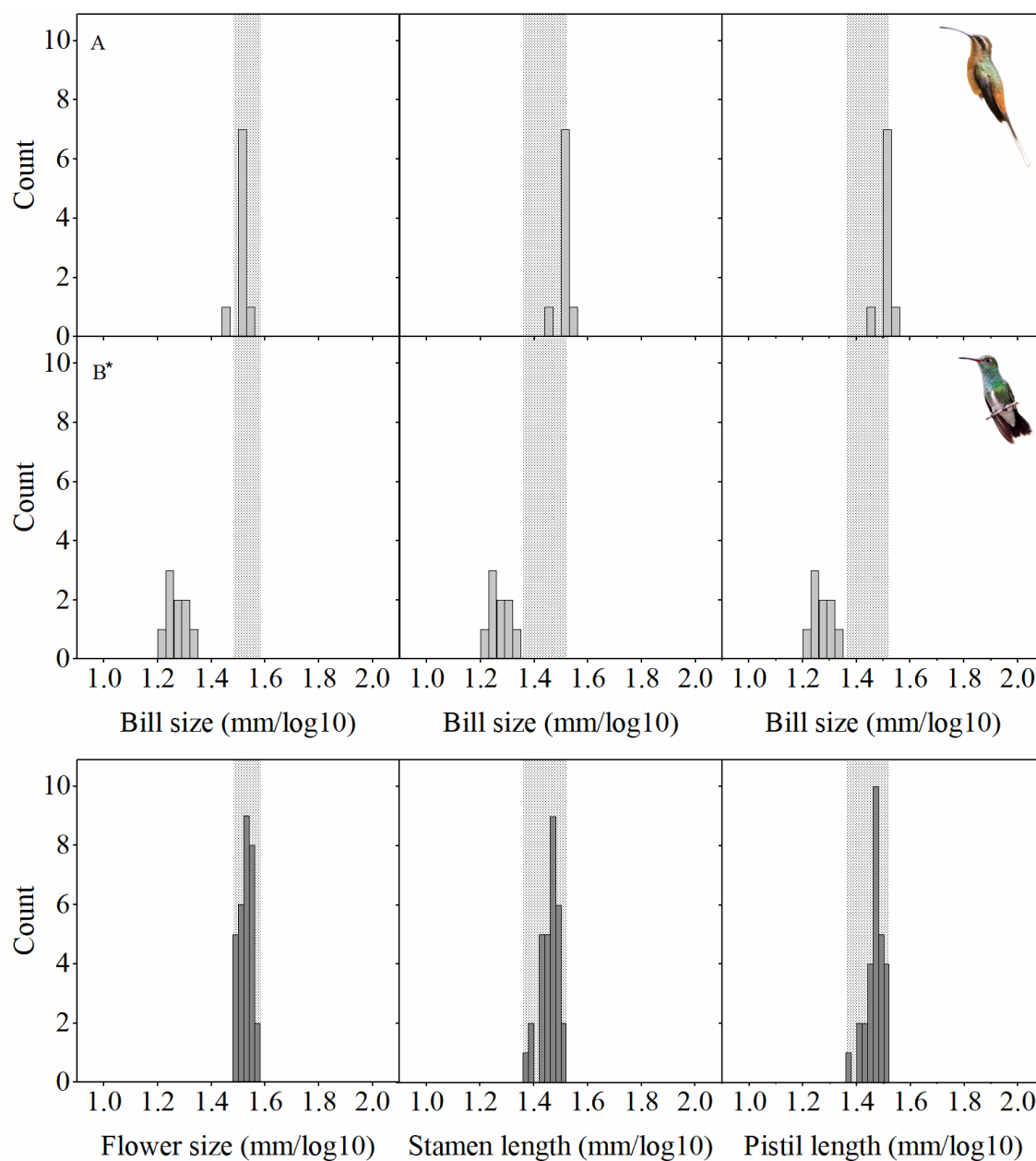


Figure 8. Histograms with the most frequent pollinators' bill and floral trait sizes in the Caetité population. The gray area shows the coupling between the frequency's distribution. A: *Phaethornis pretrei*; B: *Amazilia fimbriata*. The asterisk indicates the most frequent pollinator.

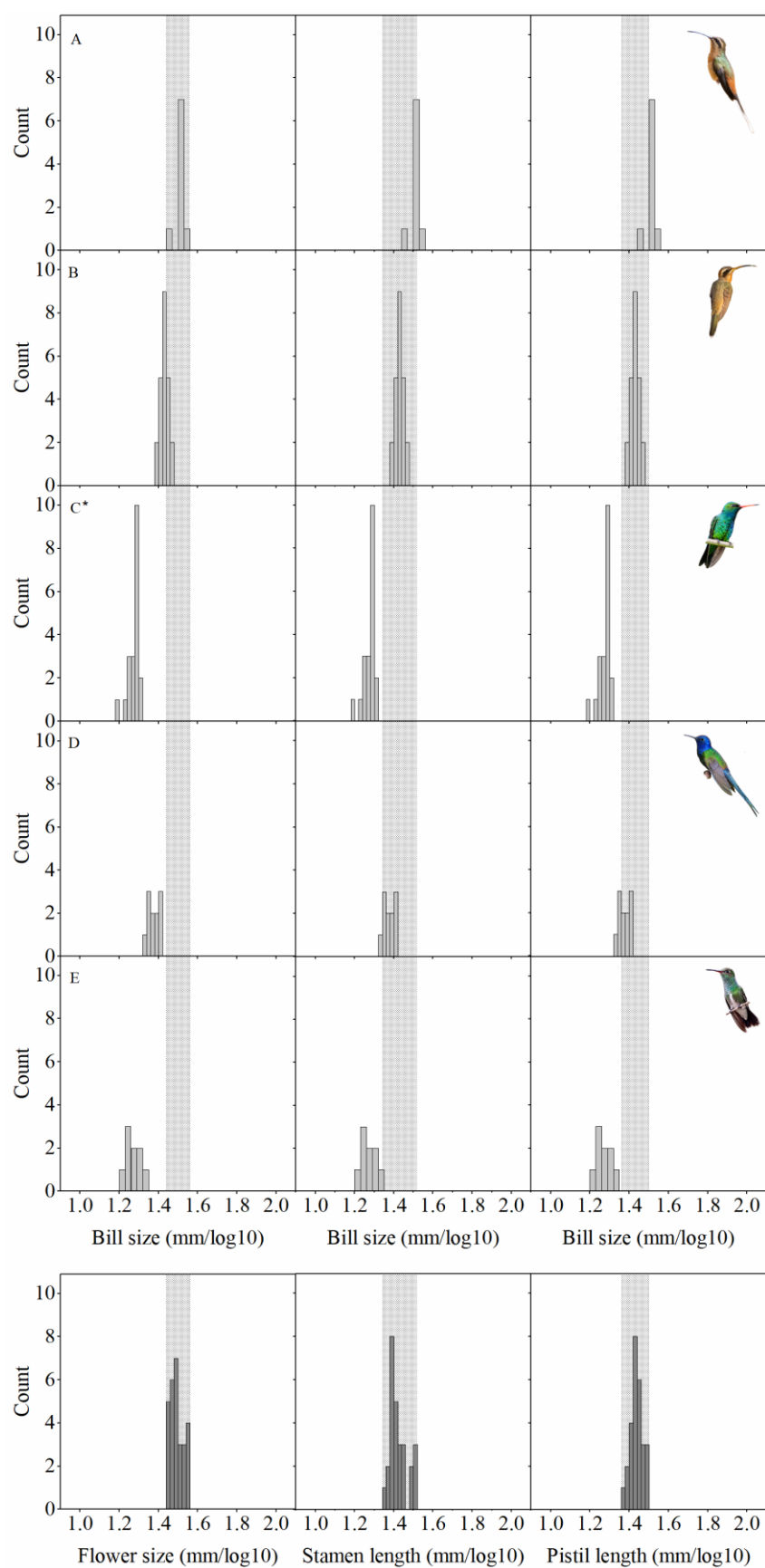


Figure 9. Histograms with the most frequent pollinators' bill and floral trait sizes of *B. pedicellata* in the Buíque population. The gray area shows the coupling between the frequency's distribution. A: *Phaethornis pretrei*; B: *Anopetia gounellei*; C: *Chlorostilbon lucidus*; D: *Eupetomena macroura*; E: *Amazilia fimbriata*. The asterisk indicates the most frequent pollinator.

4 CAPÍTULO II

(Manuscrito a ser enviado para o periódico **American Journal of Botany**)

Deriva genética e redução histórica de nicho efetivo em *Bionia pedicellata* (Fabaceae), uma espécie com dispersão limitada e endêmica da Caatinga

Camila M. Barbosa¹, Santelmo Vasconcelos², Ana M. Benko-Iseppon³, Stephani S. Santos³, Guilherme de Oliveira², Mariana C. Dias², Jefferson R. Maciel⁴, Isabel C. Machado¹, Diego S. Pinangé^{5*}

¹Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável, Rua Boaventura da Silva, 955, 66055-090, Belém, Pará, Brasil

³Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

⁴Jardim Botânico do Recife, Prefeitura da Cidade do Recife, 50791-540, Recife, Pernambuco, Brasil.

⁵Departamento de Genética, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gal. Rodrigo Otávio, 3000, Coroado, Mini-campus, Bloco E, 69067-005, Manaus, Amazonas, Brasil.

*Autor de correspondência: diegosotero@gmail.com

Manuscript received _____; revision accepted _____.

Cabeçalho: Perda de hábitat e conectividade populacional em *Bionia pedicellata*

RESUMO

PREMISSA DO ESTUDO: A perda de hábitat na Caatinga vem impactando espécies endêmicas, cenário esse que tende a se agravar com mudanças climáticas futuras, especialmente para aquelas que apresentam relações especializadas. Tal ocorrência associada ao processo de fragmentação pode levar à perda de alelos por deriva genética e a extinções locais. O trabalho objetivou analisar a distribuição de nicho efetivo e de linhagens genealógicas em *Bionia pedicellata* (Fabaceae), uma espécie endêmica da Caatinga.

MÉTODOS: Nove populações naturais foram amostradas abrangendo sua distribuição. O DNA das amostras foi extraído, amplificações heterólogas com marcadores plastidiais foram conduzidas. Os dados foram analisados através de abordagens de genética populacional calculando-se índices de diversidade e estruturação genética, análise de variância molecular e rede de haplótipos. Dados de georreferenciamento e bioclimáticos foram utilizados para performar a modelagem histórica e atual da distribuição de nicho efetivo.

PRINCIPAIS RESULTADOS: Foi observada maior variação genética interpopulacional, uma alta estruturação populacional com a presença de nove haplótipos dentro das populações. Os valores de diversidade haplotípica e genética foram baixos. Encontramos dois haplótipos antigos e centrais, sendo um deles encontrado em oito das nove populações, incluindo Rio de Contas que apresentou uma diversidade genética alta, frente a outros mais recentes. A modelagem de distribuição de nicho mostrou uma significativa redução histórica de nicho efetivo.

CONCLUSÕES: A espécie vem sofrendo perda de hábitat ao longo do tempo, o que gerou consequências genéticas em suas linhagens genealógicas através de processo de deriva genética. Faz-se necessária a implementação de políticas conservacionistas para manter ou aumentar o nicho dessa espécie.

