UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BOTANICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

ISABELLE FERNANDES DE ALBUQUERQUE

MORFOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO, ORIGEM E FILOGEOGRAFIA DE CITÓTIPOS DIPLOIDES E TETRAPLOIDES DE *Libidibia ferrea* (LEGUMINOSAE)

RECIFE
2019

ISABELLE FERNANDES DE ALBUQUERQUE

MORFOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO, ORIGEM E FILOGEOGRAFIA DE CITÓTIPOS DIPLOIDES E TETRAPLOIDES DE *Libidibia ferrea* (LEGUMINOSAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de doutor em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Ecologia e conservação

Orientadora: Profa. Dra. Ariadna Valentina De Freitas e Lopes
Coorientadora: Profa. Dra. Andrea Pedrosa-Harand

RECIFE

2019

Catalogação na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Albuquerque, Isabelle Fernandes
Morfologia, distribuição, origem e filogeografia de citótipos diploides e tetraploides de *Libidia ferrea* (Leguminosae) / Isabelle Fernandes de Albuquerque. – 2019.

95 f. : il.

Orientadora: Profª. Drª. Ariadna Valentina Lopes.
Coorientadora: Profª. Drª. Andrea Pedrosa-Harand.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Recife, 2019.
Inclui referências e anexos.

1. Leguminosa. 2. Filogeografia. 3. Genética vegetal. I. Lopes, Ariadna Valentina (Orientadora). II. Pedrosa-Harand, Andrea (Coorientadora). III. Título.

583.74 CDD (22.ed.) UFPE/CB – 2020 - 031

ISABELLE FERNANDES DE ALBUQUERQUE

MORFOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO, ORIGEM E FILOGEOGRAFIA DE CITÓTIPOS DIPLOIDES E TETRAPLOIDES DE *Libidibia ferrea* (LEGUMINOSAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de doutor em Biologia Vegetal.

Aprovada em: 22/02/2019

BANCA EXAMINADORA:

_____

Profa. Dra. ARIADNA VALENTINA LOPES (Orientadora)
Departamento de Botânica – UFPE

_____

Prof. Dr. MARCELO TABARELLI (Titular interno)
Departamento de Botânica – UFPE

_____

Dra. LAIS ANGÉLICA BORGES (Titular externo)
Departamento de Botânica - UFPB

_____

Dr. OSWALDO CRUZ-NETO (Titular externo)
Departamento de Botânica – UFPE (Pós-Doutorando)

_____

Dr. ARTUR MAIA WANDERLEY (Titular externo)
Departamento de Botânica – UFPE (Pós-Doutorando)

_____

Dra. INARA R. LEAL (Suplente interno)
Departamento de Botânica – UFPE

_____

Dra. JESSICA L. SOUZA E SILVA (Suplente externo)
Departamento de Botânica – UFPE (Pós-Doutoranda)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Ariadna Lopes, dizer obrigada seria muito pouco! Minha gratidão por toda a confiança depositada em mim, por sempre apoiar as minhas decisões e assumir comigo todos os ônus e bônus vindos delas. Sem dúvidas, esse trabalho foi um grande desafio e seria impossível sem seu otimismo, seu olhar generoso e suas palavras tranquilizadoras. A você, ori, todo meu respeito, carinho e admiração.

À minha coorientadora Dr. Andrea Pedrosa-Harand, pelo aceite em participar deste trabalho e pelo acompanhamento sem igual. Obrigada por me iniciar ao mundo dos marcadores moleculares, com tanta paciência, dedicação e comprometimento.

Ao professor Dr. Lyderson Viccini, da Universidade Federal de Juiz de Fora, por me receber em seu laboratório de pesquisa com os braços abertos. Por toda a ajuda com a citometria de fluxo e por viabilizar minhas coletas na região sudeste.

Aos professores Dr. Douglas Soltis e Dra. Pamela Soltis, da Universidade da Flórida, em Gainesville, e ao professor assistente Dr. Evgeny Mavrodiev, vinculado a eles, pela grandiosa oportunidade de realizar estágio no exterior em seu laboratório e por todos os ensinamentos.

À Dra. Laís Borges por toda ajuda desde o mestrado e, sobretudo, por ter me presenteado com suas ideias e estudos com a espécie *Libidibia ferrea*.

A todos os integrantes do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva - UFPE e do Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal – UFPE, principalmente à Dra. Elivania Barral, pela amizade e companheirismo em laboratório e campo e por sua paciência em ensinar toda a parte laboratorial, a Tiago Esposito, pela valiosa ajuda com as sequencias e análises das regiões plastidiais, e ao Dr. Oswaldo Cruz-Neto, pelas ajudas com várias análises, construção dos mapas e disponibilidade em ajudar sempre.

Aos administradores da RPPN Fazenda Almas/PB, da Usina Miriri/PB, Mineradora Milenium/PB, da Reserva da Vale de Linhares/ES e da Reserva Natural Serra das Almas/CE, por permitirem as coletas nas respectivas unidades de conservação.

Ao Dr. George Machado, por viabilizar a logística com as populações do Estado do Ceará e a Carolina Pessoa, pelo indivíduo da fazenda pentecostes.

À Tia Nena, por toda ajuda com as coletas na Bahia, Sergipe e Alagoas.

À Marlene Barbosa, curadora do herbário UFP, pela cuidadosa ajuda com a herborização do material e pela solicitação de outros a herbários parceiros.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFPE, principalmente a Hildebrando, Soraya e Felipe, pela disposição em ajudar sempre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFPE e à CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e doutorado sanduiche/PDSE.

“Há quem fale
Que a vida da gente
É um nada no mundo
É uma gota, é um tempo
Que nem dá um segundo”

(Gonzaguinha)

RESUMO

A multiplicação genômica é reconhecida como um importante e frequente mecanismo de especiação em plantas. A partir desse único evento genético, mudanças geradas podem persistir e ocasionar modificações fenotípicas e ecológicas aos novos indivíduos formados. Entretanto o potencial evolucionário desse processo permanece sendo alvo de debates. Comparado com alopoliploides, espécies autopoliploides vem sendo alvo de poucos estudos. Alguns estudos apontam para diferenças no padrão de distribuição dos autopoliploides, que podem ser explicados por diferenças ambientais e ou múltiplas origens. Assim, o objetivo geral desta tese foi investigar a distribuição e as adaptações morfológicas da espécie autopoliploide *Libidibia ferrea* e, com o auxílio de marcadores moleculares e modelagem de nicho explicar como se deu essa distribuição. Populações diploides e tetraploides foram encontradas separadas espacialmente com uma pequena área de coocorrência. Populações diploides mostraram-se amplamente distribuídas enquanto as tetraploides ocorreram numa faixa entre seus progenitores além de apresentar contração de nicho. Adaptações morfológicas à condição seca foram encontradas nas populações tetraploides, embora esse achado não coloque os novos poliploides como melhores competidores. Em conjunto, esses resultados sugerem limitada capacidade de dispersão da espécie e ocupação de áreas pelos poliploides antes não ocupadas por seus progenitores. Não foi possível encontrar características morfológicas e de nicho que coloque os novos poliploides formados como pertencentes a uma nova espécie. Os dados moleculares apontam três origens tetraploides. A estruturação dos haplótipos mostrou-se fraca e sugere conexões pretéritas entre áreas. Origens distintas encontradas dentro de populações tetraploides indicam fluxo gênico passado entre essas áreas, enquanto a presença de haplótipos derivados indicam a poliploidia como uma boa estratégia para o sucesso evolutivo. Nossa datação molecular indica que a espécie começou a se diversificar a cerca de 6 Ma. Não foi possível inferir com precisão a rota de colonização da espécie, porém, hipotetizamos que ela tenha se dado pelo norte da distribuição da espécie.

Palavras-chave: Autopoliploidia. Distribuição. Filogeografia. Leguminosae.

ABSTRACT

Genomic multiplication is recognized as an important and frequent mechanism of speciation in plants. From this single genetic event, generated changes can persist and cause phenotypic and ecological changes to newly formed individuals. However, the evolutionary potential of this process remains the subject of debate. Compared with alopoliploids, autopolyloid species have been the subject of few studies. Some studies point to differences in the distribution pattern of autopoliploids, which can be explained by environmental differences and / or multiple origins. Thus, the general objective of this thesis was to investigate the distribution and morphological adaptations of the autopoliploid species *Libidibia ferrea* and, with the help of molecular markers and niche modeling, explain how this distribution occurred. Diploid and tetraploid populations were separated spatially with a small area of co-occurrence. Diploid populations were widely distributed while the tetraploids occurred in a range between their progenitors in addition to presenting niche contraction. Morphological adaptations to the dry condition were found in the tetraploid populations, although this finding does not place the new polyploids as better competitors. Taken together, these results suggest limited ability of species dispersal and occupation of areas by polyploids previously not occupied by their parents. It was not possible to find morphological and niche characteristics that put the new poliploids formed as belonging to a new species. Molecular data point to three tetraploid origins. The structure of the haplotypes was weak and suggests previous connections between areas. Different origins found within tetraploid populations indicate past gene flow between these areas, while the presence of derived haplotypes indicate polyploidy as a good strategy for evolutionary success. Our molecular dating indicates that the species began to diversify to about 6 Ma. It was not possible to infer with precision the route of colonization of the species, however, we hypothesized that it was given by the north of the distribution of the species.

Key words: Autopoliploidy. Distribution. Phylogeography. Leguminosae.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Figura 1 - Distribuição geográfica das populações nas quais foram realizadas coletas de material botânico de espécie *Libidibia ferrea.* Os triângulos representam as populações mistas da espécie, os círculos as populações diploides e os quadrados as populações tetraploides..... 46

Figura 2 - Visão geral da dissociação da epiderme, com estômatos, para a espécie *Libidibia ferrea*. A fotomicrografia a esquerda pertence a um indivíduo diploide da espécie, e a fotomicrografia da esquerda a um indivíduo tetraploide..... 51

Figura 3 - Modelagem de nicho de *Libidibia ferrea* para a América do Sul, para o conjunto total das populações dos citotipos diploides e tetraploides, exclusivamente populações diploides e exclusivamente populações tetraploides, respectivamente..... 52

Figura 4ª - Visão geral dos cortes transversais da espécie *Libidibia ferrea* (Leguminosae) para cada uma das populações estudadas, respectivamente as tetraploides (A) Piranhas nova- AL, (B) São José dos cordeiros –PB, (C) Xingozinho – BA, e as diploides D) Caucaia – CE, (E) Linhares – ESL (F) Pirapora – MG..... 53

Figura 4b - Visão geral dos cortes transversais da espécie *Libidibia ferrea* (Leguminosae) para cada uma das populações estudadas, respectivamente as diploides (G) Pirapora – MG (H) Campos dos Goytacazes – RJ, e as tetraploides (I) Canindé do São Francisco – SE (J) Canindé do São Francisco – SE (K) Parnamirim – PE..... 54

Artigo 2

Figura 1 - Número de *clusters* formados a partir do programa GENLAND mostrando os agrupamentos genéticos das populações de *Libidibia ferrea* no espaço geográfico. (a) Números mais prováveis de grupos formados com o conjunto de dados utilizando os marcadores *ndh*F e *ycf*1- *ycf*2. (b) Apresentação geográfica dos grupos formados a partir de dados com os marcadores *ndh*F e *ycf*1- *ycf*2. (c) Números mais prováveis de grupos formados com o conjunto de dados utilizando os marcadores SSR. (d) Apresentação geográfica dos grupos formados a partir de dados com os marcadores SSR. Os círculos indicam populações diploides da espécie, os triângulos populações tetraploides e os quadrados áreas onde os dois

citótipos coocorrem..... 83

Figura 2 - Distribuição e origem dos haplótipos de cpDNA de *Libidibia ferrea*. a) Mapa de distribuição das populações e haplótipos. b) Rede de haplótipos. Para cada haplótipo uma cor foi atribuída. Os círculos são proporcionais ao número de indivíduos encontrados para cada haplótipo. Os círculos fechados correspondem a populações diploides enquanto os abertos às populações tetraploides. O código de cada população é indicado no mapa. As linhas entre os círculos representam o número de passos mutacionais entre os haplótipos..... 84

Figura 3 - Teste de Mantel correlacionando a distância genética e geográfica entre todos os indivíduos de *L. ferrea* ao longo da sua área de ocorrência..... 85

Figura 4 - Árvore filogenética datada dos haplótipos de *Libidibia ferrea* baseada em duas regiões plastidiais concatenadas *ndh*f e *ycf*1. *Libidibia coriaria* foi utilizada como grupo externo e enraizada a árvore. Acima dos ramos está indicada a probabilidade a posteriori da inferência Bayesiana. Os ramos terminais estão indicados com as cores de cada haplótipo..... 86

Figura 5 - Distribuição e origem dos haplótipos de SSRcp de *Libidibia ferrea* – Leguminosae: a) Mapa de distribuição das populações e haplotipos da espécie *L. ferrea*. b) Rede de haplótipos gerada através programa *network* pelo método *median joining* a partir dos dados SSRcp. Para cada haplótipo uma cor foi atribuída. Os círculos são proporcionais ao número de indivíduos encontrados para cada haplótipo. Os círculos fechados correspondem a populações diploides, os abertos as populações tetraploides. Populações mistas estão representadas pelos dois símbolos. O código de cada população aparece plotado no mapa. As linhas entre os círculos representam o número de passos mutacionais entre os haplótipos e os círculos vermelhos correspondem aos vetores médios, quando um haplótipo não foi amostrado ou extinto..... 87

Figura S 1 - Rede de haplótipos completa para os dados SSRcp de *Libidibia ferrea* - Leguminosae. Para cada haplótipo uma cor foi atribuída. Os círculos são proporcionais ao número de indivíduos encontrados para cada haplótipos. As linhas entre os círculos representam o número de passos mutacionais entre os

haplótipos. Os pontos em vermelho são vetores médios..... 88

Figura S 2 - *Clusters* das populações de *Libidibia ferrea* formados a partir do programa GENLAND utilizando os marcadores *ndh*F e *ycf*1- *ycf*2. As imagens representam, respectivamente, da esquerda para direita os cinco agrupamentos genéticos possíveis para as populações (k = 1, k = 2, k = 3, k = 4 e k = 5) no espaço geográfico..... 89

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 - Principais caracteres utilizados para separação das variedades da espécie *Libidibia ferrea*. De acordo com Queiroz (2009) para classificação das variedades *L. ferrea* var. *ferrea, L. ferrea* var. *glabrescens e L. ferrea* var. *parvifolia* e, Benth para classificação da *L. ferrea* var. *leiostachya*..... 47

Tabela 2 - Relação das populações amostradas de *Libidibia ferrea*, seguida da sua respectiva localidade, número de indivíduos coletados em cada área, seu respectivo nível de ploidia, variedade e domínio fitogeográfico..... 48

Tabela 3 - Morfometria dos estômatos da espécie *Libidibia ferrea* (Leguminosae) analisados no conjunto de indivíduos diploides e tetraploides, localizados em populações ao longo de toda a área de distribuição da espécie..... 50

Artigo 2

Tabela 1 - Populações analisadas de *Libidibia ferrea* (Leguminosae), com código dado a população, número de indivíduos utilizados para cada marcador (N), coordenadas geográficas, nível de ploidia e domínio fitogeográfico. Nh - Número de haplótipos encontrados por população; Hap - diversidade haplotípica por população; Nu - diversidade nucleotídica por população da espécie *L. ferrea*. Os valores para o conjunto total de dados, soma de todas as populações, encontra-se no final desta tabela..... 80

Tabela 2 - Frequência (F), nível de ploidia (P) e descrição dos 10 haplótipos encontrados para *Libidibia ferrea* (Leguminosae) a partir da análise dos dados das regiões *ndh*f e *ycf*1 combinadas..... 81

Tabela 3 - Frequência (F), nível de ploidia (P) e descrição dos 22 haplótipos encontrados para *Libidibia ferrea* (Leguminosae) a partir da análise de quatro locos de cpSSR..... 82

LISTA DE SIGLAS

AMOVA - *Analysis of Molecular Variance* (análise da variância molecular)

cpDNA - DNA cloroplastidial

NSH - *niche shift hypothesis* (hipótese da mudança de nicho)

PCR - Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)

SDTF - *Seasonally Dry Tropical Forests* (florestas tropicais sazonais secas)

SSR - *Simple Sequence Repeat* (microssatélites)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 POLIPLOIDIA.....	17
2.2 ESPECIAÇÃO E POLIPLOIDIA.....	18
2.3 DITRIBUIÇÃO E ORIGEM DOS POLIPLOIDES.....	19
2.4 FILOGEOGRAFIA.....	22
2.5 TÁXON ESTUDADO.....	23
3 ARTIGO 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS DE CITÓTIPOS DIPLOIDES E TETRAPLOIDES DA ESPÉCIE ARBÓREA TROPICAL *LIBIDIBIA FERREA* (LEGUMINOSAE).....	25
4 ARTIGO 2 - ORIGEM E FILOGEOGRAFIA DOS CITÓTIPOS DIPLOIDES E TETRAPLOIDES DA ESPÉCIE *LIBIDIBIA FERREA* (LEGUMINOSAE).....	55
5 CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS.....	92
ANEXO A.....	94
ANEXO B.....	95

1 INTRODUÇÃO

A poliploida pode ser definida como a multiplicação do genoma em três ou mais conjuntos completos de cromossomos e, embora rara em animais, trata-se de um mecanismo bastante comum em plantas (Ramsey & Schemske 1998). Estimativas recentes apontam que a totalidade das angiospermas passaram por pelo menos um evento de poliploidização ao longo de sua história evolutiva (Jião et al. 2011), entretanto o papel evolucionário desse evento vem sendo alvo de debates recentes (Mayrose et al. 2011; Arrigo & Barker 2012; Soltis et al. 2014).