PALAVRAS-CHAVE: diversidade genética; perda de hábitat; ornitofilia; autocoria

INTRODUÇÃO

A Caatinga é um ecossistema exclusivamente brasileiro que vem sofrendo grandes pressões antrópicas, especialmente as do tipo crônicas, as quais levam a uma redução de suas áreas e perda de biodiversidade (Leal et al., 2005; Arnan et al., 2018). Espécies endêmicas desse ambiente sofrem ainda mais com essa perda de hábitat (Brooks et al., 2002, 2006; Dirnböck et al., 2011; Silva et al., 2019), uma vez que elas só ocorrem nesse ecossistema e apresentam características peculiares que as fazem adaptadas a esses ambientes. Para a manutenção dessas espécies e consequente fluxo gênico, é necessário que as relações ecológicas estejam sendo eficientes, especialmente a polinização e dispersão. A grande pressão antrópica que a Caatinga vem sofrendo pode gerar perda de serviços ecossistêmicos (Tabarelli et al., 2017), agindo nessas relações bióticas e causando erosão genética nas populações (Young et al., 1996).

Silva e colaboradores (2019) avaliaram a perda vegetacional da Caatinga com a modelagem de futuras mudanças climáticas, prevendo-se drásticas consequências sobre espécies endêmicas que apresentam relações ecológicas especializadas, como por exemplo, plantas com polinização cruzada obrigatória. A perda de habitat pode resultar em sérios efeitos sobre a diversidade genética das espécies, como no caso da deriva gênica (Young et al., 1996; Kliman et al., 2008; Gandara et al., 2019). Esse processo ocasiona perdas estocásticas de alelos e haplótipos dentro de populações naturais de espécies vegetais (Young et al., 1996), especialmente para aquelas que dependem de um vetor para realização de sua polinização ou que apresentam dispersão limitada (Segatto et al., 2014; Wanderley et al., 2017).

Trabalhos direcionados no intuito de avaliar a distribuição do nicho efetivo da espécie historicamente são essenciais para se entender como a perda de hábitat pode estar afetando a estrutura das populações (Brooks et al., 2002; Silvertown, 2004). A redução de nicho gera perda de haplótipos e pode afetar diretamente as relações ecológicas responsáveis pela manutenção da espécie no ecossistema, a estruturação populacional e a sua diversidade genética (Chevin et al., 2010; Wang e Bradburd., 2014; Tabarelli et al., 2017). Nesse intuito, é importante a utilização de marcadores moleculares que contem a história de como os processos de reprodução e dispersão da espécie, afetados pela fragmentação, podem influenciar nos níveis de diversidade genética das populações (Kliman et al., 2008; Gandara et al., 2019), especialmente em espécies endêmicas.

Bionia pedicellata (Benth) LP. Queiroz é um arbusto endêmico da Caatinga, pertencente à família Fabaceae. Ocorre em áreas de montanhas, estando sua ocorrência associada com

afloramentos rochosos de arenito/quartzito. Apresenta um sistema reprodutivo auto incompatível, sendo totalmente dependente de beija-flores para transferência de pólen, e dispersão do tipo autocórica explosiva (Demetrio, 2008; Queiroz, 2008; APG IV). Considera-se que espécies vegetais com tais características sejam mais sensíveis à redução de hábitat e a processos de extinção local (Chevin et al., 2010; Segatto et al., 2014; Silva et al., 2019).

Variações morfológicas previamente observadas em *B. pedicellata* (C.M. Barbosa; N.S.L. Albuquerque; L.E.N. Costa; D.S.B. Pinangé; I.C. Machado, dados não publicados) sugerem uma diferenciação populacional geográfica, o que pode ser avaliado a partir da caracterização de padrões populacionais em suas linhagens genéticas. Desse modo, o presente trabalho visou avaliar a distribuição histórica e atual, bem como a estruturação geográfica das populações de *B. pedicellata* através da utilização de modelagem de distribuição de nicho ecológico e análise de polimorfismos em marcadores plastidiais.

Nossas hipóteses *a priori* consideraram que: (1) houve uma redução de nicho efetivo da espécie ocasionada pela perda de habitat na Caatinga em consequência da frequente ação antrópica; (2) as populações de *B. pedicellata* apresentam alta estruturação populacional em decorrência da fragmentação citada; (3) a dispersão autocórica tem um papel maior do que o fluxo polínico na estruturação e isolamento das populações da espécie; (4) há uma relação entre distância genética e distância geográfica nas populações de *B. pedicellata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem das populações e extração do DNA

As populações foram amostradas entre junho e setembro de 2017 de acordo com dados de coleta publicados no *speciesLink* e em herbários. Ao todo, foram coletadas nove populações naturais de *B. pedicellata* cobrindo toda a área de ocorrência da espécie no ecossistema Caatinga, no Nordeste do Brasil (Fig. 1). Em cada população, foram coletadas folhas de 20 indivíduos que foram armazenadas em solução aquosa de cloreto de sódio saturada contendo 20 g/L de brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB), conforme sugerido por Rogstad (1992). O DNA foi extraído e isolado com o protocolo CTAB 2%, de acordo com Doyle e Doyle (1987) com modificações nos volumes dos reagentes para extração do tipo *mini-prep*.

Amplificação heteróloga de marcadores microssatélite e genotipagem

Foram testados 51 marcadores microssatélites, sendo 10 loci plastidiais desenvolvidos para angiospermas (Weising e Gardner, 1999), seis loci nucleares desenvolvidos para Fabaceae (grupo de pesquisa Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal - UFPE) e três loci nucleares desenhados para *Caesalpinia echinata* Lam. (Lira et al., 2003). Além disso, testamos os seguintes loci nucleares: 10 originalmente desenhados para *Vigna unguiculata* (L.) Walp e 12 para regiões codificantes de esnaquina desenhadas para *Glicine max* (L.) Merr. (grupo de pesquisa Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal – UFPE). Por fim, foram escolhidos para testes de amplificação heteróloga, 10 loci desenvolvidos para *Canavalia cathartica* Thouars e *C. lineata* (Thunb.) DC. (Yamashiro et al., 2013). Tal estratégia baseou-se na disponibilidade de regiões de microssatélites das linhagens mais próximas do gênero *Bionia* na filogenia de Fabaceae (LPWG, 2017).

Inicialmente, para o teste de amplificação, realizamos um teste-piloto avaliando um subconjunto de oito indivíduos de diferentes populações. Os loci foram amplificados usando o termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) através de protocolo para PCR modificado de Schuelke (2000) com 10 µl de volume total, contendo: ~10 ng DNA modelo, 1× PCR Buffer contendo MgCl₂, 0.0312 U/µl de *Taq* DNA polimerase (Sigma-Aldrich®), 0.25 mM de dNTP, 0.5 µM primer *reverse*, 0.125 µM primer *forward*, 0.5 µM primer M13 marcado com fluorocromos (NED, FAM, VIC, PET). O primer *forward* foi previamente ligado no fim da extremidade 3' com a cauda M13 contendo 19 pares de base (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') permitindo a marcação com o primer M13 fluorescente para posterior genotipagem (Schuelke, 2000).

As reações foram submetidas à termociclagem com a seguinte programação, conforme sugerido por Schuelke (2000): desnaturação inicial a 94°C por 5 min, anelamento do primer F-M13 consistindo de 30 ciclos de 94°C por 30 s, temperatura de anelamento do primer por 45 s, 72 °C por 45 s, anelamento do adaptador M13 marcado com fluorocromos com oito ciclos de 94 °C por 30 s, 53 °C (temperatura de anelamento do adaptador-M13) por 45 s, 72 °C por 45 s e extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos da PCR submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% usando-se um 100 bp DNA *ladder* como referência para avaliação do peso molecular. Após o teste-piloto, repetimos o mesmo protocolo para todos os indivíduos de todas as populações, incluindo a análise de polimorfismos após a separação por eletroforese.

Os primers que amplificaram e geraram polimorfismos foram usados na amplificação de todo o universo amostral, sendo os amplicons genotipados através do sequenciador automático 3730 *Genetic Analyzer automated sequencer* (Applied Biosystems) com padrão GeneScan 600 LIZ™ dye size standard (Applied Biosystems). Os dados de genotipagem provenientes do sequenciador foram analisados utilizando o programa GeneMarker® (Soft Genetics), sendo os tamanhos dos fragmentos avaliados para cada indivíduo e conferidos manualmente.

Amplificação e sequenciamento de marcadores de sequência

Foram realizados testes de amplificação dos marcadores *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *rpl32-trnL*, *trnLP6*, *trnH-psbA*, *trnV-ndhC*, *rps16-trnQ*, KIM, *matK*, ITS 2- ITS 3 e ITS4-ITS5, todos com uma amostra-piloto de oito indivíduos de diferentes populações. A amplificação via PCR ocorreu de acordo com Vasconcelos et al. (2018), com 25 µl de volume final contendo: ~10 ng DNA amostra, 1X PCR Buffer, 3 mM de MgCl₂, 0.2 µM de dNTP, 0.1 µM de cada primer (*forward* e *reverse*) e 1.25 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™). A programação do termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) também seguiu o determinado por Vasconcelos et al. (2018). Após a realização das reações de PCR os fragmentos foram separados através de eletroforese em gel de agarose a 2%.

Posteriormente foi realizada a purificação dos produtos da PCR, sendo que 2 µl do DNA amplificado foi subsequentemente utilizado para a realização de reações de ciclo bidirecional com o kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) seguindo as instruções determinadas pelo fabricante. As reações foram levadas para o sequenciador 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências foram submetidas a um alinhamento local (BLASTn) tendo o GenBank (no National Center for Biotechnology Information - NCBI) como busca de referência de nucleotídeos (Altschul et al., 1990). Posteriormente, as sequências foram avaliadas quanto à qualidade através do programa CHROMAS® 2.6.6 (Technelysium Pty) e analisadas para a montagem dos *contigs*, para posterior alinhamento múltiplo utilizando o algoritmo MAFFT (Kato et al., 2002) implementado no software GENEIOUS® 10.1.3 (Kearse et al., 2012).

Análise dos dados

No que diz respeito aos dados de marcadores plastidiais, as análises descritivas populacionais foram feitas utilizando o HAPLOTYPE ANALYSIS[®] (Eliades e Eliades, 2009). As populações foram caracterizadas pela diversidade plastidial usando o número de haplótipos. A diversidade genética também foi estimada nessa análise através do cálculo dos índices de riqueza e diversidade haplotípica, distância genética entre os indivíduos e entre as populações, F_{ST} pareado e NEI-GD. Uma *Median-Joining Network* foi construída baseada nos loci plastidiais utilizando o programa NETWORK[®] 5.0.1.1 (Bandelt et al., 1999, <http://www.fluxus-engineering.com>), de acordo com o protocolo determinado por Lexer e colaboradores (2005).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada no programa ARLEQUIN 3.5.2.2 (Excoffier et al., 2005) no intuito de acessar padrões de diferenciação do DNA plastidial dentro e entre as populações. Foi montada uma matriz de distância geográfica entre as populações estudadas e o teste de Mantel foi realizado para testar a hipótese de isolamento por distância no programa GENEPOP 1.2 (Raymond e Rousset, 1995).

Modelagem de distribuição de nicho efetivo

Os pontos de ocorrência da espécie foram levantados *in loco*, por georreferenciamento e através de fontes de dados já disponíveis (GBIF, speciesLink). Foram adicionadas ao modelo variáveis bioclimáticas previamente selecionadas a partir de uma análise de correlação baseada em uma análise de componentes principais – PCA. Essas variáveis foram derivadas de valores de precipitação e temperatura disponíveis na base de dados do WorldClim, sendo selecionadas as camadas bio1, 3, 7, 12, 15, 17 e 18. As análises foram realizadas utilizando *R statistical environment* (R Core Team 2014) e o algoritmo utilizado foi o Maxent (Phillips et al., 2006), utilizando taxa de omissão de 5% e a técnica “*cross-validation*” para avaliar a precisão do modelo gerado. Posteriormente, foi feito um teste binomial uni-caudal para testar se o modelo prediz os pontos melhor que o acaso (Phillips et al., 2006).

RESULTADOS

De todos os marcadores microssatélites testados, somente sete microssatélites “ccmp” (Weising e Gardner, 1999) apresentaram produtos de amplificação de tamanho esperado. No entanto, somente quatro loci foram mantidos após aplicação da estratégia de genotipagem descrita, os quais apresentaram amplicons com o tamanho esperado para a maioria dos

indivíduos, assim como níveis de polimorfismos significativos. Indivíduos que não apresentaram o tamanho esperado na genotipagem foram excluídos da análise, totalizando 157 indivíduos coletados e analisados. Todos os loci foram polimórficos para *B. pedicellata*. A caracterização de cada população está demonstrada na Tabela 1.

Dos primers testados para análise de sequência, somente o ITS4-5 apresentou polimorfismo, entretanto incipiente, uma vez que apenas um sítio heterozigoto foi evidenciado com indivíduos apresentando transversões entre as bases G e T. Foram sequenciados 156 indivíduos no total com tamanho das sequências de até 617 pb. Em algumas posições, o *base calling* mostrou dubiedade de bases em consequência de artefatos de sequenciamento. Portanto, esse único sítio não foi informativo a nível nuclear e, por isso, incluímos os polimorfismos de ITS nas análises de haplótipos. Entretanto, essa inclusão não gerou informatividade significativa sendo, portanto, excluída completamente das análises.

A análise combinada dos dados plastidiais revelou nove haplótipos dentro das populações de *B. pedicellata*, com a quantidade de haplótipos variando entre um e quatro (Fig. 2). As populações com maior quantidade de haplótipos foram Rio de Contas e Caetité com quatro haplótipos cada, destacando-se Mucugê como a população com o menor número de haplótipos (Tabela 1). Três populações apresentaram haplótipos privados: Custódia, Caetité e Licínio de Almeida. A riqueza haplotípica variou de zero, com fixação de um único haplótipo na população de Mucugê, a 2.6 em Morro do Chapéu, sendo H2 o haplótipo mais frequente (Fig. 2). Os valores de diversidade genética (H_e) variaram de zero na população de Mucugê até 0.647 na população de Rio de Contas e a média da distância genética entre os indivíduos foi maior em Caetité (ver Tabela 2).

As análises interpopulacionais mostraram uma maior distância genética (0.923 de NEI-GD) entre a população do Crato e a de Caetité, seguido de Mucugê e Licínio de Almeida (0.841). Por outro lado, os menores valores de NEI-GD foram entre as populações de Piatã e Crato (0.002), distantes a mais 700 km entre si (Figs. 1 e 2), e Morro do Chapéu e Mucugê com valor de 0.003. Os valores normalizados de F_{ST} pareados variaram de 0.001 (Piatã vs Crato, Piatã vs Buíque e Morro do Chapéu vs Mucugê) a 0.166 entre as populações de Caetité e Mucugê (Tabela 3). Não houve relação entre a distância genética e distância geográfica ($R^2 = 0.13$; $p = 0.87$; Fig. 3).

A análise de variância molecular entre as populações (Tabela 4) mostrou que há uma maior porcentagem de variação entre as populações (55%) do que em nível intrapopulacional

(45%). O valor de F_{ST} geral, comparando todas as populações em conjunto, foi alto com um índice de fixação de 0.55. A frequência de haplótipos variou dentro das populações, mas é possível observar dois haplótipos mais frequentes (Fig. 2A) e a construção da rede mostrou que esses haplótipos estão bastante interligados com o H2 sendo o haplótipos central (Fig. 2B).

Os resultados da modelagem de distribuição de nicho mostraram um cenário de mudança na representação espacial do nicho fundamental de *B. pedicellata*. É possível observar uma clara redução espacial do nicho efetivo do período glacial para o Holoceno médio e um drástico declínio do médio Holoceno para a distribuição atual (Fig. 4).

DISCUSSÃO

A abordagem utilizada nesse trabalho combinando dados de história natural, genética de populações e modelagem de distribuição de nicho nos permitiu acessar dados filogeográficos e de conectividade histórica de uma espécie endêmica de um ecossistema diverso e único como a Caatinga. Embora não tenhamos conseguido polimorfismos nucleares para avaliar o fluxo polínico histórico, os outros resultados nos permitem contar a história evolutiva da espécie do ponto de vista da dispersão de sementes. Desse modo, corroboramos as hipóteses de redução de nicho efetivo e da estruturação populacional na espécie nos deixando inferir processos adaptativos em *B. pedicellata*.

A alta estruturação populacional devido ao alto valor de F_{ST} em conjunto com os baixos valores de diversidade haplotípica encontrados nas populações sugerem uma expansão demográfica recente ocorrida após um efeito gargalo prolongado ou severo (Worth et al., 2011). Esses dados em conjunto com o fato de não haver isolamento por distância indicam que a diferenciação populacional pode ser consequência de uma dispersão local de sementes com consequente deriva genética (Levy e Neal, 1999). Esses achados vão ao encontro do padrão de dispersão de sementes da espécie, corroborando com sua história natural, que é do tipo autocórica com deiscência explosiva (Demetrio, 2008) e confirmam a existência de nicho reduzido predita pela análise de modelagem de distribuição.

Apesar de encontrarmos uma diferenciação entre as populações maior do que dentro das populações, a distância não explicou o isolamento, o que é congruente com os dados de F_{ST} pareados, já que populações distantes, como Crato e Piatã por exemplo, apresentaram maiores semelhanças genéticas do que populações mais próximas como Mucugê e Licínio de Almeida.

Isso sugere que a variação que estamos observando pode estar ligada a um isolamento pelo ambiente em que as populações ocorrem, pelas interações bióticas ou mesmo pela heterogeneidade espacial, como solo, temperatura e pluviosidade (Wang e Bradburd, 2014).

Os índices de diversidade genética intrapopulacionais mostraram uma alta variação entre os indivíduos das populações de Rio de Contas, Caetité e Licínio de Almeida. Como contraste, nenhuma variação foi detectada na população de Mucugê, a qual apresentou a fixação de apenas um haplótipo (Fig. 2A). Tal cenário pode refletir um padrão relacionado à disponibilidade de nicho efetivo nas regiões de ocorrência dessas populações, como podemos observar nos mapas (Figs. 1 e 4).

No geral, os dados sugerem a ocorrência de um *bottleneck* e consequente perda de haplótipos por deriva genética nas populações; entretanto, a população de Rio de Contas apresentou um alto índice de diversidade ainda resiliente, com o maior número de haplótipos juntamente com Caetité. Esforços para conservação de linhagens genealógicas de *B. pedicellata* devem considerar essa diversidade presentes nessas duas populações específicas. Além disso, Mucugê apresentou apenas um haplótipo (H2), que foi o mais frequente e central, fazendo com que essa população nos conte uma história mais antiga das linhagens da espécie (Fig. 2B).

A redução de nicho efetivo mostrada pela modelagem pode ter alterado bastante as linhagens genéticas da espécie fazendo com que os haplótipos ainda sejam bem interligados, ao lado de haplótipos mais derivados e menos frequentes nas populações como mostrado na rede de haplótipos (Fig. 2B). Essa drástica redução também pode ser crucial para a conservação da espécie, uma vez que o nicho efetivo está restrito a poucas localidades na Caatinga. Tal distribuição também pode ter levado a uma estruturação local das populações, devido à perda de habitat que pode gerar esse tipo de consequência nas linhagens genéticas (Young et al., 1996; Deng et al., 2020). Dessa forma, com populações se isolando, a divergência entre elas, tanto genética como observamos aqui, como fenotípica, que foi observada em traços florais de *B. pedicellata* (C.M. Barbosa; N.S.L. Albuquerque; L.E.N. Costa; D.S.B. Pinangé; I.C. Machado, dados não publicados), tende a aumentar em decorrência de fatores ambientais (Wanderley et al., 2017) resultando em perda alélica por deriva genética (Levy e Neal, 1999; Gandara et al., 2019).

Mesmo não havendo isolamento por distância, a rede de haplótipos nos permite observar dois haplótipos mais frequentes e centrais: H2 e H6. A população de Mucugê é formada exclusivamente por H2, o que pode sugerir que houve uma redução de haplótipos por deriva

genética nessa população. Também é possível observar que H6 prevalece nas três populações mais ao sul da distribuição geográfica de *B. pedicellata* (Fig. 2A). Adicionalmente, a rede de haplótipos evidenciou que não há uma separação norte-sul entre os haplótipos das populações amostradas, uma vez que observamos um efeito estrela na rede, com haplótipos bem interligados, o que sugere que pode estar ocorrendo o início de uma expansão, mesmo que local, nessas populações (Su et al., 2004; Huang et al., 2008).

Os dados de microssatélites plastidiais nos permitem inferir padrões relacionados ao fluxo gênico ligado à dispersão de sementes. O tipo de dispersão de *B. pedicellata* faz com que os novos indivíduos cresçam próximos aos indivíduos parentais e isso fica bem claro com a quantidade e distribuição de haplótipos nas populações amostradas. Esse padrão de dispersão contribui para uma significativa estruturação populacional, representada pelo alto valor de F_{ST} ($=0.55$) e pelo valor da AMOVA ($=55\%$ variação interpopulacional) (Lorenz-Lemke et al., 2006). A redução de nicho efetivo, a herança materna, com todos os loci interligados, e o tipo de dispersão autocórica podem explicar os padrões de estruturação de *B. pedicellata* em populações isoladas (Segatto et al., 2014).

Apesar de não termos conseguido dados de marcadores nucleares, o que se espera para espécies polinizadas por beija-flores é que o fluxo polínico tenha uma influência maior na estruturação genética dessas populações do que a dispersão de sementes, como observado em diversos trabalhos (Palma-Silva et al., 2009; Segatto et al., 2014; Gonçalves-Oliveira et al., 2017; Pinangé et al., 2019), uma vez que o beija-flor é capaz de alcançar longas distâncias permitindo reprodução cruzada e consequente aumento da diversidade genética.

A formação das Florestas Secas, como no caso da Caatinga, por vicariância proposta por Prado e Gibbs (1993) e suportada por Pennington et al. (2000) sugere um processo de fragmentação no período interglacial. Em um trabalho sobre biogeografia de Leguminosae na Caatinga, Queiroz (2006) encontrou sete centros de endemismo e, dentro deles, dois grupos florísticos, sendo um deles formado por espécies que ocorrem em superfícies sedimentares disjuntas e arenosas. Esse grupo florístico está presente nos afloramentos rochosos da Caatinga, onde *B. pedicellata* ocorre e, segundo Guedes e colaboradores (2014), apresentam uma alta rotatividade de espécies, com a topografia desempenhando papel no processo de vicariância, sendo considerados refúgios (Apgaua et al., 2014). Dessa forma, esses locais acabaram se tornando ilhas, o que facilitou o processo de deriva genética observado para espécie foco desse estudo.