Duas vertentes são reconhecidas em relação ao qual o papel evolucionário da multiplicação genômica: (1) Postula os poliploides como "*Dead ends*" ou "*blind alleys*" evolucionários, devido a ineficiência causada por genes que são mascarados por múltiplas copias (2) A segunda vertente, coloca a poliploidia como uma rota promissora para o sucesso evolucionário (Soltis et al. 2014), baseando, sobretudo, na eficiência dos novos poliploides, sob seus progenitores, em relação a ecologia, geografia ou a combinação dessas propriedades (por exemplo, Fowler e Levin 1984; Levin 1983, 2002). Assim, de acordo com o segundo pressuposto, a poliploidia pode ser considerada uma excelente estratégia adaptativa. Como atinge todo o conjunto gênico leva a mudanças bioquímicas, fisiológicas, fenotípicas e no desenvolvimento, o que pode conferir capacidade de adaptação a novas condições ambientais e facilitar seu estabelecimento (Levin 1983; Ramsey & Schemske, 1998).

Espécies poliploides podem ser classificadas quanto a sua origem em alopoliploides, quando se dá pela duplicação de genomas distintos e autopoliploides quando surgem pela duplicação de um mesmo genoma (Stebbins, 1971). Devido a semelhanças morfológicas com seus progenitores (Spoelhof et al 2017) e problemas no pareamento cromossômico (Stebbins, 1950; Grant, 1981), espécies autopoliploides vem historicamente sendo consideradas raras ou mal adaptadas e pouco estudadas se comparadas com espécies alopoliploides. Entretanto, nos últimos 25 anos, os marcadores moleculares tem revelado que autopoliploides são mais comuns do que antes se assumia (Ramsey and Schemske, 1998 , 2002 ; Soltis et al., 2007 ; Parisod et al., 2010) e que a origem sem hibridização pode trazer vantagens evolucionárias devido ao aumento da heterozigozidade, múltiplas copias gênicas e diversidade alélica, o que

facilitaria seu estabelecimento e persistência (Parisod et al., 2010; Segraves et al., 1999). Assim, com a quebra desse paradigma, estudos com espécies autopoliploides tem se intensificado, no entanto, estudos com populações naturais permanecem raros (Soltis et al., 2014).

Estudos com espécies autopoliploides tem demostrado separação espacial entre os novos poliploides formados e seus progenitores, com alguma faixa de coocorrencia (Segraves et al. 1999; ex. Levin 1983; Dijk & Bakx-Schotman, 1997; Husband & Schemske 1998; Petit *et al*. 1999), o que vinha sendo comumente tentando ser explicado por diferenças ambientais e de nicho. Entretanto pesquisas recentes, através do uso de técnicas de modelagem de nicho, tem demostrado diferentes padrões, como contração, expansão ou conservação do nicho dos novos poliploides formados e essa distribuição pode ser melhor explicada por traços de histórico de vida e estratégias de dispersão das espécies (Glenn et al 2014).

Apesar do avanço no entendimento das consequências genéticas da autopoliploidia, pouco conhecimento existe acerca da origem dessas populações (Soltis et al., 2014). Estudos realizados com espécies autopoliploides tem demonstrado que as linhagens poliploides não surgiram uma única vez ao longo da sua história evolutiva, a exemplo de *Aucuba japonica* (Ohi et al 2003), *Plantago media* (Van-Dijk e Bakx-Schotman 1997) *Heuchera glossulariifolia* (Segraves et al. 1999) com o mínimo de três origens distintas. Nenhuma espécie autopoliploide estudada até o momento apresentou origem única (Spoelhof et al 2017). Na espécie *Galax urceolata* foi encontrado o mínimo de 47 origens independentes (Servick et al., 2015), maior número encontrado, mesmo quando comparado a alopoliploides (Baack, 2004; Halverson et al., 2008; Peirson et al., 2013). Os autores afirmam que a formação frequente aumenta a diversidade genética e consequentemente, o sucesso no estabelecimento do citótipo poliploide.

Mediante o exposto, esse trabalho teve como objetivo geral investigar a distribuição e origem da espécie autopoliploide *Libidibia ferrea* e, através marcadores moleculares, caracterização morfológica e de modelagem de nicho explicar como se deu essa distribuição e estabelecimento.

2 FUNDAMENTAÇÃO

2.1 POLIPLOIDIA

A poliploidia pode ser definida como um processo de multiplicação do genoma em três ou mais conjuntos completos de cromossomos (Ramsey & Schemske 1998) e, embora seja raro em grupos animais (Otto & Whitton 2000), a poliploidia é comum em plantas (Soltis *et al*. 2004). Além disso, tem sido considerado um importante mecanismo de evolução e especiação, conhecido como um dos poucos capazes de atuar em simpatria (Soltis *et al*. 2007).

Diversos trabalhos vêm tentando estimar a taxa de poliploidia em plantas. De acordo com Masterson (1994), a ocorrência de poliploidia varia de 30 a 70% em angiospermas e esse valor se aproxima da totalidade em pteridófitas (Grant 1981). Entretanto, estimativas recentes mostram que esses valores são maiores do que antes se assumia. Jiao *et al*. (2011) apontaram dois eventos de poliploidia em linhagens ancestrais, um pouco antes da diversificação das plantas com sementes e outro antes da diversificação das angiospermas. A partir desses resultados puderam concluir que todas as plantas passaram por pelo menos um evento de poliploidia ao longo de sua historia evolutiva e este pode ter contribuído para a grande diversificação das plantas com sementes e com flor.

Entretanto, enquanto alguns pesquisadores atribuem à poliploidia uma importante rota para o sucesso evolucionário (*e.g*. Jiao *et al.* 2011), outros acreditam que a poliploidia pode ser considerada um *dead-end* evolucionário. Mayrose *et al*. 2011 observaram que as taxas de especiação em novos poliploides formados é significativamente menor quando comparada aos diploides enquanto a taxa de extinção é significativamente maior. Com base nisso concluíram que as linhagens neopoliploides exibem reduzida taxa de diversificação e a abundância dos poliploides pode ser uma consequência da sua formação frequente.

Diversos mecanismos citológicos podem induzir a poliploidia em plantas, como a duplicação de células somáticas e a formação de gametas não reduzidos (Ramsey & Schemske 1998). A duplicação das células somáticas pode ocorrer durante o ciclo de vida das plantas e resulta em células meristemáticas poliploides que podem originar um organismo novo poliploide (Tayalé & Parisod 2013). Por outro lado, durante o ciclo reprodutivo pode ocorrer a formação de gametas não reduzidos. Nesse processo, os gametas oriundos de indivíduos diploides contêm o número completo de cromossomos somáticos ($2n$) e a união de

gametas reduzidos e não reduzidos, ou de dois gametas não reduzidos, resultará em embriões poliploides (Ramsey & Schemske 1998).

O genoma duplicado desses indivíduos poliploides apresenta, muitas vezes, uma natureza altamente mutável e dinâmica (Soltis & Soltis 2012), podendo passar por intensa reorganização, a qual envolve reestruturação e alterações funcionais que, em conjunto com a poliploidia, é comumente referida como diploidização (Soltis& Soltis 2012; Tayalé & Parisod 2013). Através desse processo, restaura-se a herança diploide dos genomas duplicados. Dessa maneira, indivíduos poliploides podem ser classificados temporalmente em paleopoliploides, antigos poliploides com genomas geralmente diploidizados, ou neopoliploides, jovens poliploides com genomas duplicados (Tayalé & Parisod 2013). Quanto à origem, indivíduos poliploides podem ainda ser classificados em autopoliploides, quando surgem pela duplicação de um mesmo genoma, ou alopoliploides, quando originados pela duplicação de genomas distintos, normalmente após um evento de hibridização (Stebbins 1971).

2.2 ESPECIAÇÃO E POLIPLOIDIA

Uma das mais importantes implicações da poliploidia na evolução é a criação de novas espécies (Soltis & Soltis 2012). As mudanças genéticas causadas por essa multiplicação genômica tornam-se persistentes devido à incompatibilidade gerada entre os indivíduos diploides e seus descendentes poliploides, isolando-os reprodutivamente (Levin 1983; Husband & Sabara 2003). Dessa forma, de acordo com o conceito biológico de espécie, os novos indivíduos com genoma duplicado seriam classificados como uma nova espécie. Entretanto, tradicionalmente, indivíduos autopoliploides são considerados um citótipo dentro da mesma espécie, essa classificação pode levar a uma subestimativa do número de novas espécies formadas pela "especiação autopoliploide" (Soltis *et al.* 2007).

De acordo com a revisão realizada por Soltis *et al.* (2007), apenas uma espécie autopoliploide foi separada do seu progenitor como uma nova espécie. Os autores argumentam que essa separação precisa ser feita caso a caso e ainda, os novos indivíduos poliploides precisam, além de ser isolados reprodutivamente de seus progenitores, seguir seu próprio caminho evolutivo (*e.g.* Diferenciação de nicho) e apresentar características taxonômicas que os distingam morfologicamente.

Espécies poliploides podem apresentar características morfológicas distintas daquelas encontradas nos seus progenitores, como por exemplo, o aumento no tamanho das flores, bem explorado em literatura (Segraves & Thompson 1999; Borges *et al.* 2012). O aumento das

dimensões em indivíduos poliploides é referido como “efeito giga”, no qual os órgãos e células da planta aumentam de volume proporcionalmente a quantidade de DNA (Ramsey & Schemske 1998). Por exemplo, Masterson (1994) comparou o tamanho das células guardas de plantas extintas e atuais, e conseguiu inferir poliploidia se baseado nesse caractere morfológico.

Na espécie *Libidibia ferrea* através de trabalhos anteriores (Borges *et al*. 2012) ou através de observações pessoais, tem-se observado em indivíduos tetraploides aumento das dimensões de seus foliólolos, sendo estes indivíduos facilmente identificados em campo. Assim, faz-se necessário uma investigação a cerca dessa característica morfológica. Uma vez que os citótipos da espécie não produzem descendentes, espera-se encontrar requerimentos ambientais distintos e apresentam essa característica morfológica diagnóstica, uma nova classificação pose ser proposta, classificando o citótipo tetraploide como uma nova espécie.

2.3 DISTRIBUIÇÃO E ORIGEM DE POLIPLOIDES

Como afeta todo o conjunto gênico, mudanças bioquímicas, fisiológicas, fenotípicas e no desenvolvimento ocorrem em indivíduos poliploides, podendo conferir capacidade de adaptação a novas condições ambientais (Levin 1983; Ramsey & Schemske 1998). Nesse contexto, a poliploidia pode ser considerada uma excelente estratégia adaptativa, porque impulsiona a descoberta de novos nichos ecológicos através das modificações que proporciona (Reisemberg & Willis 2007).

Diante desse cenário, diversos estudos vêm sendo realizados para tentar entender a distribuição e separação de nicho desses citótipos; como resultado, populações poliploides vêm sendo geralmente encontradas distribuídas separadas espacialmente de seus progenitores diploides, mas podem, eventualmente, ocorrer em simpatria com esses indivíduos (Levin 1983; Van Dijk & Bakx-Schotman 1997; Husband & schemske 1998; Petit *et al*. 1999). Como exemplo dessa variação geográfica temos a distribuição da espécie *Chamerion angustifolium*, onde, de modo geral, populações diplóides são encontradas em altitudes mais elevadas que as tetraplóides, e ambas coocorrem numa estreita zona (5 km); mesmo nessa área de contato, indivíduos diplóides foram encontrados em locais com altitudes sutilmente maiores (Husband & Schemske 1998). Resultado semelhante foi encontrado também para as espécies *Plantago media* (Van Dijk *et al*. 1992).

Apesar das diferenças encontradas na distribuição das espécies os autores de ambos os trabalhos não conseguiram afirmar que essa separação espacial de nicho se deva à tolerância a

diferentes circunstâncias ecológicas ou devido ao histórico de colonização da espécie. Poucos trabalhos tem conseguido corroborar esse fato (Segraves *et al.* 1999; Baack 2004). Atenção especial tem sido dada ao estabelecimento local desses indivíduos e pouca informação existe acerca da sua expansão.

No que se refere ao estabelecimento de novas populações poliploides, diversos modelos teóricos tentam explicar as circunstâncias ecológicas e genéticas que regem as interações entre diploides e tetraploides (Levin 1975; Felber 1991; Rodriguez 1996). Um dos mais discutidos é o "modelo da exclusão do citótipo em minoria", proposto por Levin (1975). De acordo com esse modelo, os indivíduos poliploides, originados de progenitores diploides ficariam em desvantagem, o que pode levar a exclusão do novo citótipo. O cruzamento de indivíduos diploides e poliploides pode gerar indivíduos triploides, que são inviáveis ou estéreis. De acordo com esse pressuposto, o modelo afirma que o citótipo em minoria fica mais propenso ao recebimento de pólen do citótipo em maioria. Alta frequência desses cruzamentos pode resultar em menor sucesso reprodutivo e consequente decréscimo populacional do citótipo em minoria. Na ausência de produção contínua de indivíduos do citótipo em minoria, essa seleção impediria a coexistência dos citótipos.

Levando em consideração esse modelo, Fowler & Levin (1984) tentaram explicar como populações tetraploides são frequentemente encontradas distantes de seus progenitores, aplicando, para isso, o modelo de Lotka-Volterra. Como resultado, eles afirmaram que indivíduos tetraploides podem superar os diploides se tiverem vantagem competitiva sobre eles e caso os dois citótipos tenham preferencias ecológicas distintas eles podem coexistir. Concluíram com isso que os tetraploides superam essa força da exclusão do citótipo em minoria e se espalham além dos seus locais de origem.

Em contrapartida, Levin (2000) argumenta que é pouco provável que indivíduos poliploides tenham se espalhado para outras populações diploides e, em cada caso, aumentado sua frequência gradualmente e superado seus progenitores. O autor parte do pressuposto que diploides e poliploides tem tolerâncias ecológicas distintas, nesse caso, indivíduos poliploides estabeleceram-se em locais onde os diploides não existiam. Para que isso ocorresse, bastou que esses novos indivíduos tivessem um número suficiente de propágulos para se dispersar e chegar aos locais onde não existam diploides, e dessa forma, se estabelecer. Essa população seria o ponto de dispersão para outros sítios. Essa hipótese foi revisada recentemente por Glennon et al. (2014) que nomeou esse pressuposto como '*niche shift hypothesis'* (NSH).

Por outro lado, com o advento das técnicas moleculares, estudos filogenéticos recentes tem mostrado que a linhagem poliploide não surgiu uma única vez ao longo de sua história evolutiva (Segraves *et al.* 1999; Baack 2004; Halverson *et al.* 2008; Peirson *et al.* 2013). Por exemplo, estudo realizado com a espécie amplamente distribuída *Solidago* subsect *Humiles*; Peirson *et al.* 2013, usando material do DNA do cloroplasto, encontraram 24 haplótipos que não formaram um único clado, sendo 8 deles compartilhados com diploides e 16 presentes apenas nos indivíduos poliploides. Caso a origem dos poliploides fosse única, um único haplótipo deveria ter sido encontrado nos poliploides e estes descendentes deveriam pertencer a uma única linhagem. Resultado semelhante foi encontrado pelos mesmos autores para a espécie *Solidago simplex*, cujos resultados também indicaram a formação recorrente de poliplóides (Peirson *et al.* 2012).

Além da perspectiva filogenética, inferências acerca de hipóteses da história biogeográfica e entendimento dos processos de diversificação têm sido realizadas em trabalhos envolvendo complexos poliploides (Van Dijk & Bakx-Schotman, 1997). Esse tipo de enfoque, conhecido como uma subdisciplina da biogeografia é chamado de filogeografia. A filogeografia é um campo de estudo que objetiva acrescentar às perspectivas ecogeográficas tradicionais, elementos que enfatizam o papel atual de pressões ecológicas na definição das distribuições espaciais dos organismos, buscando evidencias sobre os processos atuais e históricos que influenciaram a variação genética observada atualmente nas populações (Avise 2000). Nesses estudos são utilizados marcadores moleculares e tem se baseado principalmente no polimorfismo do genoma do cloroplasto (cpDNA), devido a ausência de recombinação, ao modo de herança uniparental (materna) e a baixa taxa de mutação.