O processo de fragmentação da Caatinga já é documentado mesmo antes da existência de pressão antrópica (Carnaval, 2002), o que provavelmente gerou perda de hábitat para diversas espécies, incluindo *B. pedicellata*. Esse processo vem sendo acelerado com a perturbação causada pelo homem, sendo relatada uma perda vegetacional de mais de 30% na Caatinga (Castelletti et al., 2004; Leal et al., 2005). Entretanto, essa fragmentação ainda tem sido relativamente homogênea (Guedes et al., 2014), o que permite que ainda haja espaço para preservação e implementação de áreas protegidas, que precisa ser implementado através da proteção da biodiversidade dessa floresta, com a criação de áreas de conservação integrais (Leal et al., 2005; Camardelli e Napoli, 2012; Guedes et al., 2014).

CONCLUSÕES

Sugerimos que sejam feitos estudos de biologia reprodutiva com indivíduos de populações mais distantes para testar um possível isolamento em *B. pedicellata*. Adicionalmente, o desenvolvimento de marcadores nucleares específicos tem potencial para auxiliar na avaliação da contribuição da polinização comparativamente ao papel da dispersão de sementes, descrito nesse trabalho. Também seria interessante direcionar estudos de genética de paisagem de modo a trazer respostas sobre como a estruturação genética aqui observada pode estar relacionada a um isolamento pelo ambiente. Além disso, são necessárias políticas de conservação que visem à manutenção e/ou aumento do nicho efetivo da espécie dentro de um ecossistema tão diverso como a Caatinga, especialmente quando estamos diante de um cenário futuro de maior redução dessas áreas para espécies endêmicas que apresentam especialização nas suas estratégias reprodutivas (Silva et al., 2019). Isso se aplica ao caso de *B. pedicellata*, e criações de áreas de conservação devem ser direcionadas especialmente para as localidades que apresentam haplótipos mais antigos e aquelas com altos índices de diversidade genética.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável (ITV-DS), Belém, Pará e ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV), Universidade Federal de Pernambuco pela estrutura fornecida para a realização das atividades de laboratório. Agradecemos ao Parque Municipal de Mucugê e o Projeto Sempre Viva pelo alojamento

fornecido durante as coletas de material biológico. A Rafael Louzada e Sinzinando Albuquerque pela ajuda com a coleta do material. Nós também agradecemos ao CNPq pela bolsa de pesquisa por produtividade cedida a ICM (número 311021/2014-0) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério de Educação do Brasil - Código Financeiro 001 por fornecer a bolsa de estudos à primeira autora.

LITERATURA CITADA

- Apgaua, D. M. G., R. M. dos Santos, D. G. S. Pereira, G. C. O. Menino, G. G. Pires, M. A. L. Fontes, D. Y. P. Tng. 2014. Beta-diversity in seasonally dry tropical forests (SDTF) in the Caatinga Biogeographic Domain, Brazil, and its implications for conservation. *Biodiversity and Conservation* 23: 217-232.
- Arnan, X., I. R. Leal, M. Tabarelli, J. F. Andrade, M. F. Barros, T. Câmara, D. Jamelli, et al. 2018. A framework for deriving measures of chronic anthropogenic disturbance: Surrogate, direct, single and multi-metric indices in Brazilian Caatinga. *Ecological Indicators* 94: 274-282.
- Bandelt, H. J., P. Forster, A. Rohl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology Evolution* 16: 37-48.
- Brooks T. M., R. A. Mittermeier, G. A. B. da Fonseca, J. Gerlach, M. Hoffmann, J. F. Lamoreux, C. G. Mittermeier, et al. 2006. Global biodiversity conservation priorities. *Science* 313: 58-61.
- Brooks, T. M., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. B. da Fonseca, A. B. Rylands, W. R. Konstant, P. Flick, et al. 2002. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation Biology* 16: 909-923.
- Camardelli, M., and M. F. Napoli. 2012. Amphibian conservation in the Caatinga biome and semiarid region of Brazil. *Herpetologica* 68: 31-47.
- Carnaval, A. C. O. Q. 2002. Phylogeography of four frogs species in forest fragments of Northeastern Brazil – a preliminary study. *Integrative and Comparative Biology* 42: 913-921. Castelletti, C. H. M., J.M.C. da Silva, M. Tabarelli, A. M. M. Santos. 2004. Quanto

- ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. In J. M. C. da Silva, M. Tabarelli, M. T. Fonseca, L. V. Lins [eds.], Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação, 91–100. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Brazil.
- Chevin, L. M., R. Lande, G. M. Mace. 2010. Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PLoS Biology* 8(4): e1000357.
- Demetrio, K. M. 2008. Fenologia e biologia reprodutiva de duas espécies ornitófilas do Parque Nacional do Catimbau, Buíque/PE. PhD Dissertation, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
- Deng, J. Y. 2020. The genetic consequences of habitat specificity for fig trees in southern African fragmented forests. *Acta Oecologica* 102: 1-8.
- Dirnböck, T., F. Essl, W. Rabitsch. 2011. Disproportional risk for habitat loss of high-altitude endemic species under climate change. *Global Change Biology* 17: 990-996.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Eliades N. G., and D. G. Eliades. 2009. Haplotype Analysis: Software for analysis of haplotype data. Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August University Goettingen, Germany. Distributed by the authors.
- Excoffier, L., and 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 Resource* 10: 564-567.
- Gandara, F. B., P. R. Da-Silva, T. M. de Moura, F. B. Pereira, C. R. Gobatto, E. M. Ferraz, P. Y. Kageyama, E. V. Tambarussi. 2019. The effects of habitat loss on genetic diversity and population structure of *Cedrela fissilis* Vell. *Tropical Plant Biology* 12: 282-292.
- Gonçalves-Oliveira, R. C., T. Wöhrmann, A. M. Benko-Iseppon, F. Krapp, M. Alves, M. G. L. Wanderley, K. Weising. 2017. Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): evidence for cryptic speciation. *American Journal of Botany* 104(6): 868-878.

- Guedes, T. B., R. J. Sawaya, C. C. NOGUEIRA. 2014. Biogeography, vicariance and conservation of snakes of the neglected and endangered Caatinga region, north-eastern Brazil. *Journal of Biogeography* 41: 919-931.
- Huang, S. S. F., S. Y. Hwang, T. P. Lin. 2008. Spatial pattern of chloroplast DNA variation of *Cyclobalanopsis glauca* in Taiwan and East Asia. *Molecular Ecology* 11: 2349-2358.
- Katoh K., K. Misawa, K. Kuma, et al. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform, *Nucleic Acids Research* 30: 3059-3066.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper et al. 2012. Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649
- Kliman, R., B. Sheehy, J. Schultz. 2008 Genetic drift and effective population size. *Nature Education*, 1(3): 3.
- Leal, I. R., J. M. C. Silva, M. Tabarelli, T. E. Lacher. 2005. Changing the Course of Biodiversity Conservation in the Caatinga of Northeastern Brazil. *Conservation Biology* 19: 701-706.
- Levy, F., and C. L. NEAL. Spatial and temporal genetic structure in chloroplast and allozyme markers in *Phacelia dubia* implicate genetic drift. *Heredity* 82: 422-431.
- Lira, C. F., S. R. S. Cardoso, P. C. G. Ferreira, M. A. Cardoso, J. Provan. 2003. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Molecular Ecology* 12: 3219-3225.
- Lorenz-Lemke, A. P., P. D. Togni, G. Mäder, R. A. Kriedt, J. R. Stehmann, F. M. Salzano, S. L. Bonatto, L. B. Freitas. 2006. 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.
- LPWG. 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*, 66: 44-77.

- Palma-Silva, C., C. Lexer, G. M. Paggi, T. Barbará, F. Bered, M. H. Bodanese-Zanettini. 2009. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* 103: 508-512.
- Pennington, T. R., D. E. Prado, C. A. Pendry. 2000. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography* 27: 261–273.
- Phillips, S. J., R. P. Anderson, R. E. Schapire. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231-259.
- Pinangé, D. S. B., R. B. Louzada, T. Wöhrmann, F. Krapp, K. Weising, G. Zizka, E. M. Polo, et al. 2019. Population genetics shed light on species delimitation and life history of the *Dyckia pernambucana* complex (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* XX: 1-20.
- Prado, D. E., and 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.
- Queiroz, L. P. 2008. Re-establishment, synopsis and new combinations in the genus *Bionia* Mart. Ex. Benth. (Leguminosae: Papilionoideae). *Neodiversity* 3: 13-18.
- Queiroz, L. P. 2006. The Brazilian Caatinga: phytogeographical patterns inferred from distribution data of the Leguminosae. In R. T. Pennington, G. P. Lewis, G. P. Ratter [eds.], *Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography, and conservation*, 121–157, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Raymond, M., and F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Rogstad, S. H. 1992. Saturated NaCl-CTAB Solution as a Means of Field Preservation of Leaves for DNA Analyses. *Taxon* 41(4): 701-708.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- Segatto, A. L. A., A. L. R. Cazé, C. Turchetto, U. Klahre, C. Kuhlemeier, S. L. Bonatto, L. B. Freitas. 2014. Nuclear and plastid markers reveal the persistence of genetic identity: A new perspective on the evolutionary history of *Petunia exserta*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 70: 504-512.

- Silva, J. L. S., O. Cruz-Neto, C. A. Peres, M. Tabarelli, A. V. Lopes. 2019. Climate change will reduce suitable Caatinga dry forest habitat for endemic plants with disproportionate impacts on specialized reproductive strategies. *PLoS ONE* 14(5): e0217028.
- Silvertown, J. 2004. Plant coexistence and the niche. *TRENDS in Ecology and Evolution* 19(11): 605-611.
- Su, Y., T. Wang, B. Zheng, Y. Jiang, G. Chen, H. Gu. 2004. Population genetic structure and phylogeographical pattern of a relict tree fern, *Alsophila spinulosa* (Cyatheaceae), inferred from cpDNA atpB–rbcL intergenic spacers. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1459-1467.
- Tabarelli, M., I. R. Leal, F. R. Scarano, J. M. C. da Silva. 2017. The Future of the Caatinga. In Silva, J. M. C., I. R. Leal, M. Tabarelli [eds.] *Caatinga: The largest Tropical Dry Forest region in South America*, v. 1, 461-474, Springer International Publishing AG.
- Vasconcelos, S., M. L. Soares, C. M. Sakuragui, T. B. Croat, G. Oliveira, A. M. Benko-Iseppon. 2018. New insights on the phylogenetic relationships among the traditional *Philodendron* subgenera and the other groups of the *Homalomena* clade (Araceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 127: 168-178.
- Wanderley, A. M., I. C. S. Machado, E. M. Almeida, L. P. Félix, L. Galetto, A. M. Benko-Iseppon, V. L. Sork. 2017. The roles of geography and environment in divergence within and between two closely related plant species inhabiting an island-like habitat. *Journal of Biogeography* 1-13.
- Wang, I. J., and G. S. Bradburd. 2014. Isolation by environment. *Molecular Ecology* 23: 5649-5662.
- Weising, K., and R. C. Gardner. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.
- Worth, J. R. P., J. R. Marthick, G. J. Jordan, R. E. Vaillancourt. 2011 Low but structured chloroplast diversity in *Atherosperma moschatum* (Atherospermataceae) suggests bottlenecks in response to the Pleistocene glacials. *Annals of Botany* 108: 1247-1256.

- Yamashiro, A., T. Yamashiro, Y. Tateishi. 2013. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Canavalia cathartica* and *C. lineata* (Fabaceae). *Applications in Plant Sciences* 1(1): 1200111.
- Young, A., T. Boyle, T. Brown. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Tree* 11(10): 413-418.

TABELA 1. Caracterização das populações de *B. pedicellata* coletadas entre junho e setembro de 2017 no nordeste do Brasil.

Populações	Código	Localização	Latitude	Longitude	Elevação	N coletado/ N analisado
Crato	CR	Ceará	-39.5842819	-7.1598107	426m	20/15
Buíque	BU	Pernambuco	-37.4165714	-8.6866492	814m	20/12
Licínio de Almeida	CT	Bahia	-42.546944	-14.655833	860m	20/20
Rio de Contas	MC	Bahia	-41.804873	-13.586803	1046m	20/18
Mucugê	MU	Bahia	-41.588401	-13.126202	1102m	20/20
Piatã	PI	Bahia	-41.749299	-13.228555	1046m	20/20
Caetité	CA	Bahia	-42.504133	-14.131659	1011m	20/18
Morro do Chapéu	RC	Bahia	-41.7432106	- 11.4019534	1011m	20/19
Custódia	LA	Pernambuco	-37.9828646	-8.1467704	542m	20/15

TABELA 2. Índices de diversidade genética intrapopulacional com base na análise de quatro loci de microssatélites plastidiais. Ne: número efetivo de haplótipos; H_{pr}: número de haplótipos privados; Rh: riqueza haplotípica; H_e: diversidade genética; D²_{sh}: distância genética média entre indivíduos

Populações	Haplótipos	N_e	H_{pr}	R_h	H_e	D²_{sh}
CR	H1, H2	1.142	0	0.800	0.133	0.033
BU	H1, H2, H6	1.412	0	2.000	0.318	0.091
CT	H2, H3	1.504	1	1.551	0.343	0.151
MC	H2, H8	2.571	0	2.637	0.105	0.255
MU	H2	1.000	0	0.000	0.000	0.000
PI	H1, H2, H6	1.227	0	1.200	0.195	0.053
CA	H4, H5, H6, H7	1.604	2	2.235	0.399	0.871
RC	H2, H5, H6, H8	1.111	0	0.632	0.647	0.105
LA	H2, H6, H9	1.471	1	0.998	0.353	0.086
Média	-	1.449	0.444	1.339	0.277	0.183

TABELA 3. Valores de F_{ST} com base em quatro loci ccnp para todas as populações de *B. pedicellata*.

F_{ST} pairwise	Crato	Buíque	Licínio de Almeida	Rio de Contas	Mucugê	Piatã	Caetité	Morro do Chapéu
Buíque	0.002							
Licínio de Almeida	0.131	0.092						
Rio de Contas	0.077	0.052	0.007					
Mucugê	0.002	0.007	0.157	0.094				
Piatã	0.001	0.001	0.113	0.066	0.003			
Caetité	0.140	0.101	0.003	0.009	0.166	0.123		
Morro do Chapéu	0.001	0.004	0.136	0.079	0.001	0.002	0.145	
Custódia	0.008	0.006	0.098	0.057	0.012	0.007	0.106	0.009

TABLE 4. Análise de Variância Molecular (AMOVA) de populações de *B. pedicellata* com base na análise de quatro loci plastidiais.

Fonte de variação	g.l.	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Percentual de variação	Valor de p
Entre populações	8	25.8	0.17709 Va	55.00	p < 0.0001
Dentro de populações	148	21.442	0.14488 Vb	45.00	p < 0.0001
Total	156	47.242	0.32197		
Índice de fixação		Fst:	0.55002		

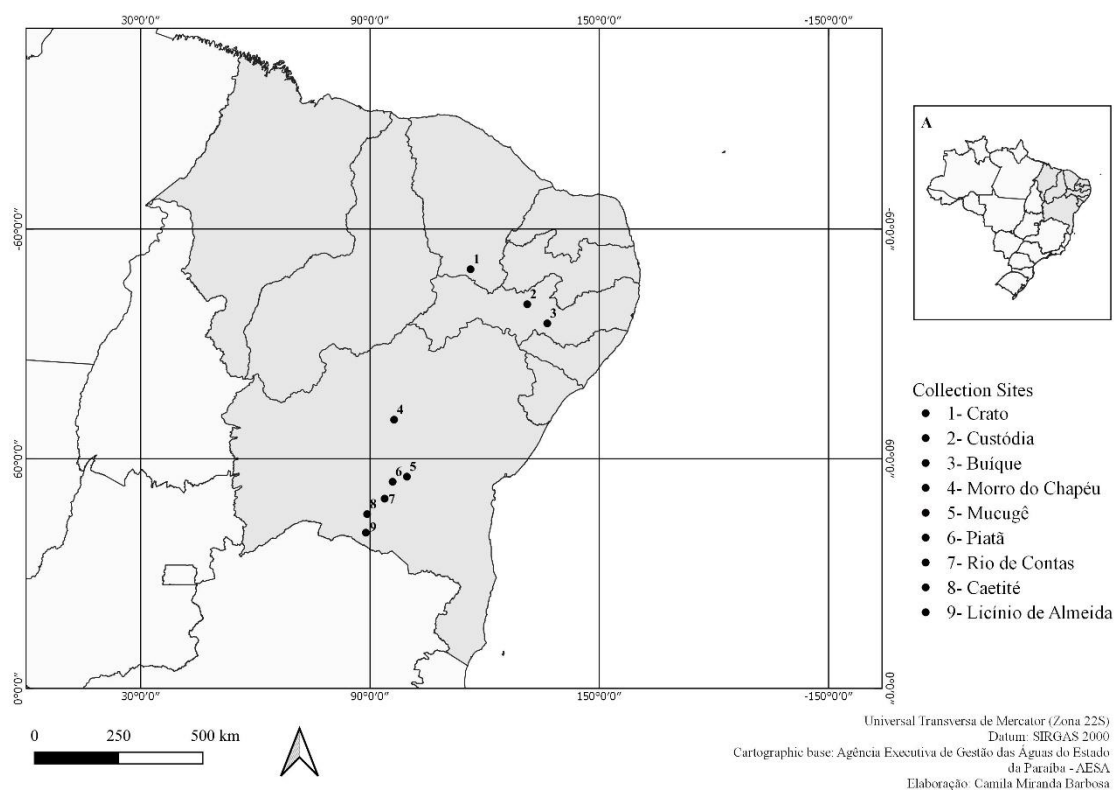


FIGURE 1 Mapa de localização dos locais de estudo das populações de *B. pedicellata* de junho a setembro de 2017.

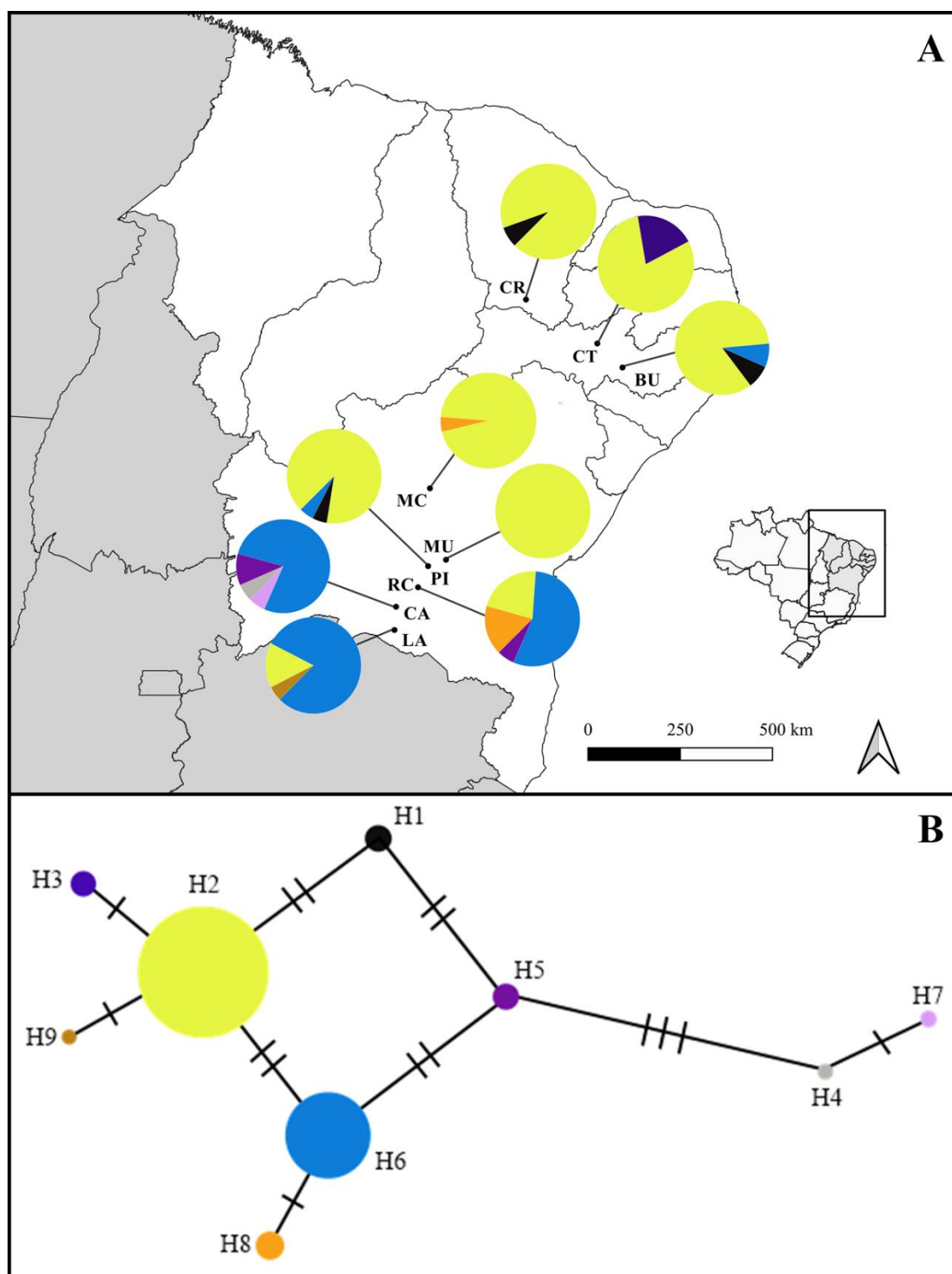


FIGURE 2 A: Mapa com a distribuição dos haplótipos e suas frequências encontradas em cada população de *B. pedicellata* a partir da análise de loci plastidiais. Os gráficos de pizza mostram a porcentagem de cada haplótipo encontrado em cada população. B: Rede de haplótipos construída a partir da análise *Median-joining* dos loci plastidiais das populações de *B. pedicellata*. Os tamanhos dos círculos são proporcionais às suas frequências, as cores indicam os diferentes haplótipos, as linhas as relações entre os haplótipos e cada traço nelas representam um passo mutacional. Veja a Tabela 1 para abreviações.