Como exemplo de complexos poliploides utilizados para testar hipóteses biogeográficas, podemos citar um recente estudo realizado por Li *et al*. (2014), com o complexo *Chrysanthemum indicum*, no Sudeste Asiático. É hipotetizado que oscilações climáticas do período Quaternário tiveram grande influencia na distribuição e padrão de biodiversidade de espécies no hemisfério norte. A partir de resultados obtidos, os autores puderam concluir que tais oscilações afetaram a demografia e a evolução do complexo. Apenas a forma tetraploide do complexo passou por uma grande expansão na parte sul durante o pleistoceno, não havendo evidências que formas diploides e outros poliploides tenham passado pelo mesmo processo durante o período.

2.4 FILOGEOGRAFIA

O termo filogeografia foi cunhado em 1987 por Avise e colaboradores, onde os autores reconheceram formalmente que os processos microevolutivos operantes dentro das espécies podem ser extrapolados para explicar diferenças macroevolutivas dentro e entre táxons. Assim, a filogeografia pode ser definida como um campo de estudo interessado em entender os princípios e processos que levam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas (Avise et al., 1987).

Para analisar e interpretar as distribuições das linhagens genéticas, ferramentas e informações de outras disciplinas, como a biologia molecular, genética de populações, paleontologia, geologia e a geografia são necessárias, Assim como mecanismos evolutivos evolvidos tais como mutação, deriva genética, fluxo gênico, seleção natural e eventos demográficos, que também deixam marcas na historia genealógica das populações (Cunha e Solé-Cava, 2012), isso faz da filogeografia uma disciplina totalmente integrativa. Dessa forma, a filogeografia não precisa basear-se exclusivamente em dados moleculares. Pesquisas filogeográficas podem ser realizadas com dados morfológicos, comportamentais ou outros quaisquer desde que analisados por uma perspectiva filogenética ao longo de uma distribuição geográfica (Avise 2000).

As oscilações climáticas do período quaternário são reconhecidas como importantes mecanismos que se comportaram como um gatilho para os processos de diversificação e especiação (Hewitt 2000). O clima seco e as glaciações podem ter favorecido a expansão de algumas espécies enquanto outras estiveram restritas em áreas conhecidas como refúgios. A teoria dos refúgios do pleistoceno postula, sobretudo para áreas de savanas, que estas se expandiram por dentro da Amazônia durante o ultimo máximo glacial (LGM), fragmentando a distribuição da vegetação da floresta tropical (Haffer 1969).

Por se tratar de um largo continente, com diversas formações vegetacionais associadas ao clima, a América do Sul possui uma historia evolutiva complexa e difícil de ser recontada. Em revisão sobre os padrões filogeográficos da América do Sul Turchetto-zolet et al. (2013), através da análise de 476 táxons, entre plantas e vertebrados, concluíram que as oscilações climáticas do Pleistoceno em conjunto com os eventos orogênicos do Plioceno/Mioceno contribuíram para moldar a diversidade e a distribuição atual das linhagens modernas tanto nas regiões tropicais quanto nas regiões temperadas deste continente.

2.5 TÁXON ESTUDADO

Libidibia (DC.) Schltdl é um gênero neotropical segregado de *Caesalpinia*, que ocorre principalmente em florestas estacionais secas (Lewis *et al.* 2005). De acordo com a filogenia mais recente do grupo, baseada em cinco regiões plastidiais e uma nuclear, o gênero *Libidibia* forma um grupo monofilético e bem suportado composto por dez táxons distribuídos em sete espécies de árvores e arbustos (Gangnon et al. 2016). Quatro espécies do gênero ocorrem na América do Sul: *L. glabrata* (Kunth) C. Castellanos & G. P. Lewis, que ocorre no Peru e Equador, *L. paraguariensis* (D.Parodi) G.P.Lewis, ocorrente na região do Chaco (Paraguai e Argentina), *L. punctata* (Willd.) Britton, ocorrente na Venezuela e Colômbia, e *L. ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, que ocorre no Brasil. Essas espécies constituíram a flora do Pleistoceno, sendo importantes na análise da hipótese do Arco Pleistocênico (E. Gangnon, com. pessoal). Dessa forma, um estudo filogeográfico com a espécie nos ajudará a entender como se deu o possível processo de expansão e retração das florestas secas da América do Sul.

Em estudo taxonômico, Queiroz (2009) propôs uma nova combinação da única espécie do gênero nativa do Brasil, *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, conhecida popularmente como jucá ou pau-ferro. A espécie ocorre nos domínios da Caatinga e floresta Atlântica em todos os estados do Nordeste, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Lewis 2013). *Libidibia ferrea* é uma espécie autopoliploide (Beltrão & Guerra 1990) que pertence a um grupo de espécies bastante semelhantes entre si com variações extremamente complexas e difíceis de interpretar onde é possível observar a presença de muitos intermediários entre ela e outras espécies. De acordo com estudo realizado por Beltrão & Guerra (1990), essa espécie apresenta indivíduos diploides (2n = 24) e indivíduos tetraploides (2n = 48) e, baseados em características cariotípicas similares, os autores sugeriram ser um caso de autopoliploidia. Além disso apresenta quebra da autoincompatibilidade em indivíduos tetraploides (Borges et al. 2012). A poliploidia encontrada na espécie pode ser a causa da grande variação morfológica existente em *L. ferrea*, sendo encontradas quatro variedades: 1) *Libidibia ferrea* var. *ferrea*, 2) *L. ferrea* var. *glabrescens*, ambas ocorrentes apenas em áreas de Caatinga; 3) *L. ferrea* var. *leiostachya*, restrita à floresta Atlântica do Rio de Janeiro (Rizzini & Mattos-filho 1968) e 4) *L. ferrea* var. *parvifolia*, ocorrendo tanto em áreas de Caatinga como em áreas de floresta Atlântica (Queiroz 2009). Desse modo a Caatinga é a única região onde três das quatro variedades ocorrem. Em estudo recente, Borges *et al.* (2012), analisando populações naturais da espécie presentes em áreas de floresta seca,

encontraram indivíduos diploides encaixando-se na descrição de *L. ferrea* var. *parvifolia*, e indivíduos tetraploides encaixando-se na descrição de *L. ferrea* var. *ferrea* e *L. ferrea* var. *glabrescens*.

3 ARTIGO 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS DE CITÓTIPOS DIPLOIDES E TETRAPLOIDES DA ESPÉCIE ARBÓREA TROPICAL *Libidibia ferrea* (Leguminosae)

Isabelle Fernandes de Albuquerque[1], Emília Arruda[2], Maryanna Dias[1], Lyderson Viccini[3], Andrea Pedrosa Harand[2], Oswaldo Cruz-Neto[2] & Ariadna Valentina Lopes[2]*

[1]Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Recife, Pernambuco, Brasil.
[2]Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Recife, Pernambuco, Brasil. 50372-970
[3]Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Genética, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil,

*Autor para correspondência

RESUMO

A poliploidia é um mecanismo de especiação comum em plantas e de grande importância evolucionária em curto e longo prazo. Como afeta todo o conjunto gênico, as mudanças geradas pela multiplicação genômica podem conferir ao novo citótipo formado capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, além de impulsionar a descoberta de novos nichos ecológicos. Comparadas com alopoliploides, espécies autopoliploides ainda são pouco estudadas. Autopoliploides são frequentemente semelhantes morfologicamente e tradicionalmente mantidos como citotipos dentro de uma mesma espécie. O objetivo geral desse estudo foi investigar a distribuição geográfica, divergência de nicho, e relações taxonômicas entre os citótipos diploides e tetraploides da espécie autopoliploide *Libidibia ferrea*. Foram feitas coletas em indivíduos de populações da espécie ao longo de toda a sua área de ocorrência e o nível de podia foi verificado com citômetro de fluxo. Foi realizada uma análise de modelagem de nicho com os pontos de coleta amostrados. Caracteres anatômicos e de morfometria foram avaliados utilizando protocolos usuais. Coletamos material de indivíduos de todas quatro variedades descritas para a espécie (1) *Libidibia ferrea* var. *ferrea*, 2) *L. ferrea* var. *glabrescens*, 3) *L. ferrea* var. *leiostachya* e 4) *L. ferrea* var. *parvifolia*). Todas as variedades, exceto a *L. ferrea* var. *leiostachya*, apresentaram ambos os níveis de ploidia. Populações diploides e tetraploides de *L. ferrea* apresentaram separação espacial, com uma pequena área de contato. Apesar da segregação, ambos os níveis de ploidia foram encontrados sob condições ambientais semelhantes. Populações diploides se mostraram mais amplamente distribuídas, enquanto populações tetraploides estiveram restritas a uma faixa entre populações diploides. As análises de modelagem indicaram uma contração de nicho nas populações tetraploides. Indivíduos tetraploides apresentaram estômatos significativamente maiores quando comparados aos diploides, além da localização abaixo das células da epiderme, comportamento que otimiza o uso da água em ambientes áridos. Concluímos que as populações tetraploides ocupam áreas antes inabitadas por seus progenitores, que as características morfológicas e anatômicas observadas nos indivíduos tetraplóides podem ter servido como facilitador do seu estabelecimento e que a contração de nicho observada está associada à limitada capacidade de dispersão da espécie e seu longo ciclo de vida. As variedades da espécie não estiveram correlacionadas com o nível de ploidia e o tamanho dos folíolos não é indicativo de nível de ploidia. Dessa forma, não é recomendada elevação de variedades de *L. ferrea* ao nível de espécie uma vez que as variedades e citótipos não possuem

nichos distintos e nem características morfológicas que diferenciem os indivíduos com níveis de ploidia distintos.

Palavras chave: Poliploidia; Duplicação do genoma; autopoliploides; modelagem de nicho; Contração de nicho; Caatinga.

INTRODUÇÃO

A multiplicação do genoma em dois ou mais conjuntos completos de cromossomos, definida como poliploidia, é um mecanismo bastante comum em angiospermas (Ramsey & Schemske 1998). Estimativas recentes apontam que todas as angiospermas passaram por pelo menos um evento de poliploidização ao longo de sua história evolutiva (Jião et al. 2011), entretanto o papel evolucionário desse evento vem sendo alvo de debates recentes (Mayrose et al. 2011; Arrigo & Barker 2012; Soltis et al. 2014)

Duas vertentes são reconhecidas em relação a qual o papel evolucionário da poliploidia, a primeira postula os poliploides como "*Dead ends*" ou "*blind alleys*" evolucionários, onde se acredita que os poliploides tornam-se ineficientes devido aos genes que são mascarados por múltiplas copias. A segunda vertente, coloca a poliploidia como uma rota promissora para o sucesso evolucionário (Soltis et al. 2014), baseando, entre outros fatores, no pressuposto de que, após a formação, os poliploides divergem se deus progenitores em relação a ecologia, geografia ou a combinação dessas propriedades (por exemplo, Fowler e Levin 1984; Levin 1983, 2002). De acordo com o segundo pressuposto, a poliploidia pode ser considerada uma excelente estratégia adaptativa (Reisemberg & Willis 2007). Como afeta todo o conjunto gênico, mudanças bioquímicas, fenotípicas e no desenvolvimento ocorrem em indivíduos poliploides, o que provavelmente confere capacidade de adaptação a novas condições ambientais e impulsiona a ocupação de novos nichos ecológicos (Levin 1983; Ramsey & Schemske 1998).

Dois tipos de poliploides são reconhecidos quanto a sua origem: autopoliploides, quando surgem pela duplicação de um mesmo genoma, ou alopoliploides, quando originados pela duplicação de genomas distintos, normalmente após um evento de hibridização (Stebbins 1971). Indivíduos autopoliploides vêm tradicionalmente sendo considerados raros ou mal adaptados (Stebbins 1950; Grant 1981). Essa lacuna pode ser em decorrência da semelhança morfológica com seus progenitores diploides (Spoelhof et al. 2017). Entretanto, estudos recentes apontam que autopoliploides são mais comuns do que antes se assumia e que a origem sem hibridização pode trazer vantagens evolucionárias (Parisod et al. 2010), devido ao aumento da heterozigozidade, múltiplas copias gênicas e diversidade alélica, o que facilitaria seu estabelecimento e persistência (Parisod et al. 2010; Segraves et al. 1999).

Apesar das vantagens evolucionárias causadas por esse único evento, os novos autopoliploides formados precisam apresentar vantagens competitivas sobre os seus progenitores, para conseguir se estabelecer. Com o intuito de explicar a expansão e o

estabelecimento da linhagem poliploide, dois modelos teóricos vêm sendo amplamente discutidos. O primeiro afirma que a linhagem poliploide surgiu com vantagem competitiva sobre o seus progenitores, excluindo-os e se estabelecendo em áreas anteriormente ocupadas por eles (Fowler and Levin 1984). O mais recente afirma que a linhagem poliploide possui requerimento ambiental distinto de seus progenitores e se estabeleceu em áreas não ocupadas por eles anteriormente (Levin 2000). Essa hipótese foi revisada recentemente por Glennon et al. (2014) que nomeou esse pressuposto como '*niche shift hypothesis'* (NSH).

Dessa forma, muitas espécies poliploides veem sendo encontradas separadas geograficamente da sua progenitora com alguma zona de contato, e essa diferença vem sendo comumente explicada por diferenças ambientais e ou de nicho (Segraves et al. 1999; Parisod & Besnard 2007; Visger et al. 2016). A diferenciação geográfica/nicho, acrescentada ao isolamento reprodutivo entre os dois citótipos, podem colocar os novos poliploides formados como pertencentes a um táxon diferente e independente de seu progenitor, entretanto, sobretudo para espécies autopoliploides, essas características devem vir acompanhadas de diferenciação morfológica, sendo esta um critério chave para a separação (Soltis et al. 2007).

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz é uma espécie autopoliploide (Beltrão & Guerra 1990) que pertence a um grupo de espécies bastante semelhantes entre si com variações extremamente complexas e difíceis de interpretar onde é possível observar a presença de muitos intermediários entre ela e outras espécies. O gênero *Libidibia* forma um grupo composto por dez táxons distribuídos em sete espécies de árvores e arbustos (Gangnon et al. 2016). A espécie *L. ferrea* é a única espécie do gênero nativa do Brasil, conhecida popularmente como jucá ou pau-ferro. Ocorre nos domínios da Caatinga e floresta Atlântica em todos os estados do Nordeste, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Queiroz 2009). Apresenta indivíduos diploides (2n = 24) e indivíduos tetraploides (2n = 48) (Beltrão & Guerra 1990), sendo encontradas quatro variedades: 1) *Libidibia ferrea* var. *ferrea*, 2) *L. ferrea* var. *glabrescens*, 3) *L. ferrea* var. *leiostachya* e 4) *L. ferrea* var. *parvifolia.* Para a diferenciação morfológica entre as variedades os principais critérios adotados por Queiroz (2009) são sutis e baseados no tamanho dos folíolos e a presença ou ausência de pelos, também no cálice (Tabela 1). Acredita-se que a poliploidia encontrada na espécie pode ser a causa da grande variação morfológica existente. Em estudo reprodutivo com três variedades da espécie Borges et al. (2012) encontraram isolamento reprodutivo entre os dois citótipos de *L. ferrea* com as variedades *L. ferrea* var. *glabrescens* e *L. ferrea* var. *ferrea* sendo encontradas exclusivamente com nível de ploidia tetraploide, e a *L. ferrea* var. *parvifolia*

encontrada exclusivamente como diploide, sugerindo alguma relação entre as variedades e diferentes níveis de ploidia. Além disso, a *L. ferrea* var. *parvifolia*, de acordo com a ultima classificação taxonômica, apresenta folíolos menores que as outras duas variedades analisadas – exclusivamente tetraploides - , o que pode sugerir relação entre o nível de ploidia e essa característica morfológica.

Mediante o exposto, nos conduzimos esse trabalho a fim de responder as seguintes questões: (1) A distribuição dos citótipos diploides e tetraploides da espécie *Libidibia ferrea* pode ser explicada por diferenças de nicho? (2) As variedades da espécie estão relacionadas a um determinado nível de ploidia? (3) Caracteres morfológicos distintos estão associados ao ambiente de ocorrência ou ao nível de ploidia encontrado nos indivíduos? (4) Com base em resultados de distribuição geográfica e morfologia, podemos classificar os poliploides como uma nova espécie?

METODOLOGIA

Amostragem

Para a seleção das áreas amostradas, foi realizado um levantamento dos exemplares de *Libidibia ferrea* disponíveis em plataformas online - SpeciesLink, Reflora e Jabot. Após o levantamento, herbários com maior representatividade de vouchers da espécie foram visitados. Na ocasião da visita, os vouchers foram confirmados e áreas com comprovada ocorrência ao longo de toda a zona de distribuição da espécie foram selecionados para a coleta. Para a seleção das áreas, também levou-se em consideração as variedades presentes, afim de amostrar todas as variedades da espécie. Para cada área amostrada, material foliar de 20 indivíduos, ou da quantidade de indivíduos encontrada, foi coletado e armazenado em sílica gel para secagem e posterior análise ao citômetro de fluxo.