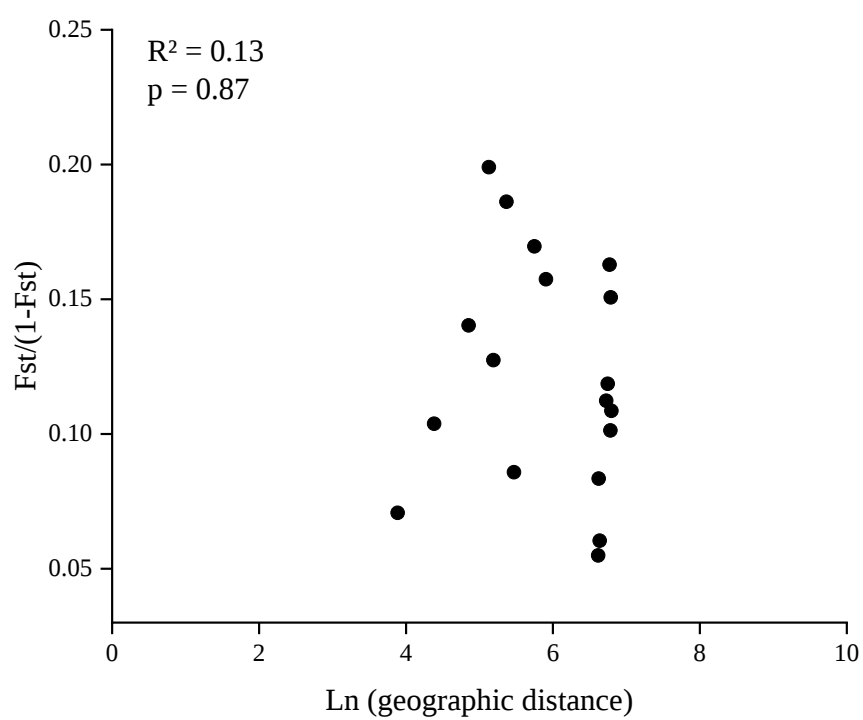


FIGURE 3 Correlação entre distância genética e distância geográfica a partir do teste de Mantel realizada da análise interpopulacional de quatro loci plastidiais de *B. pedicellata*.

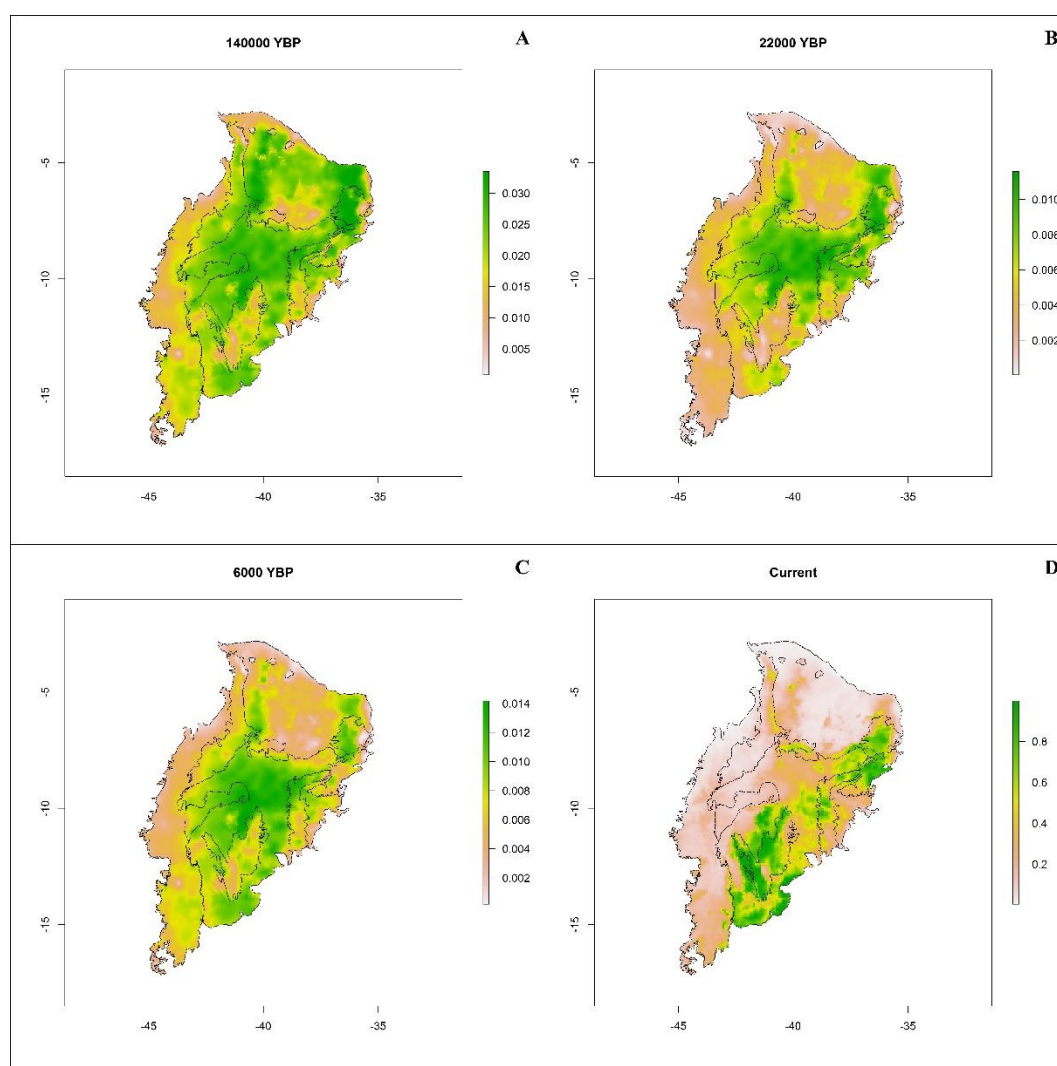


FIGURE 4 Distribuição de nicho de *B. pedicellata* projetada para o cenário climático do período glacial (A), último máximo glacial (B), holoceno médio (C) e clima atual (D).

5 CONCLUSÕES

O estudo sobre as populações de *Bionia pedicellata* revelou informações interessantes sobre essa espécie endêmica da Caatinga e que apresenta polinização cruzada obrigatória e dispersão limitada. Observamos variações dentro e entre as populações no fenótipo floral da espécie, sua guilda de polinizadores e a forma como o néctar é disponibilizado para os polinizadores. Isso demonstra uma adaptação da espécie de acordo com as pressões seletivas tanto do ambiente quanto de suas relações bióticas. Apesar de não encontrarmos uma relação estatística entre a morfologia do bico dos polinizadores e os traços florais diretamente ligados à reprodução, vimos um acoplamento entre essas características. Sendo assim, sugerimos estudos futuros que avaliem o processo de seleção fenotípica dentro da espécie.

Observamos um processo de redução histórica de nicho efetivo e deriva genética dentro das populações dessa espécie. As populações estão bastante estruturadas e isso pode restringir o fluxo gênico causando perda de haplótipos e alelos. Já foi possível observar esse processo a partir do nosso trabalho, uma vez que vimos um baixo valor de diversidade genética e haplotípica e isso pode ter sérias implicações para a história evolutiva da espécie, pois informações estão se perdendo. Além disso, vimos a partir da modelagem de distribuição de nicho, uma grande perda de hábitat ao longo dos anos em decorrência da perturbação antrópica crônica que a Caatinga vem sofrendo. Destacamos que é importante avaliar a espécie também do ponto de vista do fluxo polínico histórico a partir da aplicação de marcadores nucleares para compreendermos como efetivamente a perda de hábitat influenciou na perda haplotípica e estruturação populacional.

B. pedicellata ocorre em um ambiente restritivo e que vem sofrendo uma forte perturbação antrópica. Embora ela seja capaz de se adaptar às pressões seletivas, como vimos a partir da inferência de variações morfológicas que garantem seu sucesso reprodutivo, observamos baixa diversidade genética e haplotípica o que pode estar diretamente ligado ao fato da grande redução de nicho que a espécie vem sofrendo historicamente. A ação da deriva genética pode causar erosão genética e se nada for feito para conservar esse ambiente e espécie, é possível que parte da história evolutiva da Caatinga esteja se perdendo. Portanto, sugerimos que estudos nesse direcionamento, que avaliem biogeografia, sucesso reprodutivo e a genética de populações, sejam realizados nesse domínio fitogeográfico. Além disso, que haja

investimento e direcionamento de ações conservacionistas como implementação de áreas de proteção e educação ambiental dentro da Caatinga.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB'SABER, A. N. Sertões e sertanejos: uma geografia humana sofrida. **Estudos Avançados**, v. 13, p. 5-59, 1999.

AIDE, T. M.; RIVERA, E. Geographic patterns of genetic diversity in *Poulsenia armata* (Moraceae): implications for the theory of Pleistocene refugia and the importance of riparian forest. **Journal of Biogeography**, v. 25, p. 695-705, 1998.

ARAÚJO, E. L.; CASTRO, C. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Dynamics of Brazilian Caatinga – A review concerning the plants, environment and people. **Functional Ecosystems and Communities**, v. 1, n. 1, p. 15-28, 2007.

ARAÚJO, M. B. *et al.* Quaternary climate changes explain diversity among reptiles and amphibians. **Ecography**, v. 31, p. 8-15, 2007.

ARNAN, X. *et al.* A framework for deriving measures of chronic anthropogenic disturbance: Surrogate, direct, single and multi-metric indices in Brazilian Caatinga. **Ecological Indicators**, v. 94, p. 274-282, 2018.

AVISE, J. C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Cambridge: Harvard University Press, 2000. p. 1-447.

AVISE, J. C.; WALKER, D. Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. **The Royal Society**, v. 265, p. 457-463, 1998.

BEGON, M.; TOWNSEND, B. R.; HARPER, J. L. **Ecologia: de indivíduos a ecossistemas**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p. 1-752.

BERGER, A. Pleistocene climatic variability at astronomical frequencies. **Quaternary International**, v. 104, p. 1-14, 1989.

BOLTEN, A.; FEINSINGER, P. Why do hummingbird flowers secrete dilute nectar? **Biotropica**, v. 10, p. 307-309, 1978.

BONATELLI, I. A. S. Interglacial microrefugia and diversification of a cactus species complex: phylogeography and palaeodistributional reconstructions for *Pilosocereus aurisetus* and allies. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 3044-3063, 2014.

BROENNIMANN, O. *et al.* Measuring ecological niche overlap from occurrence and spatial environmental data. **Global Ecology and Biogeography**, v. 21, p. 481-497, 2011.

BROOKS, T. M. *et al.* Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. **Conservation Biology**, v. 16, n. 4, p. 909-923, 2002.

BROWN, J. H. On the relationship between abundance and distribution of species. **The American Naturalist**, v. 124, p. 255-277, 1984.

CAETANO, S. *et al.* The history of Seasonally Dry Tropical Forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Molecular Ecology**, v. 17, p. 3147-3159, 2008.

CANUTO, J. C. *et al.* Genética nos estudos com polinização. In: RECH, A. R. *et al.* (org.) **Biologia da Polinização**. ed. Projeto Cultural, Rio de Janeiro, 2014, p. 439-460.

CAPUCHO, L. C. *et al.* Bromélias e beija-flores: um modelo observacional para testar hipóteses sobre correlações e adaptações morfológicas recíprocas. **Rodriguésia**, v. 58, p. 49-58, 2007.

CARVALHO, A. L. G.; BRITTO, M. R.; FERNANDES, D. S. Biogeography of the lizard genus *Tropidurus* Wied-Neuwied, 1825 (Squamata: Tropiduridae): distribution, endemism, and area relationships in South America. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59736, 2013.

CARNAVAL, A. C. *et al.* Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science**, v. 323, p. 785-789, 2009.

CASTILLA, A. R. *et al.* Adding landscape genetics and individual traits to the ecosystem function paradigm reveals the importance of species functional breadth. **PNAS**, v. 114, n. 48, p. 12761-12766, 2017.

CASTRO, S.; SILVEIRA, P.; NAVARRO, L. Floral traits variation, legitimate pollination, and nectar robbing in *Polygala vayredae* (Polygalaceae). **Ecological Research**, v. 24, p. 47-55, 2009.

CAVERS, S.; DICK, C. W. Phylogeography of Neotropical trees. **Journal of Biogeography**, v. 40, p. 615-617, 2013.

CAZÉ, A. L. R. *et al.* Could refuge theory and rivers acting as barriers explain the genetic variability distribution in the Atlantic Forest? **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 101, p. 242–251, 2016.

CHEVIN, L. M.; LANDE, R.; MACE, G. M. Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. **PLoS Biology**, v. 8, n. 4, p. e1000357, 2010.

COLINVAUX, P. A., OLIVEIRA, P. E., BUSH, M. B. Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scales: The failure of the aridity and refuge hypotheses. **Quaternary Science Review**, v. 19, p. 141-169, 2000.

COLLEVATTI, R. C. *et al.* A coupled phylogeographical and species distribution modelling approach recovers the demographical history of a Neotropical seasonally dry forest tree species. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 5845-5863, 2012.

CONNOR, E. F. The role of Pleistocene forest refugia in the evolution and biogeography of tropical biotas. **Tree**, v. 1, p. 165-168, 1986.

COSACOV, A.; COCUCCI, A. A.; SÉRSIC, A. N. Geographical differentiation in floral traits across the distribution range of the Patagonian oil-secreting *Calceolaria polyrhiza*: do pollinators matter? **Annals of Botany**, v. 113, p. 251-266, 2014.

CRESPI, E. J.; LESLIE, J. R.; BROWNE, R. A. Testing Pleistocene refugia theory: phylogeographical analysis of *Desmognathus wrighti*, a high-elevation salamander in the southern Appalachians. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 969-984, 2003.

CRISCI, J. V.; KATINAS, L.; POSADAS, O. **Historical biogeography**: an introduction. 1. ed. Cambridge: MA Harvard University Press, 2003. p. 1-263.

CRUZ, D. D. *et al.* Phenology and floral visitors of two sympatric *Heliconia* species in the Brazilian Atlantic forest. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 201, p. 519-527, 2006.

DALSGAARD, B. *et al.* Plant–hummingbird interactions in the West Indies: floral specialisation gradients associated with environment and hummingbird size. **Oecologia**, v. 159, p. 757-766, 2009.

DANSEREAU, P. Introdução à Biogeografia. **Revista Brasileira de Geografia**, v. 11, p. 1-85, 1949.

DEMETRIO, K. M. **Fenologia e biologia reprodutiva de duas espécies ornitófilas do Parque Nacional do Catimbau, Buíque/PE**. 87f. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

DENG, J. Y. The genetic consequences of habitat specificity for fig trees in southern African fragmented forests. **Acta Oecologica**, v. 102, p. 1-8, 2020.

DICK, C. W.; HEUERTZ, M. The complex biogeographic history of a widespread tropical tree species. **Evolution**, v. 62, p. 2760–2774, 2008.

DIRNBÖCK, T.; ESSL, F.; RABITSCH, W. Disproportional risk for habitat loss of high-altitude endemic species under climate change. **Global Change Biology**, v. 17, p. 990-996, 2011.

DUNSON, W. A.; TRAVIS, J. The role of abiotic factors in community organization. **The American Naturalist**, v. 138, p. 1067-1091, 1991.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **Principles of pollination ecology**. 3. ed. Toronto: Pergamon, 1980. p. 1-240.

FEINSINGER P. Coevolution and pollination. In: FUTUYMA, D. J.; SLATKIN, M. (org.), **Coevolution**, Sinauer Associates, Massachusetts, 1983, p. 282-310.

FENSTER, C. B. *et al.* Nectar reward and advertisement in hummingbird-pollinated *Silene virginica* (Caryophyllaceae). **American Journal of Botany**, v. 93, n. 12, p. 1800-1807, 2006.

FIASCHI, P.; PIRANI, J. R. Review of plant biogeographic studies in Brazil. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 47, p. 477-496, 2009.

FISCHER, E.; ARAÚJO, A. C.; GONÇALVES, F. Polinização por vertebrados. In: RECH, A. R. *et al.* (org.) **Biologia da Polinização**. ed. Projeto Cultural, Rio de Janeiro, 2014, p. 311-326.

GALLETO, L.; BERNARDELLO, G. Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six *Ipomoea* species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. **Annals of Botany**, v. 94, p. 269-280, 2004.

GANDARA, F. B. *et al.* The effects of habitat loss on genetic diversity and population structure of *Cedrela fissilis* Vell. **Tropical Plant Biology**, v. 12, p. 282-292, 2019.

GARCIA, M. G. *et al.* Molecular evidence of cryptic speciation, historical range expansion, and recent intraspecific hybridization in the Neotropical seasonal forest tree *Cedrela fissilis* (Meliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 61, p. 639-649, 2011.

GIANNINI, T. B. *et al.* Desafios atuais da modelagem preditiva de distribuição de espécies. **Rodriguesia**, v. 63, p. 733-749, 2012.

GILES, B. E. *et al.* Natural selection on floral traits of female *Silene dioica* by a sexually transmitted disease. **New Phytologist**, v. 169, p. 729-739, 2006.

GONÇALVES-OLIVEIRA, R. *et al.* Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): evidence for cryptic speciation. **American Journal of Botany**, v. 104, n. 6, p. 868-878, 2017.

GREGORIN, R.; CARMIGNOTTO, A. P.; PERCEQUILLO, A. R. Quirópteros do Parque Nacional da Serra das Confusões, Piauí, nordeste do Brasil. **Chiroptera Neotropical**, v. 14, 366-383, 2008.

GUEDES, T. B.; SAWAYA, R. J.; NOGUEIRA, C. C. Biogeography, vicariance and conservation of snakes of the neglected and endangered Caatinga region, north-eastern Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 41, p. 919-931, 2014.

GUISAN, A.; THUILLER, W. Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. **Ecology Letters**, v. 8, p. 993-1009, 2005.

HADLEY, A. S. *et al.* Forest fragmentation and loss reduce richness, availability, and specialization in tropical hummingbird communities. **Biotropica**, v. 0, p. 1-10, 2017.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, v. 165, p. 131-137, 1969.

HAINSWORTH, F. R.; WOLF, L. L. Crop volume, nectar concentration and hummingbird energetics. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 42, p. 359-366, 1972.

HARDY, O. J.; SONKÉ, B. Spatial pattern analysis of tree species distribution in a tropical rain forest of Cameroon: assessing the role of limited dispersal and niche differentiation. **Forest Ecology and Management**, v. 197, p. 191-202, 2004.

HERRERA, C. M. *et al.* Interaction of pollinators and herbivores on plant fitness suggests a pathway for correlated evolution of mutualism- and antagonism-related traits. **PNAS**, v. 99, n. 26, p. 16823-16828, 2006.

HOOGHIEMSTRA, H.; HAMMEN, T. V. D. Neogene and Quaternary development of the neotropical rain forest: the forest refugia hypothesis, and a literature overview. **Earth-Science Review**, v. 44, p. 147-183, 1998.

JIMÉNEZ-ALFARO, B.; DRAPER, D.; NOGUÉS-BRAVO, D. Modeling the potential area of occupancy at fine resolution may reduce uncertainty in species range estimates. **Biological Conservation**, v. 147, p. 190-196, 2012.

KACZOROWSKI, R. L.; GARDENER, M.; HOLTSFORD, T. P. Nectar traits in *Nicotiana* section *Alatae* (Solanaceae) in relation to floral traits, pollinators, and mating system. **American Journal of Botany**, v. 92, p. 1270-1283, 2005.

KLIMAN, R.; SHEEHY, B.; SCHULTZ, J. Genetic drift and effective population size. **Nature Education**, v. 1, n. 3, p. 3, 2008.

LAS-CASAS, F. M. G; AZEVEDO, S. M.; DIAS, M. The community of hummingbirds (Aves: Trochilidae) and the assemblage of flowers in a Caatinga vegetation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, p. 51-58, 2012.

LEAL, I. R. *et al.* Changing the Course of Biodiversity Conservation in the Caatinga of Northeastern Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, p. 701-706, 2005.

LEVY, F.; NEAL, C. L. Spatial and temporal genetic structure in chloroplast and allozyme markers in *Phacelia dubia* implicate genetic drift. **Heredity**, v. 82, p. 422-431, 1999.

LIMA, N. E. *et al.* 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**, v. 41, p. 673-686, 2014.

LINHART, Y. *et al.* Forager behavior, pollen dispersal, and inbreeding in two species of hummingbird-pollinated plants. **Evolution**, v. 41, p. 679-682, 1987.

LOHMANN, L. G. *et al.* Pattern and timing of biogeographical history in the Neotropical tribe Bignonieae (Bignoniaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 171, p. 154-170, 2013.

LONGO, J. M.; FISCHER, E. Efeito da taxa de secreção de néctar sobre a polinização e a produção de sementes em flores de *Passiflora speciosa* Gardn. (Passifloraceae) no Pantanal. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 481-488, 2006.

LPWG. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, p. 44-77, 2017.

MACHADO, C. G. Beija-flores (Aves: Trochilidae) e seus recursos florais em uma área de caatinga da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Zoologia**, v. 26, p. 255-265, 2009.

MACHADO, C. G. *et al.* Beija-flores e seus recursos florais em uma área de campo rupestre da Chapada Diamantina, Bahia. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 15, p. 267-279, 2009.

MÄDER, G. *et al.* Geological and climatic changes in quaternary shaped the evolutionary history of *Calibrachoa heterophylla*, an endemic South-Atlantic species of petunia. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 178, p. 1-13, 2013.

MARINI, M. A. *et al.* Applying ecological niche modelling to plan conservation actions for the Red-spectacled Amazon (*Amazona pretrei*). **Biological Conservation**, v. 143, p. 102-112, 2009.

MARTINS, A. B. Abordagens históricas no estudo das interações planta-polinizador. **Oecologia Australis**, v. 17, p. 39-52, 2013.

MARTINS, F. M.; DOMINGUES, M. V. Filogeografia. **Revista da Biologia**, v. Esp. Biogeografia, p. 26-30, 2011.

MAYLE, F. E. Assessment of the Neotropical dry forest refugia hypothesis in the light of palaeoecological data and vegetation model simulations. **Journal of Quaternary Science**, v. 19, p. 713-720, 2004.

MCDADE, L.; WEEKS, J. Nectar in hummingbird-pollinated neotropical plants ii: interactions with flower visitors. **Biotropica**, v. 36, p. 216-230, 2004.