Determinação do nível de ploidia

O nível de ploidia de todos os indivíduos coletados foi mensurado utilizando folhas armazenadas em sílica gel, através da citometria de fluxo. Uma suspensão de núcleos foi preparada numa placa de Petri, o material foi retalhado manualmente, adicionado 750 µl de tampão WPB e em seguida, filtrado em uma tela de nylon de 20 µm para um tubo de citometria. Após esse procedimento, a suspensão foi corada com 20 µl de iodeto de propídio (1mg/mL) de acordo com a metodologia usual descrita por Loureiro *et al.* (2007). Após esse procedimento, as amostras foram levadas ao citômetro CyFlow SL flow (Partec, Görlitz,

Germany), onde tiveram seu nível de ploidia estimado. O equipamento foi cuidadosamente calibrado e alinhado com o auxílio de microbeads de acordo com as recomendações do fabricante. Após testes individuais, fragmentos de folhas de tamanho semelhante, de cinco indivíduos presentes na mesma localidade, foram macerados e analisados em conjunto. Em caso de resultado duvidoso, as amostras foram reanalisadas individualmente. A espécie controle utilizada foi *Zea mays "CE-777"* (2C = 5.43 pg). O tamanho médio do genoma nuclear da amostra foi mensurado em picogramas (pg) por meio da análise dos histogramas com ferramentas do *softwar* FlowMax® (Partec®).

Modelagem de nicho

A fim de verificar se existe diferenciação de nicho entre os citótipos diploides e tetraploides da espécie *Libidibia ferrea*, uma análise de modelagem de nicho foi rodada para o conjunto total de populações, individualmente para populações diploides e individualmente para populações tetraploides. A descrição das características climáticas atuais foi baseada nos dados de modelagem ecológica do Worldclim 2.0 para o período de 1970-2000 (Fick e Hijmans 2017). Utilizamos inicialmente o pacote de 19 variáveis bioclimáticas para período atual, as quais são derivadas dos valores mensais médios de temperatura e precipitação e, portanto, representam grande relevância biológica para simulações de distribuições de espécies (Hijmans et al. 2005).

Selecionamos camadas bioclimáticas com grids de resolução de 30-arc segundo (~1 km^2) para o período atual. As camadas de dados contendo as variáveis bioclimáticas foram cortadas de forma a abranger toda a extensão da América do Sul uma vez que a espécie *L. ferrea* não ocorre naturalmente em outros continentes. A utilização de pacotes climáticos com resolução espacial em fina escala apresenta uma maior congruência para espécies de plantas com distribuição restrita (Franklin et al. 2012).

Após o corte das camadas bioclimáticas, realizamos testes de correlação com o objetivo de excluir variáveis bioclimáticas correlacionadas ($r > 0,9$). A exclusão das variáveis correlacionadas possibilita a construção de modelos a partir das características bioclimáticas com maior relevância biológica para o conjunto de espécies na região e nos períodos analisados. No total, dez variáveis bioclimáticas foram mantidas neste trabalho, sendo elas: (1) isoterma (b3); (2) variação de temperatura anual (b7); (3) temperatura média do trimestre mais chuvoso (b8); (4) temperatura média do trimestre mais chuvoso (b9); (5)temperatura média do trimestre mais quente (b10); temperatura média do trimestre mais frio (b11);

precipitação anual (b12); precipitação do mês mais chuvoso (b13); precipitação do mês mais quente (b14) e precipitação do trimestre mais chuvoso (b16).

Foi implementado um algoritmo baseado no método da máxima entropia para predizer as áreas de maior probabilidade de ocorrência da espécie *Libidibia ferrea* em diferentes níveis de ploidia, usando o programa Maxent ver. 3.3 (Phillips et al. 2006). O método da máxima entropia implementado no Maxent é adequado para dados baseados apenas em presença, como é o caso dos pontos amostrados no presente estudo. Adicionalmente, o Maxent possui melhor desempenho quando comparado a outros programas relacionados à modelagem de distribuição de espécies e, quando se trata de dados de distribuição baseados apenas na presença de espécies (Elith et al. 2006, 2011).

Os dados de distribuição de cada ploidia da espécie foram divididos em um grupo de treino (75% dos pontos de ocorrência) e um grupo de teste ou de validação (25% dos pontos de ocorrência) para calibrar, otimizar e avaliar a qualidade dos modelos gerados. Utilizamos o índice AUC, área sob a curva característica do operador (ROC), como uma medida da capacidade de um modelo de discriminar os locais de presença e ausência das espécies, para estimar a qualidade do modelo. Os valores de AUC variam entre 0 e 1. Modelos mais ajustados aos dados apresentam AUC mais próximo de 1. Adicionalmente, utilizamos os valores de "ganho" para estimar a proximidade entre os modelos gerados e os pontos de presença da espécie para cada citótipo analisado. Valores mais altos de "ganho" indicam maior proximidade entre os modelos e os pontos amostrados (Phillips et al. 2006). Com base nos cenários gerados pelas modelagens, foram construídos mapas indicando áreas com diferentes probabilidades de ocorrência dos citótipos de *Libidibia ferrea*. Todos os resultados das modelagens foram visualizados e editados no programa ARCGIS 10.0 (ESRI 2010).

Análises estomáticas e morfometria foliar

Para as análises estomáticas, foram selecionadas oito populações de *Libidibia ferrea* localizadas em condições ambientais distintas e com diferentes níveis de ploidia. As tetraploides de código SEC, ALP, BAE e PBA, todas situadas em área de Caatinga e as diploides PBMA, localizada em Restinga, CEC localizada em área de Caatinga e, ESL e PBM, situadas em áreas de floresta Atlântica. Para cada população amostrada, cinco indivíduos foram selecionados para as dissociações epidérmicas, cinco folíolos por indivíduo. Em adição, foi mensurado o tamanho de 100 folíolos por população – altura e comprimento

do limbo - de pelo menos 3 folhas de 5 indivíduos distintos. Essas últimas medidas foram tomadas com auxílio de paquímetro digital.

Para as análises estomáticas – morfometria, caracterização e visualização dos estômatos - a técnica de dissociação epidérmica foi utilizada (Kraus & Arduin 1997). As amostras, coletadas em sílica, foram reidratadas em placas de petri ou frascos bem vedados onde foram mantidas em água destilada pelo período de 24 h. Após a hidratação, foram imersas na solução de água sanitária 50% e levadas a estufa à 41°C por 12 h. Após esse período, o material foi lavado com água destilada, para a completa remoção da solução de dissociação. Em seguida, as amostras foram coradas com safranina 50% e montadas em lâminas semi-permanentes com glicerina 50% (Purvis et al. 1964). Feito esse processo, as lâminas foram analisadas ao fotomicroscópio modelo Leica DM500 utilizando o software IM50. Os estômatos foram medidos no diâmetro polar, equatorial e tomadas medidas das células guarda. Foram tomadas 20 medidas de três indivíduos distintos. As medidas foram realizadas utilizando o software ImageJ.

Análises anatômicas

Para as análises anatômicas foram selecionadas oito populações da espécie localizadas em diferentes condições ambientais e de nível de ploidia distintos. Sendo as tetraploides de código BAE, SEC, ALP e PBA, todas localizadas em área de Caatinga, e as diploides de código ESL e RJ, localizadas em área de floresta Atlântica e, CEC e MG, ambas situadas de área de Caatinga. Para cada localidade amostrada três folíolos de três indivíduos distintos foram analisados. Todos os folíolos analisados foram coletados na região mediana das folhas, a partir do terceiro nó, que estavam completamente expandidas.

Para as analises foi utilizado material foliar previamente coletado em sílica, que foi reidratado, fixado em FAA 50 e preservado em etanol 70% (Johansen 1940). As amostras foram submetidas a série etanol-butanol terciário (50% a 100%) com trocas a cada hora, sendo transferidas ao butanol puro (*overnight*) (Johansen 1940). Após essa etapa foi realizada infiltração e inclusão em parafina em série butanol-parafina (3:1, 1:1, 1:3), sendo posteriormente transferidas à parafina pura sendo efetuadas mais 2-3 trocas (Kraus & Arduin 1997). O material incluído foi então seccionado em micrótomo rotativo (LUPETEC MRV9), com espessura entre 12 µm e 14 µm. Os cortes obtidos foram corados em dupla coloração composta por azul de Alcian e safranina, seguindo o protocolo modificado de Bukatsch (1972) e montados sobre lâminas de modo permanente com bálsamo do Canadá. A análise das

estruturas anatômicas foi realizada em microscópio de óptico Leica DM500 com câmara acoplada e o registro dos principais caracteres foi efetuado com auxílio do software Leica DM50.

Análise dos dados

Para verificar diferenças no tamanho dos estômatos entre os diferentes níveis de ploidia, bem como nas faces abaxial e adaxial foi utilizado o teste-T. Para a análise do tamanho dos estômatos entre as populações foi utilizada uma ANOVA – com o teste de Tukey a *posteriori*. Em caso de dados não paramétricos utilizou-se o teste de Kruskal Wallis, com o teste de Dunn a *posteriori*. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Bioestat.

RESULTADOS

Distribuição dos citótipos

Do total de 226 indivíduos de *Libidibia ferrea* analisados ao citômetro de fluxo, 41% apresentaram nível de ploidia tetraploide e 59% apresentaram-se como diploide. Não foi detectada a presença de indivíduos triploides. Os indivíduos diploides apresentaram cerca de 2,0 pg de DNA, enquanto os indivíduos tetraploides apresentaram cerca de 4,0 pg de DNA.

Do conjunto das populações analisadas, seis apresentaram indivíduos exclusivamente tetraploides, nove apresentaram indivíduos exclusivamente diploides e duas foram mistas – com indivíduos dos dois níveis de ploidia presentes na mesma área (Figura 1). Nas populações mistas encontradas, os indivíduos diploides estivem presentes sempre em maior número, representando 77% dos indivíduos na população PEC e 70% dos indivíduos presentes na população mista PEA. No que se refere a distribuição das populações ao longo da área de ocorrência da espécie, populações diploides, além de em maior número, estiveram mais amplamente distribuídas, com populações ocorrendo tanto mais ao norte, como ao sul (Figura 1). Entretanto, populações diploides não foram encontradas na região central, entre as regiões norte e sul, onde indivíduos diploides estiveram presentes apenas dentro de populações mistas. Em contrapartida, populações tetraploides e mistas estiveram restritas a uma estreita faixa central, em áreas de floresta seca – Caatinga – enquanto as populações diploides estiveram presentes tanto em áreas de floresta seca, como floresta úmida – Caatinga, Restinga, floresta estacional semi-decidual e floresta Atlântica.

Modelagem de nicho ecológico

O nicho ecológico de *Libidibia ferrea*, com base nas variáveis climáticas simuladas na América do Sul, variou substancialmente em extensão e distribuição a depender do nível de ploidia analisado. Ao analisar para o conjunto total de populações, observamos uma concentração das áreas com elevada probabilidade de ocorrência na região nordeste e leste do Brasil (Figura 3), que coincide com a distribuição atual da espécie. O nicho do citótipo diploide se mostrou mais amplo quando comparado ao nicho do citótipo tetraploide. Especificamente, enquanto áreas com elevada probabilidade de ocorrência do citótipo tetraploide se concentram na região leste e norte da Caatinga no Brasil, as áreas com elevada probabilidade de ocorrência do citótipo diploide ocorrem em toda a extensão da Caatinga, na porção norte do Cerrado e na região central e norte da floresta Atlântica (Figura 3).

Nível de podia das variedades

Foram coletadas todas as variedades da espécie de acordo com a classificação mais recente proposta por Queiroz (2009). Alguns indivíduos coletados possuíam características intermediárias (ex. folíolos grandes e glabros, com presença de pelos no cálice) entre as variedades, estes não puderam ser identificados quanto a variedade a que pertenciam. Dentre o conjunto de indivíduos identificados, a *Libidibia ferrea* var. *ferrea* apresentou o maior percentual de indivíduos com 41.6%, seguido da *L. ferrea* var. *glabrescens* com 26.7% , *L. ferrea* var. *parvifolia* com 22.7% e por fim, a *L. ferrea* var. *leiostachya* com 9% do total de indivíduos amostrados.

Com exceção da *Libidibia ferrea* var. *leiostachya*, que apresentou nível de ploidia exclusivamente diploide, todas as demais variedades apresentaram ambos os níveis de ploidia. A variedade *L. ferrea* var. *ferrea*, foi encontrada exclusivamente na Caatinga, enquanto as variedades *L. ferrea* var. *glabrescens* e *L. ferrea* var. *parvifolia* foram encontradas sob os domínios da Caatinga e floresta Atlântica. Foi observada sobreposição de áreas de ocorrência dentro das variedades. As variedades *L. ferrea* var. *ferrea*, *L. ferrea* var. *glabrescens* e *L. ferrea* var. *parvifolia* coocorrem na população BAE, de área de Caatinga, enquanto as variedades *L. ferrea* var. *ferrea* e *L. ferrea* var. *glabrescens* coocorrem na população SEC, PBA, PEP e PBA. Também foram encontradas na mesma área de ocorrência as variedades *L. ferrea* var. *glabrescens* e *L. ferrea* var. *parvifolia*

Estômatos e morfometria foliar

Quando analisados em conjunto, indivíduos de populações tetraploides apresentaram dimensões da célula guarda e estômato total significativamente maiores, nas duas faces foliares, para todos os parâmetros analisados (Tabela 3) (Figura 2). De maneira geral, quando analisados separadamente, indivíduos da população diploide de Caucaia, localizada em área de Caatinga, apresentaram as maiores dimensões estomáticas dentre as populações diploides, mas nunca maior que indivíduos tetraploides. No que se refere aos parâmetros foliares, as populações diploides e tetraploides não apresentaram diferenças significativas quando a altura e largura dos folíolos ($p > 0.05$).

Anatomia foliar

De forma geral, os dois níveis de ploidia analisados apresentaram conformação anatômica semelhante, com a presença de epiderme unisseriada, tricomas, mesofilo do tipo dorsiventral e feixe colateral aberto.

A epiderme, além de unissseriada, se mostrou lisa na face adaxial e ondulada na face abaxial da folha. Variações dessa conformação puderam ser observadas em algumas populações, com as duas faces da folha apresentando ondulações na epiderme. Foi encontrada epiderme multiseriada apenas nas populações BAE e ESL, respectivamente tetraploide e diploide. Quando comparado a outros indivíduos a cutícula mostrou-se mais espessa na face superior da folha nos indivíduos presentes na população de código CEC, diploide, localizada em área de restinga. Os estômatos estiveram em sua maioria presentes ao mesmo nível das demais células da epiderme, exceto em três das quatro populações tetraploides analisadas: SEC, ALP e PBA, todas localizadas em área de Caatinga, onde eles se apresentaram abaixo das demais células da epiderme, condição que minimiza a perda de água.

A maioria dos cortes transversais mostraram estômatos apenas na face adaxial da folha, classificando-a como hipoestomática. Durante a tomada das medidas estomáticas foi observado que os estômatos se encontram em baixa densidade na face abaxial e muitas vezes, localizados em regiões restritas. Apenas nos indivíduos da população MG, foi possível observar estômatos nas duas faces foliares. Foi detectada a presença de tricomas exclusivamente na face abaxial ou nas duas faces da epiderme foliar, do tipo estrelado, tector e grandular uni e multicelulares. A população diplóide ESL, apresentou exclusiva presença do tricoma estrelado. Como já esperado devido a classificação taxonômica da espécie, em todas as populações analisadas, independente do nível de ploidia encontrado, indivíduos da

variedade *L. ferrea* var. *glabrescens* se caracterizavam pela rara presença ou ausência de tricomas. Esse comportamento foi observado, inclusive na população tetraploide SEC, onde as variedades *L. ferrea* var. *ferrea* e *L. ferrea* var. *glabrescens* ocorrem juntas em simpatria, as diferenças foram claras; enquanto a variedade *L. ferrea* var. *ferrea* apresentou tricomas tectores uni e multicelulares, em ambas as faces e bem frequentes, a *L. ferrea* var. *glabrescens* apresentou poucos tricomas tectores apenas na face abaxial.

Foi observado o mesofilo do tipo dorsiventral em todas as populações analisadas. Como variação, quase a totalidade das populações tetraploides analisadas, PBA, ALP e SEC, tetraploides e a diploide ESL apresentaram também o mesofilo isobilateral em alguns dos indivíduos analisados. De forma geral ambos os parênquimas paliçádico e lacunoso apresentaram de 1 a 3 estratos, podendo ser frouxo ou com suas células bem compactadas (Figura 4a e 4b). Foi possível observar ainda a frequente presença de drusas no mesofilo e em alguns casos próximos a nervura central.

Os indivíduos apresentaram feixe colateral aberto, envolvidos por uma bainha pericíclica multisseriada, continua ou descontinua. Os três indivíduos tetraploides analisados da população ALP, apresentaram variação no tipo do feixe. Encontrou-se feixe colateral aberto, fechado ou bicolateral. Todos com as células da bainha pericíclica bem lignificadas, condição que fornece maior sustentação e proteção ao feixe principal. Em relação aos feixes secundários, de modo geral apresentaram pequeno porte, podendo ter diferentes calibres com a distância entre eles aparentemente variando. A população diploide CEC apresentou feixes bastante desenvolvidos, ocupando quase toda a nervura principal (Figura 4a - D). Em duas populações, a diploide RJ e a tetraploide ALP, foi possível observar a endoderme com células muito desenvolvidas ao redor do feixe a semelhança da bainha Kranz, características de plantas com mecanismo C4.

DISCUSSÃO

As populações da espécie *Libidibia ferrea* apresentaram separação geográfica ao longo de sua área de ocorrência, com populações exclusivamente diploides, exclusivamente tetraploides e uma pequena área de coocorrencia. As populações diploides, além de encontradas em maior número, estiveram presentes em mais de um domínio fitogeográfico e mais amplamente distribuídas quando comparadas as tetraploides e mistas, que estivem presentes exclusivamente numa faixa restrita entre as populações diploides. Esse comportamento pôde ser confirmado através da modelagem de nicho, que apontou o nicho

mais amplo em populações diploides quando comparadas a tetraploides, e este ultimo se mostrou sobreposto ao diploide. Apesar disso, os caracteres morfológicos analisados apontam para uma maior adaptação dos indivíduos tetraploides a condições de pouca disponibilidade hídrica. Por fim, com base na classificação atual, as variedades da espécie não apresentaram relação com ao nível de ploidia, sendo difícil estimar o nível de ploidia através da análise dos caracteres morfológicos, o que no nosso entendimento, trata-se de uma espécie críptica.

Distribuição geográfica

Nossos dados mostram que as populações tetraploides da espécie *Libidibia ferrea* tem distribuição geográfica diferente dos seus progenitores. As populações diploides ocorrem tanto mais ao norte, como mais ao sul da distribuição, enquanto as populações tetraploides e mistas ocorrem numa faixa entre as populações diploides. Essa distribuição seguiu o padrão semelhante ao observado na literatura, onde as populações apresentam citotipos exclusivamente diploides, tetraploides e zonas de coocorrência (Husband & Schemske 1998; Petit *et al.* 1999). Essas diferenças na distribuição de espécies autopoliploides podem ser explicadas por requerimentos ambientais distintos, tais como disponibilidade hídrica e diferenças de temperatura nos locais de ocorrência, como o caso das espécies *Senecio carniolicus* (Winkler et al., 2017) e *Tolmiea menziesii* (Visger et al., 2016). Apesar da separação geográfica, as condições ambientais encontradas nas populações tetraploides de *L. ferrea* são idênticas às encontradas para algumas populações diploides, que também ocorrem sob domínios de floresta seca, sob as mesmas condições de estresse hídrico, luminosidade e temperatura. Esse comportamento nos faz hipotetizar que as novas populações tetraploides formadas ocupam locais antes inabitados por seus progenitores (Levin 2000), onde a competição é menor e o estabelecimento facilitado. Indicando que a novidade ecológica pode não ser determinante para explicar a distribuição da espécie.

Apesar da presença de zonas mistas, onde os dois citótipos ocorrem em simpatria, a presença de indivíduos triploides não foi registrada. A presença de triploides, sobretudo nessas zonas de contato, são bastante comuns em espécies autopoliploides (Sonnleitner *et al*. 2010; Servick *et al.* 2015), inclusive em alta frequência (Burton & Husband 1999). A principal via da formação dos poliploides é através da união de dois gametas não reduzidos (Ramsey & Schemske, 1998), dando origem ao tetraploide, ou através da união de um gameta não reduzido com outro reduzido, originando o triploide. Os zigotos triploides, na maioria das vezes são inviáveis ou se tornam indivíduos estéreis, sendo esse cruzamento uma

desvantagem reprodutiva, pois geram menor sucesso. O modelo proposto por Levin, denominado “Exclusão do Citótipo em Minoria” ("Minority Cytotype Exclusion"), assume que a alta formação desses indivíduos pode levar à exclusão do citótipo que estiver em minoria na população – tetraploide para o caso da espécie estudada. Como a espécie *Libidibia ferrea* apresenta incompatibilidade nos cruzamentos interploidia (Borges *et al.* 2012) e de acordo com nossos dados não produz indivíduos triploides em nenhuma das populações analisadas, esse comportamento pode ser crucial para a manutenção das zonas mistas da espécie.

Modelagem de nicho

A modelagem mostrou que o nicho das populações diploides de *Libidibia ferrea* apresentaram maior extensão e amplitude quando comparada ao nicho das populações tetraploides. Populações tetraploides apresentaram nicho mais restrito e em sobreposição com as populações diploides. Assim, fica evidente que as populações tetraploides apresentaram uma contração de nicho. Padrão semelhante vem sendo catalogado na literatura. Em revisão recente Glennon et al. (2014)**,** analisando um conjunto de 20 espécies autopoliploides e alopoliploides da América do norte e Europa, encontraram grande proporção de poliploides com contração de nicho, representando 40% do total das espécies analisadas**.** As espécies que evidenciaram contração de nicho, geralmente exibiam mecanismos de dispersão de curto alcance (14 vs. 2 espécies), diferente das que apresentação expansão do nicho, estas apresentaram mecanismos de dispersão pelo vento e animais. De forma semelhante aos resultados obtidos nesse estudo, a espécie *L. ferrea* apresenta o mecanismo de dispersão de curto alcance por peso/gravidade, a barocoria (Griz & Machado, 2001). Além disso, trata-se de uma espécie arbórea e de ciclo de vida longo, sendo assim hipotetizamos que essas características de histórico de vida da espécie contribuíram para a contração de nicho em populações tetraploides.

Variedades e nível de ploidia

De acordo com a classificação taxonômica mais recente da espécie proposta por Queiroz (2005), *Libidibia ferrea* encontra-se subdividida em quatro variedades, sendo elas *Libidibia ferrea* var. *ferrea, L. ferrea* var. *glabrescens*, *L. ferrea* var. *leiostachya* e *L. ferrea* var. *parvifolia.* Essa classificação é baseada em caracteres morfológicos, sobretudo tamanho dos folíolos, e no bioma de ocorrência. As variedades *L. ferrea* var. *glabrescens* e *L. ferrea*

var. *ferrea* aparecem como exclusivas de área de Caatinga enquanto a *L. ferrea* var. *parvifolia* pode ocorrer tanto em áreas de floresta seca, como em áreas de floresta Atlântica. Em estudo recente Borges et al., 2012, analisando indivíduos exclusivamente de áreas de Caatinga, encontraram as variedades *L. ferrea* var. *glabrescens* e *L. ferrea* var. *ferrea* ocorrendo apenas com indivíduos tetraploides, enquanto a *L. ferrea* var. *parvifolia* esteve representada apenas por indivíduos diploides, sugerindo que essa atual divisão taxonômica poderia estar relacionada a poliploidia existente dentro da espécie. Nossos achados não corroboram os resultados encontrados por Borges et al. (2012) onde, com exceção da *L. ferrea* var. *leiostachya*, encontrada apenas com indivíduos diploides, as demais variedades da espécie apresentaram indivíduos diploides e tetraploides, além de ocorrer simpatricamente. *L. ferrea* apresenta uma taxonomia bastante complexa e com bastante variações e intermediários entre elas. Lewis (1987) se refere aos indivíduos de *L. ferrea* ocorrentes no estado do Ceará como representantes de variedade *cearensis*, de acordo com nossos resultados isso seria bastante viável, uma vez que todos os indivíduos da variedades, *L. ferrea* var. *glabrescens* e *L. ferrea* var. *ferrea*, ocorrentes nessa região são diploides, e contrapartida com os da região central, que são tetraploides. Dessa forma, torna-se evidente a necessidade de uma revisão taxonômica para a espécie, incluindo novos dados de ploidia e distribuição.

Embora *Libidibia ferrea* possua isolamento reprodutivo entre os citotipos, os caracteres morfológicos, ecológicos e geográficos são sobrepostos. De acordo com a revisão realizada por Soltis *et al* 2007, para classificar os novos poliploides formados em uma espécie distinta dos seus progenitores, eles deveriam, além de obedecer ao conceito biológico de espécie, ter características morfológicas e ocupar nichos distintos. A espécie estudada esta em concordância com apenas um dos preceitos dessa classificação, o que torna inviável em termos práticos classifica-la como uma nova espécie. De forma geral a morfologia é um critério altamente relevante, pois caracteres morfológicos podem ser usados com praticidade em campo, e em laboratório com chaves de identificação, sendo uma ferramenta crucial para outras disciplinas que envolvem a identificação botânica, como a agronomia.

Modificações morfológicas

Modificações anatômicas que possibilitam a sobrevivência de plantas em locais áridos puderam ser observadas em todas as populações tetraploides analisadas até o momento, sobretudo na epiderme, com o aumento do tamanho das células guarda e sua localização abaixo das células da epiderme em indivíduos tetraploides. O aumento do tamanho da célula

guarda vem sendo correlacionado repedidas vezes com o aumento do tamanho do genoma (Beaulieu et al., 2008), sendo, no passado, considerado como um indicativo de poliploidia (Masterson, 1994). Alterações no tamanho estomático influenciam a sua abertura e a dinâmica de água, como exemplo a espécie arbórea *Betula papyrifera*, que apresentou menores taxas de transpiração, maior retenção de água (pressão de tugor) e manutenção das taxas fotossintéticas mesmo sob condições de estresse hídrico em indivíduos poliploides (Li et al., 1996). Os autores argumentam que essas modificações proporcionaram a mencionada espécie condições para habitar locais áridos, onde seus progenitores não são encontrados. Para a espécie *L. ferrea*, como discutido anteriormente, foi encontrada separação geográfica entre os citótipos, com uma pequena área de coocorrência, entretanto os nichos e condições climáticas se sobrepõe. Entretanto fica evidente a adaptação dos autopoliploides a condições áridas. O que nos leva a acreditar que a poliploidia contribuiu para o estabelecimento a longo prazo dessas populações de Caatinga através desses tipos de adaptações morfológicas.

CONCLUSÕES

No que se refere a distribuição de *Libidibia ferrea*, concluímos que as populações tetraploides ocupam áreas antes inabitadas por seus progenitores, uma vez que as populações diploides se apresentaram amplamente distribuídas e sob os mesmos domínios fitogeográficos das poliploides. Esse mecanismo diminuiria a competição com seus progenitores, facilitando seu estabelecimento. A contração do nicho encontrada para as populações tetraploides corroboram esse fato e além disso, são associadas ao limitado potencial de dispersão da espécie e longo ciclo de vida. As principais modificações anatômicas encontradas referem-se ao tamanho e localização dos estômatos na epiderme, condição que otimiza o uso da água em ambientes áridos, o que pode ter servido como facilitador no estabelecimento dos novos poliploides formados. As variedades da espécie não estiveram correlacionadas com o nível de ploidia e o tamanho dos folíolos não é indicativo de nível de ploidia, como antes predizemos. Dessa forma, não seria o caso de classificar a espécie *L. ferrea*, uma vez que, não possuem nichos distintos e nem características morfológicas que diferencie os indivíduos com níveis de ploidia distintos.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFPE e à CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e doutorado sanduiche/PDSE.

REFERÊNCIAS

Abbott R (2008) The Origin, Expansion and Demise of Plant Species. Donald A. Levin. Oxford University Press, Oxford. 2000. pp. 230. Price £24.95, paperback. ISBN 0 19 512729 3. Heredity 87:125–125. doi: 10.1111/j.1365-2540.2001.0962a.pp.x

Arrigo N, Barker MS (2012) Rarely successful polyploids and their legacy in plant genomes. Curr Opin Plant Biol 15:140–146. doi: 10.1016/j.pbi.2012.03.010

Beaulieu JM, Leitch IJ, Patel S, et al (2008) Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. New Phytol 179:975–986. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02528.x

Borges LA, Souza LGR, Guerra M, et al (2012) Reproductive isolation between diploid and tetraploid cytotypes of Libidibiaferrea (= Caesalpinia ferrea) (Leguminosae): ecological and taxonomic implications. Plant Syst Evol 298:1371–1381. doi: 10.1007/s00606-012-0643-3

Bukatsch F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Microkosmos** 61: 255.

D.a.johansen (1940) Plant Microtechnique

Elith J, H. Graham C, P. Anderson R, et al (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. Ecography 29:129–151. doi: 10.1111/j.2006.0906-7590.04596.x

Elith J, Phillips SJ, Hastie T, et al (2011) A statistical explanation of MaxEnt for ecologists: Statistical explanation of MaxEnt. Diversity and Distributions 17:43–57. doi: 10.1111/j.1472-4642.2010.00725.x

ESRI (2010), ArcGIS Desktop, Release 10. Redlands, CA: Environmental Systems Research Institute.

Fick SE, Hijmans RJ (2017) WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. International Journal of Climatology 37:4302–4315. doi: 10.1002/joc.5086

Fowler NL, Levin DA (1984) Ecological Constraints on the Establishment of a Novel Polyploid in Competition with Its Diploid Progenitor. The American Naturalist 124:703–711

Franklin J, Davis FW, Ikegami M, et al (2013) Modeling plant species distributions under future climates: how fine scale do climate projections need to be? Global Change Biology 19:473–483. doi: 10.1111/gcb.12051

Glennon KL, Ritchie ME, Segraves KA (2014) Evidence for shared broad-scale climatic niches of diploid and polyploid plants. Ecology Letters 17:574–582. doi: 10.1111/ele.12259

Griz LMS, Machado ICS (2001) Fruiting phenology and seed dispersal syndromes in Caatinga, a tropical dry forest in the northeast of Brazil. Journal of Tropical Ecology 17:303–321. doi: 10.1017/S0266467401001201

Hülber K, Sonnleitner M, Suda J, et al (2015a) Ecological differentiation, lack of hybrids involving diploids, and asymmetric gene flow between polyploids in narrow contact zones of *Senecio carniolicus* (syn. *Jacobaea carniolica* , Asteraceae). Ecology and Evolution 5:1224–1234. doi: 10.1002/ece3.1430

Hülber K, Sonnleitner M, Suda J, et al (2015b) Ecological differentiation, lack of hybrids involving diploids, and asymmetric gene flow between polyploids in narrow contact zones of *Senecio carniolicus* (syn. *Jacobaea carniolica* , Asteraceae). Ecology and Evolution 5:1224–1234. doi: 10.1002/ece3.1430

Husband BC, Schemske DW (1998) Cytotype distribution at a diploid–tetraploid contact zone in Chamerion (Epilobium) angustifolium (Onagraceae). American Journal of Botany 85:1688–1694. doi: 10.2307/2446502

Jiao Y, Wickett NJ, Ayyampalayam S, et al (2011) Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. Nature 473:97–100. doi: 10.1038/nature09916

Kraus J.; Arduin, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. EDUR, Rio de Janeiro, 1997.

Levin D. (1983) Polyploidy and novelty in flowering plants. The American Naturalist

Levin DA (2002) <i>The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution. Systematic Botany 29:460–461. doi: 10.1600/036364404774195656

Li W-L, Berlyn GP, Ashton PMS (1996) Polyploids and their structural and physiological characteristics relative to water deficit in *betula papyrifera* (betulaceae). American Journal of Botany 83:15–20. doi: 10.1002/j.1537-2197.1996.tb13869.x

Liu B, Brubaker CL, Mergeai G, et al (2001) Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. Genome 44:321–330. doi: 10.1139/g01-011

Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C (2007) Two New Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species. Ann Bot 100:875–888. doi: 10.1093/aob/mcm152

Maherali H, Walden AE, Husband BC (2009) Genome duplication and the evolution of physiological responses to water stress. New Phytologist 184:721–731. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02997.x

Masterson J (1994) Stomatal Size in Fossil Plants: Evidence for Polyploidy in Majority of Angiosperms | Science. http://science.sciencemag.org/content/264/5157/421. Accessed 8 Feb 2019

Mayrose I, Zhan SH, Rothfels CJ, et al (2011) Recently formed polyploid plants diversify at lower rates. Science 333:1257. doi: 10.1126/science.1207205

Müntzing A (2010) The Evolutionary Significance of Autopolyploidy. Hereditas 21:363–378. doi: 10.1111/j.1601-5223.1936.tb03204.x

Parisod C, Besnard G (2007) Glacial in situ survival in the Western Alps and polytopic autopolyploidy in Biscutella laevigata L. (Brassicaceae). Molecular Ecology 16:2755–2767. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03315.x

Petit null, Bretagnolle null, Felber null (1999) Evolutionary consequences of diploid-polyploid hybrid zones in wild species. Trends Ecol Evol (Amst) 14:306–311

Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. Ecological Modelling 190:231–259. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026

Purvis M, Coller D, Walls D (1964) Laboratory techniques in botany. Butterworths, London.