MEHANNA, M.; PENHA, J. Fatores abióticos que afetam a distribuição do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 em riachos de cabeceiras de Chapada dos Guimarães, Bacia do Rio Cuiabá, Mato Grosso. **Bioscience Journal**, v. 27, p. 125-137, 2011.

MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NATTERO, J.; COCUCCHI, A. A. Geographical variation in floral traits of the tree tobacco in relation to its hummingbird pollinator fauna. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 90, p. 657-667, 2007.

NOGUÉS-BRAVO, D. *et al.* Climate change, humans, and the extinction of the woolly mammoth. **PLoS Biology**, v. 6, n. 4, p. e79, 2008.

NOVAES, R. M. L. *et al.* Phylogeography of *Plathymentia reticulata* (Leguminosae) reveals

patterns of recente range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrado in Eastern Tropical South America. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 985-998, 2010.

NOVAES, R. M. L. *et al.* Concordance between Phylogeographical and a Biogeographical Patterns in the Brazilian Cerrado: Diversification of the endemic tree *Dalbergia miscolobium* (Fabaceae). **PlosOne**, v. 8, p. e82198, 2013.

OLLERTON, J. Pollinator diversity: distribution, ecological function, and conservation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 48, p. 353-376, 2017.

PALMA-SILVA, C. *et al.* Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. **Heredity**, v. 103, p. 503–512, 2009.

PAROLO, G.; ROSSI, G.; FERRARINI, A. Toward improved species niche modelling: *Arnica montana* in the Alps as a case study. **Journal of Applied Ecology**, v. 45, p. 1410-1418, 2008.

PEIXOTO, A. L.; MORIM, M. P. Coleções botânicas: documentação da biodiversidade brasileira. **Ciência e cultura**, v. 55, p. 21-24, 2003.

PENNINGTON, T. R.; PRADO, D. E.; PENDRY, C. A. Neotropical Seasonally Dry Forests and Quaternary vegetation changes. **Journal of Biogeography**, v. 27, p. 261-273, 2000.

PETERSON, A. T. Predicting the geography of species' invasions via ecological niche modelling. **The Quartely Review of Biology**, v. 78, p. 419-433, 2003.

PETERSON, A. T.; BALL, L. G.; COHOON, K. P. Predicting distributions of Mexican birds using ecological niche modelling methods. **Ibis**, v. 144, p. 27-32, 2002.

PINANGÉ, D. S. B. *et al.* Population genetics shed light on species delimitation and life history of the *Dyckia pernambucana* complex (Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. XX, p. 1-20, 2019.

PINHEIRO, F. *et al.* Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. **Evolution**, v. 67, p. 2024-2039, 2013.

PINHEIRO, F. *et al.* Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. **Journal of Biogeography**, v. 38, p. 1923-1935, 2011.

PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. Patterns of Species Distributions in the Dry Seasonal Forests of South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 80, p. 902-927, 1993.

PYKE, G. H.; WASER, N. M. The production of dilute nectars by hummingbird and honeyeater flowers. **Biotropica**, v. 13, p. 260-270, 1981.

QUEIROZ, L. P. Re-establishment, synopsis and new combinations in the genus *Bionia* Mart. Ex. Benth. (Leguminosae: Papilionoideae). **Neodiversity**, v. 3, p. 13-18, 2008.

QUEIROZ, L. P. The Brazilian Caatinga: phytogeographical patterns inferred from distribution data of the Leguminosae. In: PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G. P.; RATTER, G. P. (org.) **Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography, and conservation**, CRC Press, Florida, 2006, p. 121–157.

RAMOS, A. C. S. *et al.* Phylogeography of the tree *Hymenaea stignocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of Quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. **Annals of Botany**, v. 100, p. 1219-1228, 2007.

RAXWORTHY, C. J. *et al.* Applications of ecological niche modeling for species delimitation: a review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. **Systematic Biology**, v. 56, p. 907-923, 2007.

RIBEIRO, R. A. *et al.* Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, v. 106, p. 46–57, 2011.

RIBEIRO, E. M. S. *et al.* Chronic anthropogenic disturbance drives the biological impoverishment of the Brazilian Caatinga vegetation. **Journal of Applied Ecology**, v. 52, p. 611-620, 2015.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 1-752.

RITO, K. F. *et al.* Precipitation mediates the effect of human disturbance on the Brazilian Caatinga vegetation. **Journal of Ecology**, v. 105, p. 828-838, 2017.

ROBERTS, M. W. Hummingbirds' nectar concentration preferences at low volume: the importance of time scale. **Animal Behaviour**, v. 52, p. 361-370, 1996.

SAKURAGUI, B. M. Biogeografia de *Philodendron* seção Calostigma (Schott) Pfeiffer (Araceae) no Brasil. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 561-569, 2001.

SÁNCHEZ-LAFUENTE, A. M. Corolla herbivory, pollination success and fruit predation in complex flowers: an experimental study with *Linaria lilacina* (Scrophulariaceae). **Annals of Botany**, v. 99, p. 355-364, 2007.

SANTOS, J. C. *et al.* Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical forest. **Tropical Conservation Science**, v. 4, p. 276-286, 2011.

SATTLER, T. *et al.* Ecological niche modelling of two cryptic bat species calls for a reassessment of their conservation status. **Journal of Applied Ecology**, v. 44, p. 1188-1199, 2007.

SCHAAL, B. A. *et al.* Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 465-474, 1998.

SCHEMSKE, D. W.; BRADSHAW, H. D. Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 11910-11915, 1999.

SCHÖNSWETTER, P. *et al.* Molecular evidence for glacial refugia of mountain plants in the European Alps. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 3547-3555, 2005.

SEGATTO, A. L. A. *et al.* Nuclear and plastid markers reveal the persistence of genetic identity: A new perspective on the evolutionary history of *Petunia exserta*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 70, p. 504-512, 2014.

SHEPHERD, G. Conhecimento de diversidade de plantas terrestres do Brasil. In: LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. (org.) **Biodiversidade brasileira: Síntese do estado atual do conhecimento**. ed. Contexto, São Paulo, p. 176.

SILVA, J. L. S. et al. Climate change will reduce suitable Caatinga dry forest habitat for endemic plants with disproportionate impacts on specialized reproductive strategies. **PLoS ONE**, v. 14, n. 5, p. e0217028, 2019.

SILVERTOWN, J. Plant coexistence and the niche. **TRENDS in Ecology and Evolution**, v. 19, n. 11, p. 605-611, 2004.

SOUZA, V. B.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Fanerógamas Nativas e Exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2012. p. 1-768.

SVENNING, J. C. et al. Applications of species distribution modeling to paleobiology. **Quaternary Science Reviews**, v. 30, p. 2930-2947, 2011.

TABARELLI, M. et al. The Future of the Caatinga. In: SILVA, J. M. C., LEAL, I. R., TABARELLI, M. (org.) **Caatinga: The largest Tropical Dry Forest region in South America**. Springer, Cham, 2017, p. 461-474.

TAMM, S.; GASS, C. L. Energy intake rates and nectar concentration preferences by hummingbirds. **Oecologia**, v. 70, p. 20-23, 1986.

TEIXEIRA, C. S. et al. Crystal structure of the lectin of *Camptosema pedicellatum*: implications of a conservative substitution at the hydrophobic subsite. **The Journal of Biochemistry**, v. 152, n. 1, p. 87-98, 2012.

THORN, J. S. et al. Ecological niche modelling as a technique for assessing threats and setting conservation priorities for Asian slow lorises (Primates: Nycticebus). **Diversity and Distributions**, v. 15, p. 289-298, 2009.

THUILLER, W. et al. BIOMOD – a platform for ensemble forecasting of species distributions. **Ecography**, v. 32, p. 369-373, 2009.

TORRES-VENEGAS, F. *et al.* The landscape genetic signature of pollination by trapliners: evidence from the tropical herb, *Heliconia tortuosa*. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 1-12, 2019.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. *et al.* Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinoideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **65**, 174-182, 2012.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. *et al.* Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, v. 22, p. 1193-1213, 2013.

VIEIRA, F. A. *et al.* Holocene southward expansion in seasonally dry tropical forests in South America: phylogeography of *Ficus bonijesulapensis* (Moraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, p. 189-201, 2005.

WANG, I. J.; BRADBURY, G. S. Isolation by environment. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 5649-5662, 2014.

WEBB, T.; BARTLEIN, P. J. Global changes during the last 3 million years: climatic controls and biotic responses. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 23, p. 141-173, 1992.

WIENS, J. J.; DONOGHUE, M. J. Historical biogeography, ecology and species richness. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 45, p. 639-644, 2004.

WOLF, L. L.; HAINSWORTH, F. R.; STILES, F. G. Energetics of foraging: rate and efficiency of nectar extraction by hummingbirds. **Science**, v. 176, p. 1351-1352, 1972.

WORTH, J. R. P. *et al.* Low but structured chloroplast diversity in *Atherosperma moschatum* (Atherospermataceae) suggests bottlenecks in response to the Pleistocene glacials. **Annals of Botany**, v. 108, p. 1247-1256, 2011.

YAHARA, T. *et al.* Global legume diversity assessment: Concepts, key indicators, and strategies. **Taxon**, v. 62, n. 2, p. 249-266, 2013.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Tree**, v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.

ANEXO

Normas para publicação na revista **Plant Ecology & Diversity**

Normas completas disponíveis em:

<https://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?show=instructions&journalCode=tped20>



Instructions for authors

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal's requirements.

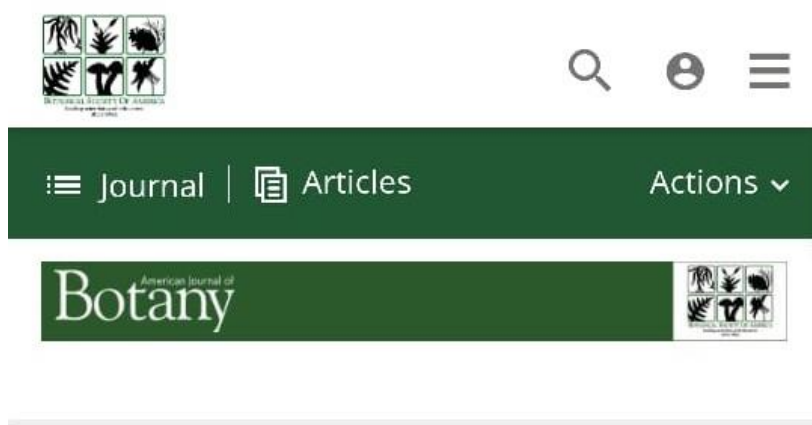
AUTHOR SERVICES
Supporting Taylor & Francis authors

For general guidance on every stage of the publication process, please visit our [Author Services website](#)

Normas para publicação na revista *American Journal of Botany*

Normas completas disponíveis em:

<https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/hub/journal/15372197/homepage/forauthors>



Sections

1. Submission

- 2. Aims and Scope**
- 3. Manuscript Categories and Requirements**
- 4. Preparing the Submission**
- 5. Editorial Policies and Ethical Considerations**
- 6. Author Licensing**
- 7. Publication Process After Acceptance**
- 8. Post Publication**
- 9. Editorial Office Contact Details**

1. SUBMISSION

Authors should kindly note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium. *AJB* will consider for review articles previously available as preprints on non-commercial servers such as bioRxiv. Authors