Queiroz L. (2009) Leguminosas da Caatinga. Editora da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Ramsey J, Schemske DW (1998) pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. Annual Review of Ecology and Systematics 29:467–501. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.29.1.467

Rieseberg LH, Willis JH (2007) Plant Speciation. Science 317:910–914. doi: 10.1126/science.1137729

Segraves KA, Thompson JN, Soltis PS, Soltis DE (1999) Multiple origins of polyploidy and the geographic structure of *Heuchera grossulariifolia*. Molecular Ecology 8:253–262. doi: 10.1046/j.1365-294X.1999.00562.x

Servick S, Visger CJ, Gitzendanner MA, et al (2015) Population genetic variation, geographic structure, and multiple origins of autopolyploidy in Galax urceolata. American Journal of Botany 102:973–982. doi: 10.3732/ajb.1400554

Soltis DE, Soltis PS, Hancock JF, et al (2007a) (PDF) Autopolyploidy in angiosperms: Have we grossly underestimated the number of species? In: ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/233646509_Autopolyploidy_in_angiosperms_Have_we_grossly_underestimated_the_number_of_species. Accessed 8 Feb 2019

Soltis DE, Soltis PS, Schemske DW, et al (2007b) Autopolyploidy in Angiosperms: Have We Grossly Underestimated the Number of Species? Taxon 56:13–30. doi: 10.2307/25065732

Sonnleitner M, Flatscher R, Escobar García P, et al (2010) Distribution and habitat segregation on different spatial scales among diploid, tetraploid and hexaploid cytotypes of Senecio carniolicus (Asteraceae) in the Eastern Alps. Annals of Botany 106:967–977. doi: 10.1093/aob/mcq192

Spoelhof JP, Soltis PS, Soltis DE (2017) Pure polyploidy: Closing the gaps in autopolyploid research: Pure polyploidy. Journal of Systematics and Evolution 55:340–352. doi: 10.1111/jse.12253

Stebbins G (1950) Variation and evolution in plants. Columbia University Press. New York.

Visger CJ, Germain-Aubrey CC, Patel M, et al (2016) Niche divergence between diploid and autotetraploid *Tolmiea*. American Journal of Botany 103:1396–1406. doi: 10.3732/ajb.1600130

Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas - Hijmans - 2005 - International Journal of Climatology - Wiley Online Library. https://rmets.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/joc.1276. Accessed 8 Feb 2019

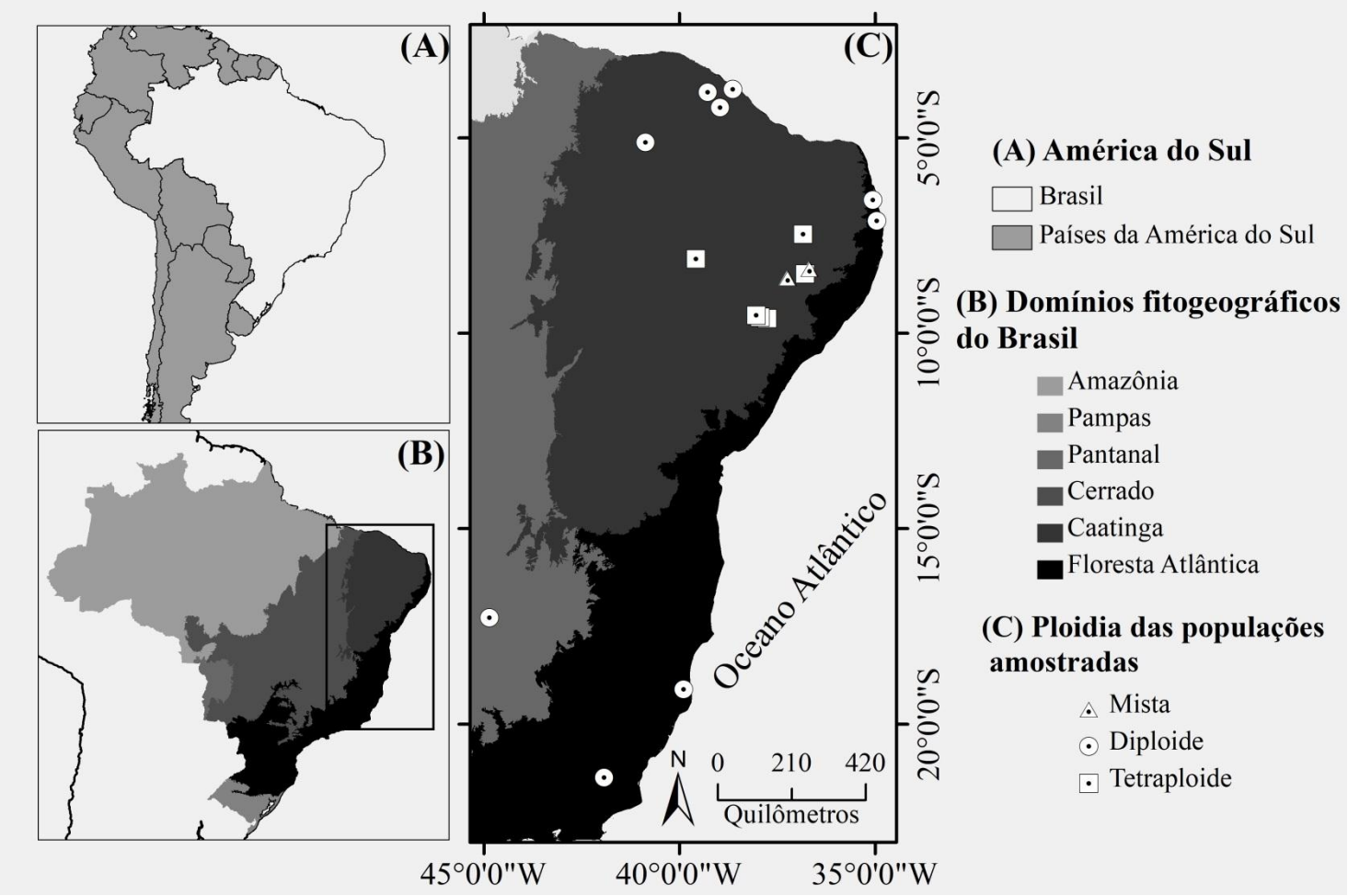

Figura 1. Distribuição geográfica das populações nas quais foram realizadas coletas de material botânico de espécie *Libidibia ferrea*. Os triângulos representam as populações mistas da espécie, os círculos as populações diploides e os quadrados as populações tetraploides.

Tabela 1: Principais caracteres utilizados para separação das variedades da espécie *Libidibia ferrea*. De acordo com Queiroz (2009) para classificação das variedades *L. ferrea* var. *ferrea*, *L. ferrea* var. *glabrescens e L. ferrea* var. *parvifolia* e, Benth para classificação da *L. ferrea* var. *leiostachya*.

Variedades	**Folíolos**			
	Tipo	*Tamanho*	*Pares*	*Cálice*
L. ferrea var. *férrea*	Pubescentes	mais 15mm	8 a 10	pubescentes
L. ferrea var. *glabrescens*	Glabros	mais 15mm	8 a 10	glabros
L. ferrea var. *parvifolia*	Glabros	até 9mm	12 a 16	**
L. ferrea var. *leiostachya*	membranosos	**	6 a 10	**

Tabela 2. Relação das populações amostradas de *Libidibia ferrea*, seguida da sua respectiva localidade, número de indivíduos coletados em cada área, seu respectivo nível de ploidia, variedade e domínio fitogeográfico.

Estado	Município/código da população	Latitude	Longitude	N°de indivíduos	Nível de ploidia	Variedade	Domínio
Alagoas	Piranhas nova (ALP)	-9.62361	-37.7567	16	4x	*ferrea*	Caatinga
Bahia	Paulo Afonso/Xingozinho (BAE)	-9.53896	-38.03749	12	4x	todas	Caatinga
Ceará	Caucaia (CEC)	-3.75536	-38.63913	10	2x	*glabrescens*	Caatinga
	Guaramiranga (CEG)	-4.22629	-38.96139	11	2x	*parvifolia*	floresta Atlântica (Serra)
	Pentecoste (CEP)	-3.831334	-39.28205	1	2x	*glabrescens*	Caatinga
	Crateús (CES)	-5.1165	-40.87274	30	2x	*ferrea/glabrescens*	Caatinga
Espírito Santo	Linhares (ESL)	-19.10905	-39.8918	19	2x	*parvifolia*	floresta Atlântica
Minas Gerais	Pirapora (MG)	-1.723.734	-44.86092	5	2x	*ferrea*	Caatinga
Paraíba	Santa Rita (PBM)	-7.127642	-34.95306	17	2x	*glabrescens*	floresta Atlântica
	São José dos Cordeiros (PBA)	-7.466564	-36.83395	28	4x	*ferrea/glabrescens*	Caatinga
Pernambuco	Alagoinha (PEAL)	-8.48227	-36.79004	10	4x	*ferrea/glabrescens*	Caatinga
	Catimbau (PEC)	-8.59125	-37.2508	10(2x) 3(4x)	2x/4x	*glabrescens/parvifolia*	Caatinga
	Pesqueira (PEA)	-8.353.924	-36.693.66	10(2x) 3(4x)	2x/4x	*glabrescens/parvifolia*	Caatinga
	Parnamirim (PEP)	-8.094535	-39.57588	8	4x	*ferrea/glabrescens*	Caatinga
Rio de Janeiro	Campo dos Goytacazes (RJ)	-21.37001	-41.92999	14	2x	*leiostachya*	floresta estacional semi-decidual

Rio Grande do Norte	Coronel Ezequiel*(PBMA)	-6.592844	-35.05817	12	2x	*glabrescens*	Restinga
Sergipe	Canindé do São Francisco (SEC)	-9.59222	-37.93282	12	4x	*glabrescens*	Caatinga

*Coleta realizada na cidade de Mataraca-PB, indivíduos plantados sob dunas em áreas de restauração florestal, sementes oriundas do município de Coronel Ezequiel, no Rio Grande do Norte.

Tabela 3. Morfometria dos estômatos da espécie *Libidibia ferrea* (Leguminosae) analisados no conjunto de indivíduos diploides e tetraploides, localizados em populações ao longo de toda a área de distribuição da espécie.

Parâmetro	**Diploides (média ± DP; Mediana)**	**Tetraploides (média ± DP; Mediana)**	**t e p; Z e p**
Face abaxial			
Célula guarda			
Largura	9.618 ± 2.533	13.869 ± 2.765	t= -10.606; p < 0.0001
Comprimento	2.00	3.00	Z (U)= 7.123; p < 0.0001
Estômato			
Largura	16.00	22.00	Z (U)= 8.999; p < 0.0001
Comprimento	14.00	20.00	Z (U)= 6.369; p < 0.0001
Face adaxial			
Célula guarda			
Largura	11.678 ± 2.469	14.694 ± 2,610	t= -8.224; p < 0.0001
Comprimento	2.904 ± 1.006	3.882 ± 0.937	t= -11.131; p < 0.0001
Estômato			
Largura	18.669 ± 3.865	24.435 ± 3.317	t= -6.893; p < 0.0001
Comprimento	18.00	22.00	Z (U)= 6.369; p < 0.0001

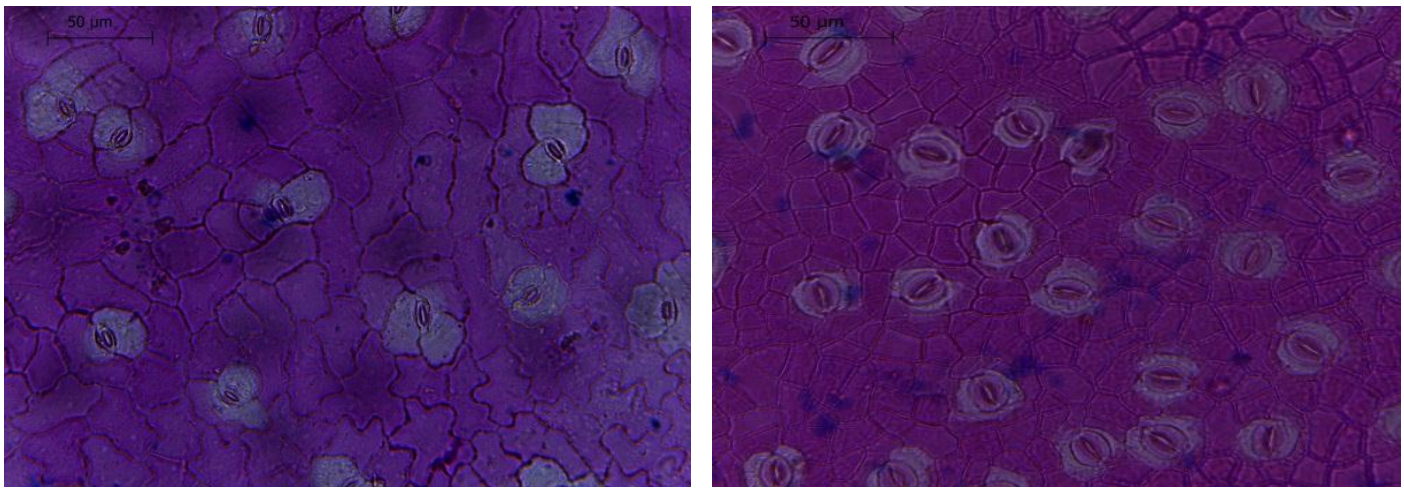

Figura 2. Visão geral da dissociação da epiderme, com estômatos, para a espécie *Libidibia ferrea*. A fotomicrografia a esquerda pertence a um indivíduo diploide da espécie, e a fotomicrografia da esquerda a um indivíduo tetraploide.

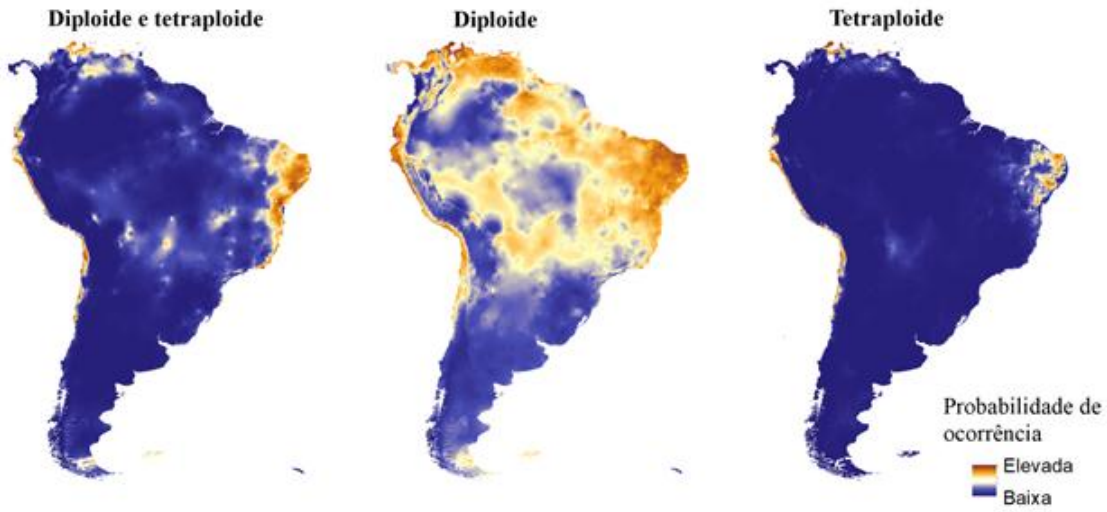

Figura 3. Modelagem de nicho de *Libidibia ferrea* para a América do Sul, para o conjunto total das populações dos citotipos diploides e tetraploides, exclusivamente populações diploides e exclusivamente populações tetraploides, respectivamente.

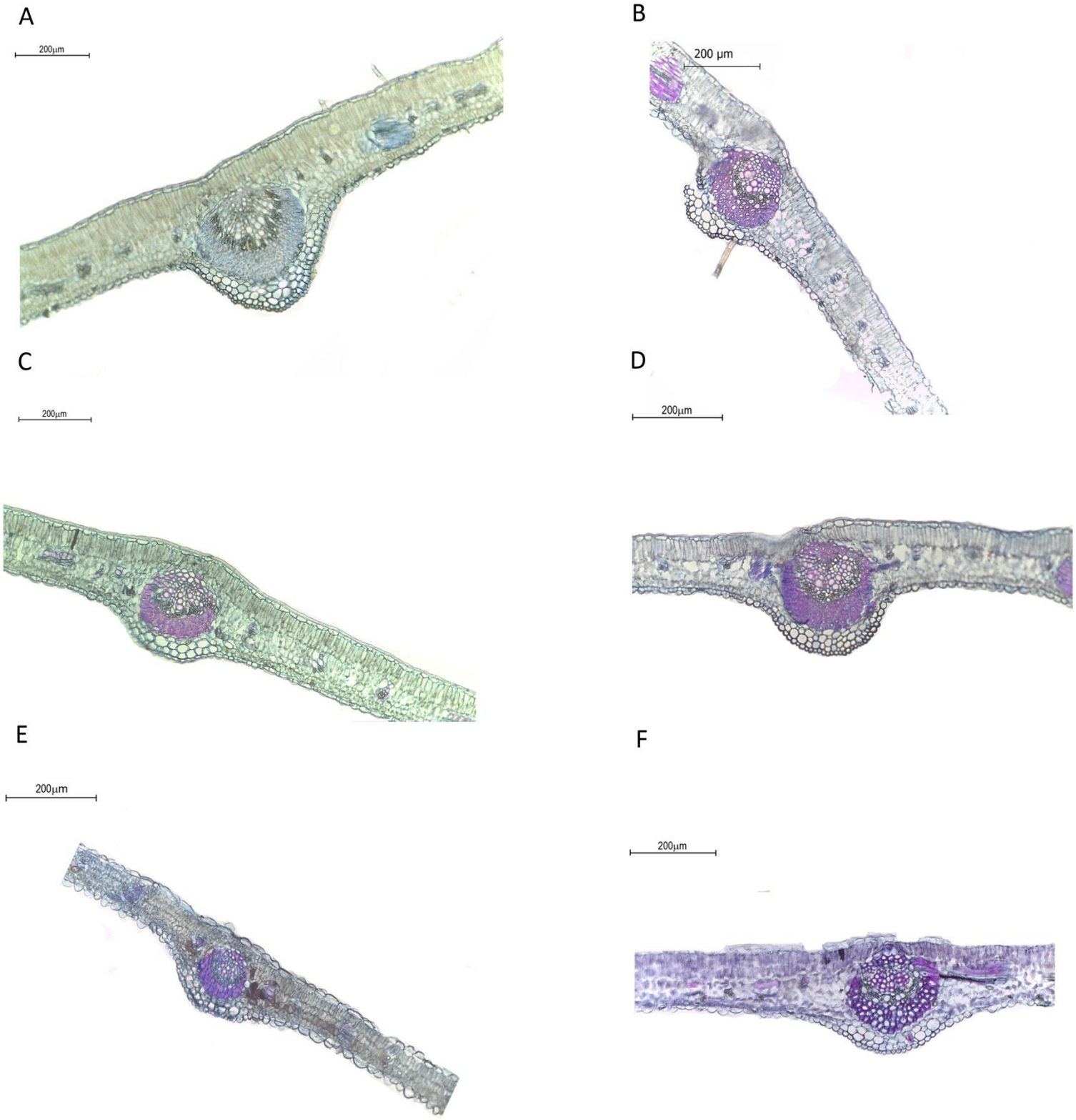

Figura 4a. Visão geral dos cortes transversais da espécie *Libidibia ferrea* (Leguminosae) para cada uma das populações estudadas, respectivamente as tetraploides (A) Piranhas nova- AL, (B) São José dos cordeiros – PB, (C) Xingozinho – BA, e as diploides D) Caucaia – CE, (E) Linhares – ESL (F) Pirapora – MG.

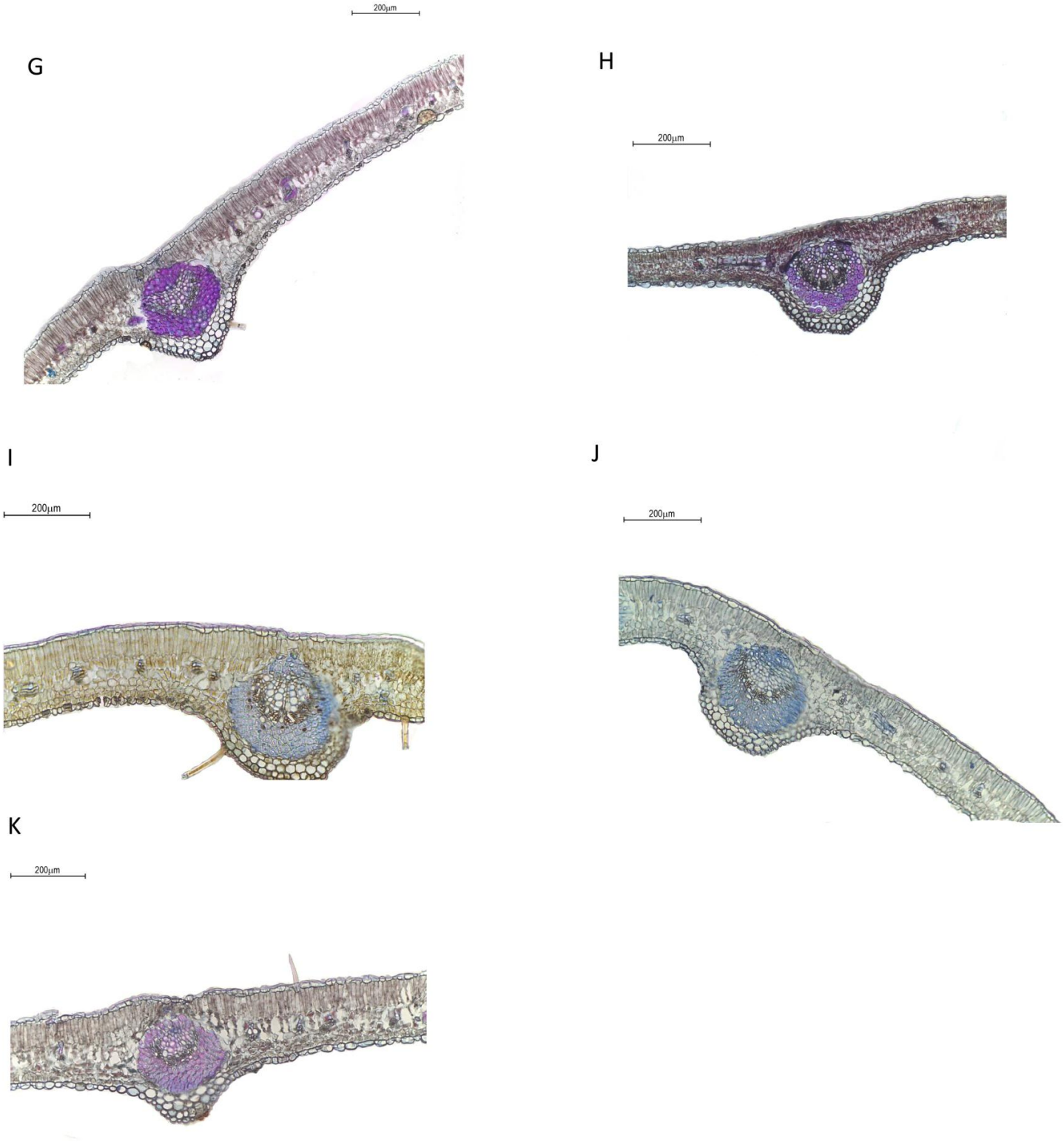

Figura 4b. Visão geral dos cortes transversais da espécie *Libidibia ferrea* (Leguminosae) para cada uma das populações estudadas, respectivamente as diploides (G) Pirapora – MG (H) Campos dos Goytacazes – RJ, e as tetraploides (I) Canindé do São Francisco – SE (J) Canindé do São Francisco – SE (K) Parnamirim – PE.

4 ARTIGO 2 - ORIGEM E FILOGEOGRAFIA DOS CITÓTIPOS DIPLOIDES E TETRAPLOIDES DE *Libidibia ferrea* (Leguminosae)

Isabelle Fernandes de Albuquerque[1], Tiago Esposito[1], Oswaldo Cruz-Neto[2], Douglas Soltis[3], Pamela Soltis[3], Evgeny Mavrodiev[3], Andrea Pedrosa Harand[2], Ariadna Valentina Lopes[2]*

[1]Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Recife, Pernambuco, Brasil, 50372-970
[2]Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Recife, Pernambuco, Brasil, 50372-970
[3]University of Florida, Florida Museum of Natural History, Gainesville, Florida, USA, 32611

*Autor para correspondência: avflopes@ufpe.br

RESUMO

A formação recorrente de linhagens em indivíduos autopoliploides pode aumentar a diversidade genética e contribuir para o sucesso no seu estabelecimento. Múltiplas linhagens podem criar um mosaico de distribuição entre populações diploides e poliploides, que, recentemente, vem sendo explicado pelo histórico de colonização da espécie. Dessa forma, interpretar os processos de diversificação e distribuição de espécies poliploides torna-se complexo, sobretudo na América do Sul, composta por uma variedade de biomas, climas e formações geomorfológicas. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo investigar a origem das populações da espécie autopoliploide *Libidibia ferrea* (Leguminosae) e, a partir disso, realizar inferências sobre as sua distribuição e relações filogeográficas. Foram utilizadas 17 populações das quais tínhamos feito coletas previas e verificado os seus níveis de ploidia confirmados através da citometria de fluxo – populações diploides, tetraploides e mistas. Duas regiões plastidiais, *ndh*F e *ycf*1, e quatro locos microssatélites (SSRcp), *ccmp5, ccmp6, ccmp7* e *ccmp2,* foram utilizados. Através das análises dos dois marcadores pudemos inferir três origens tetraploides. A estruturação geográfica dos haplótipos encontrados mostrou-se fraca, no entanto haplótipos relacionados estiveram localizados em regiões geograficamente próximas. Haplótipos localizados na região norte e sul, foram encontrados também na região central, ocupada pelas populações tetraploides e mistas. A estruturação dos haplótipos indica conexões pretéritas. Populações tetraploides foram encontradas com mais de uma origem, o que indica que existiu fluxo gênico entre elas, apesar do mecanismo de dispersão limitado da espécie. A presença de haplótipos exclusivos e derivados dentro de populações tetraploides indica que a poliploidia é um importante mecanismo evolucionário. Nossos resultados indicam que a rota de colonização da espécie teve início pelo norte da distribuição.

Palavras chave: autopoliploide; florestas tropicais sazonalmente secas; florestas secas; pleistoceno; microssatélites.

INTRODUÇÃO

A poliploidia pode ser definida como um processo de multiplicação do genoma resultando em três ou mais conjuntos completos de cromossomos (Ramsey & Schemske 1998). Embora seja rara em grupos animais, é um mecanismo bastante comum em plantas (Soltis et al. 2004). Estimativas de frequência de poliploidia em angiospermas giravam em torno de 30 a 70% (Stebbins 1950; Masterson 1994), entretanto, análises de dados genômicos apontam que todas as angiospermas passaram por pelo menos um evento de poliploidia ao longo de sua história evolutiva (Jiao et al. 2011).

Indivíduos poliploides podem ser classificados quanto a sua origem em autopoliploides, quando surgem pela duplicação de um mesmo genoma, ou alopoliploides, quando originados pela duplicação de genomas distintos, normalmente após um evento de hibridização (Stebbins 1971). Comparado a espécies alopoliploides, indivíduos autopoliploides tem sido alvo de poucos estudos. Essa lacuna pode ser devido ao fato dos autopoliploides serem historicamente considerados raros em decorrência da semelhança morfológica com seus progenitores diploides (Spoelhof et al. 2017) e ou mal adaptados devido a problemas no pareamento cromossômico (Stebbins 1950; Grant 1981). Entretanto, estudos recentes apontam que autopoliploides são mais comuns do que antes se assumia e que a origem sem hibridização pode trazer vantagens evolucionárias (Parisod et al. 2010), devido ao aumento da heterozigozidade, múltiplas copias gênicas e diversidade alélica, o que facilitaria seu estabelecimento e persistência (Parisod et al. 2010; Segraves et al. 1999).

Apesar do avanço no entendimento das consequências genéticas da autopoliploidia, pouco conhecimento existe acerca da origem dessas populações (Soltis et al. 2014). Estudos realizados com espécies autopoliploides tem demonstrado que as linhagens poliploides não surgiram uma única vez ao longo da sua história evolutiva, a exemplo de *Aucuba japonica* – Cornaceae (Ohi et al. 2003), *Plantago media* – Plantaginaceae (Van-Dijk e Bakx-Schotman 1997) *Heuchera glossulariifolia* Saxifragaceae (Segraves et al. 1999) com o mínimo de três origens distintas. Nenhuma espécie autopoliploide estudada até o momento apresentou origem única (Spoelhof et al. 2017). Na espécie *Galax urceolata* – Diapensiaceae, foi encontrado o mínimo de 47 origens independentes (Servick et al. 2015), maior número encontrado, mesmo quando comparado a alopoliploides (Baack 2004; Halverson et al. 2008; Peirson et al. 2013). Os autores afirmam que a formação frequente aumenta a diversidade genética e consequentemente, o sucesso no estabelecimento do citótipo poliploide.

A formação recorrente de indivíduos poliploides pode criar um mosaico na distribuição dos citótipos, onde populações são formadas por progenitores diploides e populações poliploides recém-criadas e estabelecidas ao longo da zona de ocorrência da espécie (Segraves et al. 1999). No entanto, em muitos complexos autopoliploides, indivíduos diploides e tetraploides são encontrados separados geograficamente, com pequenas áreas onde os dois citótipos coexistem (Levin 1983; Van Dijk & Bakx-Schotman 1997; Husband & Schemske 1998; Petit et al. 1999). Divergências geográficas entre citótipos vêm sendo frequentemente explicadas por diferenças ambientais (Levin 1975; Van Dijk et al. 1992), e mais recentemente através do histórico de colonização da espécie, o que tem se tornado possível sobretudo a partir de inferências filogenéticas com base em dados moleculares de regiões plastidiais (Van Dijk & Schotman 1997; Ohi et al. 2003; Parisod & Besnard 2007). De forma geral, espécies autopoliploides mostram história evolutiva complexa, com estruturas geográficas difíceis de interpretar, sugerindo, muitas vezes, a evolução independente através de diferentes regiões biogeográficas, presença de várias áreas de refúgio e processos de expansão pós-glacial (Ohi et al. 2003 Parisod & Besnard 2007).

Libidibia (DC.) Schltdl é um gênero neotropical segregado de *Caesalpinia*, que ocorre principalmente em florestas estacionais secas (Lewis et al. 2005). De acordo com a filogenia mais recente do grupo, baseada em cinco regiões plastidiais e uma nuclear, o gênero *Libidibia* forma um grupo monofilético e bem suportado composto por dez táxons distribuídos em sete espécies de árvores e arbustos (Gangnon et al. 2016). Quatro espécies do gênero ocorrem na América do Sul: *L. glabrata* (Kunth) C. Castellanos & G. P. Lewis, que ocorre no Peru e Equador, *L. paraguariensis* (D.Parodi) G.P.Lewis, ocorrente na região do Chaco (Paraguai e Argentina), *L. punctata* (Willd.) Britton, ocorrente na Venezuela e Colômbia, e *L. ferrea*, amplamente distribuída principalmente no Nordeste e alguns estados do sudeste do Brasil. Essas espécies constituíram a flora do Pleistoceno, sendo importantes na análise da hipótese do Arco Pleistocênico (E. Gangnon, com. pessoal).

Libidibia ferrea (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz, popularmente como jucá ou pau-ferro, ocorre nos domínios da Caatinga e floresta Atlântica em todos os estados do Nordeste, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Queiroz 2009). Trata-se de uma espécie que apresenta indivíduos diploides ($2n = 24$) e tetraploides ($2n = 48$) e que, baseado em semelhanças morfológicas e cariotípicas é classificada como autopoliploide (Beltrão & Guerra 1990). Populações da espécie podem ser encontradas com indivíduos diploides, tetraploides ou ambos os citótipos em coocorrência (Capitulo 1 desta tese). São reconhecidas quatro

variedades da espécie *L. ferrea*, baseadas em caracteres morfológicos e bioma de ocorrência, com a variedade *L. ferrea* var. *ferrea* sendo exclusiva da Caatinga, enquanto as variedades *L. ferrea* var. *parvifolia* e *L. ferrea* var. *glabrescences* ocorrem tanto em Caatinga, como em floresta Atlântica e por fim, a variedade *L. ferrea* var. *leiostachya*, exclusiva da floresta Atlântica do sudeste do Brasil (Queiroz 2009). Borges et al. (2009) identificaram as variedades *L. ferrea* var. *ferrea* e *L. ferrea* var. *glabrescences* como tetraploide ($2n = 48$), enquanto *L. ferrea* var. *parvifolia* foi identificada como diploide ($2n = 24$). Entretanto, dados mais recentes apontam que apenas a variedade *L. ferrea* var. *leiostachya* apresenta indivíduos exclusivamente diploides, e as demais apresentaram os dois níveis de ploidia na mesma variedade (capítulo 1 desta tese). Devido as características morfológicas similares, sobreposição de nicho e poidia entre as variedades, além da presença de muitos intermediários entre elas, neste estudo consideramos apenas a espécie *L. ferrea*.

A América do Sul é um continente de grandes dimensões no qual abriga a maior biodiversidade da terra, que engloba cinco dos "*Hotspots*" de biodiversidade (Myers et al. 2000). Composta por uma variedade de biomas e ecorregiões (Morrone 2004), – cujos limites são moldados principalmente por variações de pluviosidade –, grandes regiões de rios e uma extensa cordilheira (Clapperton 1993). Por esses motivos, determinar padrões de distribuições das espécies e associar a sua história evolutiva vem sendo uma tarefa difícil de ser elucidada. Diversos padrões biogeográficos são reconhecidos dentro da América do Sul, um clássico exemplo é o arco pleistocênico (Prado 2000). Baseado em padrões de endemismo, acredita-se que as províncias biogeográficas da Caatinga, Cerrado e do Chaco - que se estendem do Nordeste do Brasil até o Noroeste da Argentina - formam uma diagonal de áreas secas, denominada como florestas tropicais sazonais secas (SDTF), formando uma unidade fitogeográfica. Em revisão recente, Turchetto-Zolet et al. (2013) apontaram que tanto as mudanças climáticas do pleistoceno como mudanças no plioceno/mioceno contribuíram para modelar a diversidade atual e a distribuição dessas linhagens na América do Sul. Os autores ressaltam que as respostas filogeográficas dos organismos avaliados foram distintas, o que aponta para um mosaico altamente complexo de padrões filogeográfico na América do Sul.

Dessa forma, nesse trabalho foram levantadas as seguintes questões: (1) A espécie autopoliploide *L. ferrea* apresenta mais de uma origem? (2) A luz dos marcadores plastidiais, como se deu a distribuição e o processo de colonização dos citotipos diploides e tetraploides da espécie? (3) As oscilações climáticas do quaternário podem ter contribuído para a

distribuição e estabelecimento da espécie? (4) Com base nos nossos resultados a poliploidia pode ser considerada um mecanismo importante para o sucesso evolutivo?

METODOLOGIA

Amostragem das populações e extração de DNA

Para este estudo, foram coletados 169 indivíduos de *L. ferrea* pertencentes a 17 populações naturais da espécie, localizadas ao longo de grande parte da distribuição geográfica da espécie, variando entre um a 19 indivíduos por localidade (Tabela 1). Os indivíduos tiveram seus níveis de ploidia verificados através da citometria de fluxo em estudo realizado previamente (capítulo 1 desta tese). Folhas jovens ou material caulinar foram coletados e dissecados em sílica gel (Chase and Hills 1991) para posterior extração de DNA.

O DNA genômico foi extraído utilizando o método proposto por Doyle & Doyle (1987), denominado 2 × CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*), com modificações feitas por Ferreira & Grattapaglia (1998). Para cada amostra, utilizou-se 40 mg de folhas que foram levadas ao macerador automático (Tissuelyser LT – *Qiagen*), por 3 a 5 minutos, a uma velocidade de 50 oscilações por segundo. Todas as amostras caulinares foram previamente congeladas em nitrogênio líquido para obtenção de melhores resultados. Para estimativa da qualidade, o DNA das amostras foi corado com *GelRed* (Biotium), separado por eletroforese em gel de agarose 1% e observados em um transluminador acoplado a um sistema de fotodocumentação (Vilber Lourmat). Para uma estimativa da quantidade de DNA presente, utilizou-se o Nanodrop 2000c - *TermoFisher Scientific*. O DNA genômico foi estocado a – 20ºC até seu uso para as reações de amplificação.

Seleção dos marcadores moleculares

Para escolha do marcador molecular, foram realizados testes de polimorfismos com nove locos plastidiais universais – *pbs*A-*trn*H (Sang et al. 1997), *trn*L-*trn*F (Taberlet et al. 1991), *mat*K (Sang et al. 1997), *ndh*F (Olmstead & Sweere 1994), *trn*S-*trn*G (Shaw et al. 2007), *pet*A-*psb*J (Shaw et al. 2007), *atp*B-*rbc*L (Hodges et al. 1994), *ycf*1-*ycf*2 (Dong et al. 2015) e *rpl*32-*trn*L (Shaw et al. 2007). Para realização dos testes, foram selecionados quatro indivíduos da espécie *L. ferrea* pertencentes as populações geograficamente distantes, bem como com níveis de ploidia distintos. Nessa fase de testes, para cada loco foi realizada uma PCR gradiente com quatro temperaturas de anelamento distintas, que variaram de 52 °C a 60

°C. Para amplificação de cada região foram realizadas reações de PCR com 25 µl de volume final contendo 1× de tampão da taq (- $MgCl_2$) (Invitrogen™), 3 mM $MgCl_2$, 0.2 µM de dNTP, 0.1 µM de cada *primers*, 1× TBT e 1.25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™), além de 4ul (40 ng/ul) de DNA. A programação no termociclador (Veriti Thermal Cycler – *TermoFisher Scientific*) se iniciou com uma desnaturação a 94 ºC por 5 min, seguida de 35 ciclos compostos de 1 min a 94 ºC, 45 segundos a 53 °C (*ycf*1-*ycf*2), 52ºC (*ndh*F) ou 54°C (*mat*K, *trn*L-F, *pbs*A-*trn*H), 1 min a 72ºC, e com uma extensão final a 72 ºC por 10 min. As temperaturas de anelamento dos *primer*s descritas acima foram aquelas na qual obtivemos os melhores produtos amplificados. Para aquelas regiões testadas sem sucesso na amplificação, a temperatura de anelamento pôde ser obtida.

Após a checagem em gel de agarose 1%, os produtos das regiões amplificadas foram purificados por precipitação, quantificados no Nanodrop 2000c *TermoFisher Scientific* e enviados ao sequenciador automático *ABI* 3100 (*Applied* Biosystem, USA) da plataforma de sequenciamento de DNA do Centro de biociências – Universidade Federal de Pernambuco. As sequências foram alinhadas e analisadas utilizando o software *Geneious* 10.1.3 (Kearse et al. 2012). As duas regiões mais polimórficas foram selecionadas e um total de 96 indivíduos por região (1-11 por população) foram enviados para sequenciamento. As reações de PCR foram realizadas como descrito para os testes de polimorfismos, exceto pelo volume de reação de 50 µl. As populações de código PEA, PEC e PEA, todas localizadas no estado de Pernambuco, foram excluídas das análises com marcadores de regiões plastidiais, por apresentarem produto insuficiente para o sequenciamento.

Em adição, foram testados oito pares de *primers* microssatélites universais – ccmp2 ao ccmp10 (Weising & Gardner 1999) e EMCRC74 (Steane et al. 2005) – marcados diretamente (Pet, Vic, Ned e Fam). De forma semelhante as regiões plastidiais, também foram realizadas PCRs gradiente para verificar qual a melhor temperatura de anelamento para cada loci, estas variaram de 52 °C a 60 °C. As reações testes foram análogas as reações finais, com exceção a do loco ccmp7 que foi realizada com o dobro de TBT, a fim de melhorar a qualidade dos picos. Todos os locos SSR testados foram amplificados e genotipados, mas apenas os polimórficos selecionados para estudo. As reações de finais de PCR foram realizadas com um volume final de 10 µl, contendo 1× de tampão da taq (- $MgCl_2$) (Invitrogen™), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 µM de dNTPs, 0.25 µM de cada *primers* previamente marcado, 1× TBT e 0.5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™), além de 20 ng de DNA. Depois de uma desnaturação inicial a 94 ºC por 5 min, foram realizados 35 ciclos compostos de 1 min a 94 ºC, 1 min a 52

°C (ccmp2), 54 °C (ccmp7 e ccmp10), 56 °C (EMCRC74), 58 °C (ccmp4, ccmp5 e ccmp 6) ou 60 °C (ccmp3), 1 min a 72ºC, seguidos por uma extensão final a 72 ºC por 10 min. Os produtos da PCR dos 169 indivíduos amplificados foram levados para genotipagem automática na plataforma de sequenciamento da UFPE, onde foram separados por tamanho de fragmento para determinação dos alelos. A genotipagem foi realizada em multiplex com quatro locos/indivíduo, incluindo 9.8 µl de formamida, 0.3 µl de *GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard v2.0* e 0.25 µl de produto marcado de cada loco. As análises dos fragmentos foram realizadas através do software Genmarker V2.6.4.

Análise dos dados das regiões plastidiais

Tratamento das Sequências, Diversidade Genética e Dinâmica Demográfica

Sequências consenso de cada indivíduo foram montadas a partir das sequências *forward* e *reverse* com o auxílio dos softwares *Geneious* 10.1.3 (Kearse et al. 2012) e MEGA v.7 (Kumar and Tamura 2015). O software *Geneious* 10.1.3 (Kearse et al. 2012) foi ainda utilizado para o alinhamento das múltiplas sequencias através do Clustal W. Os alinhamentos foram construídos de forma independente para as duas regiões analisadas (*ndh*F e *ycf*1-*ycf*2) depois concatenados para as análises posteriores. Uma das regiões analisadas, *ycf*1-*ycf*2, apresentou uma região microssatélite na altura dos 280 pb o que dificultou o sequenciamento em algumas amostras. Para evitar possíveis erros e pela ausência de sítios polimórficos antes dessa região, utilizamos apenas a sequência depois dessa região de microssatélite para todos os indivíduos amostrados.

O tamanho das regiões após o alinhamento, número de sítios variáveis, conteúdo CG (Citosina/Guanina) e AT (Adenina/Timina) bem como os índices de diversidade molecular (diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica) e visualização dos haplótipos foram calculado através dos *softwares* DNAsp (Rozas et al. 2003) e ARLEQUIN 3.5.2 (Excoffier & Lischer 2015). O índice de diversidade haplotípica foi calculado individualmente para todas as populações. Para verificar se as populações da espécie sofreram processos demográficos ao longo de sua história evolutiva, foram realizados dois testes de neutralidade –*Tajima's test* (Tajima 1989) e *Fu's Fs test* (Fu 1997) – com 10.000 simulações, no software ARLEQUIN 3.5.2 (Excoffier et al. 2005). Os testes demográficos foram conduzidos para todo o conjunto de dados e para populações diploides e tetraploides em separado. Para investigar se existe correlação genética e geográfica entre as populações de *L. ferrea* um teste de correlação de Mantel, com 9.999 permutações, foi realizado com o auxílio do programa GenAlEx 6.5.

Análises filogenéticas, datação molecular e origem poliploide

Para as análises filogenéticas se utilizou uma sequência de cada haplótipo encontrado. A fim de selecionar o modelo de evolução de sequências adequado para os dados da espécie foi utilizado o software JModelTest 2.1.10 (Posada 2008), baseado no critério de Akaike (AIC) (Akaike 1973). Com base nessa análise, o modelo GTR foi o escolhido para as duas regiões plastidiais concatenadas. Esse modelo assume que a probabilidade de ocorrer substituições, deleções e inserções são iguais entre os três nucleotídeos. A inferência bayesiana foi realizada através do Mr. Bayes v.3.2 (Ronquist et al. 2012), com 10.000.000 de repetições, amostragem a cada 1.000 gerações e excluindo-se 25% das árvores amostradas (*burn-in* = 2.500.000). Como *outgroup* foram utilizadas sequências da espécie *L. coriaria*, obtidas através do *Genbank* (KJ468095.1). As árvores finais foram editadas usando o FigTree v.1.4.2 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/). Utilizamos a topologia fixada da inferência bayesiana para uma análise de relógio molecular a fim de datar o tempo de diversificação dos haplótipos e interpretar o padrão biogeográfico das populações de *L. ferrea*. Para a datação, utilizou-se o *uncorrelated log normal relaxed clock* e modelo de especiação baseado no processo de Yule. 10.000.000 gerações foram realizadas com amostragens a cada 1.000 gerações utilizando-se o pacote BEAST v.1.8.4 (Drummond & al. 2012). A fim de verificar a amostragem efetiva de todos os parâmetros e avaliar a convergência de cadeias independentes, suas distribuições posteriores foram avaliadas no Tracer v.1.6. (Rambaut et al. 2009) e a amostragem MCMC foi considerada suficiente em tamanhos amostrais efetivos (ESS) maiores que 200. Após remover 25% das amostras como *burn-in*, as séries independentes foram combinadas e uma árvore de credibilidade máxima (MCC) foi construída usando TreeAnnotator v.1.8.2. (Drummond et al. 2012). A filogenia foi calibrada usando 8.09 Ma como tempo de divergência entre *L.coriaria* e *L. ferrea*, baseado na única filogenia datada disponível até o momento para o grupo (E. Gangnon, com. pessoal).

Relações intra-específicas foram verificadas através da construção de uma rede de haplótipos pelo método *median-joining network* (Bandelt et al. 1999) com o auxilio do software Network 5.0.0.3 (Forster et al. 2003). As frequências dos haplótipos nas populações foram plotadas no mapa com auxílio do programa ArcGIS 10.1 (ESRI 2010). Adicionalmente, com o auxílio da plataforma R 3.5.2, foi implementada uma análise com o pacote GENELAND v.4.0.7 (Guillot et al. 2005), que utiliza informações genéticas (haplótipos) e de distribuição geográfica para detectar como as populações se agrupam espacialmente. Para essa análise, utilizou-se o mínimo de um o máximo de grupos/clusters

(K), com 1.000.000 de interações e burning = 200. Em seguida um mapa foi gerado. Os índices de riqueza haplotípica foram calculados dentro dos grupos formados e comparados, a fim de detectar possíveis rotas de colonização da espécie.

Para estimar o número de origens autotetraploides independentes, assumimos que indivíduos diploides são progenitores dos poliploides, e os novos indivíduos formados possuem o mesmo haplótipo do seu progenitor. Independentes origens também foram inferidas através da árvore consenso, pelo número de clados onde diploides aparecem junto com tetraploides.

Análise dos dados cpSSRcp

Assim como nos testes de polimorfismos, as análises dos fragmentos foram realizadas através do software Genmarker V2.6.4. Os haplótipos foram identificados e a diversidade haplotípica estimada através do software *Haplotype Analysis* 1.05 (Eliades & Eliades 2009). De forma análoga as análises com as regiões plastidiais, utilizando os mesmos parâmetros, a análise no pacote GENELAND v.4.0.7 (Guillot et al. 2005) foi implementada. Em seguida um mapa foi gerado. Os índices de riqueza haplotípica foram mensurados dentro dos grupos formados e comparados, a fim de detectar possíveis rotas de colonização da espécie.

Como as variações apresentadas nos fragmentos foram mononucleotídicas, os valores obtidos foram plotados em gráficos de dispersão para visualização e determinação dos alelos encontrados. De forma semelhante ao realizado para os dados de sequência foi gerada uma rede de haplótipos utilizando o método de *median-joining network* (Bandelt et al. 1999), no programa network 5.0.0.3 (Forster et al. 2003), sendo os dados inseridos manualmente no programa. Como foi observado um grande número de haplótipos exclusivos (para rede completa, figura suplementar 1), uma rede simplificada apenas incluindo haplótipos presentes em mais de uma população também foi construída e apresentada.

RESULTADOS

Sequenciamento de regiões cpDNA

Padrões de variabilidade de cpDNA e dinâmica demográfica

Dentre as regiões plastidiais testadas, seis tiveram produtos amplificados e foram sequenciadas (*pbs*A-*trn*H, *trn*L-*trn*F, *mat*K, *ndh*F, *pet*A-*psb*J e *ycf*1F-*ycf*2). As regiões *ndh*F e *ycf*1, ambas com ~ 900pb, apresentaram-se como as mais polimórficas, com cinco substituições cada nos quatro indivíduos analisados, e foram selecionadas. Do total de 114

indivíduos selecionados para amplificação, 99 indivíduos foram sequenciados para a região *ycf*1 e 96 indivíduos para a região *ndh*F. A região utilizada do *ycf*1-*ycf*2 apresentou 396 pb, com oito sítios polimórficos e muitas regiões repetidas com T-A. Já o *ndh*F apresentou 650 pb e quatro sítios polimórficos.

O alinhamento final das duas regiões plastidiais concatenadas foi composto por 85 indivíduos pertencentes a todo o conjunto de populações analisadas (Tabela 1). Este alinhamento apresentou 1.046 pb, com 12 sítios variáveis. Os resultados dos testes de neutralidade, quando analisado todo o conjunto populacional (*Tajima's test*: D = 0.234, P = 0.653; *Fu's test*: Fs = 0.140, P = 0.581), bem como populações diploides (*Tajima's test*: D = 0.511, P = 0.737; *Fu's test*: Fs = 0.756, P = 0.680) e tetraploides (*Tajima's test*: D = 1.048, P = 0.878; *Fu's test*: Fs = 1.525, P = 0.792) em separado, não foram significativos, o que indica uma baixa variação demográfica ou estabilidade demográfica populacional ao longo do tempo.

Distribuição e estrutura geográfica da variação genética

Foram encontrados um total de 10 haplótipos para as duas regiões plastidiais da espécie *L. ferrea* (Tabela 2). O valor da diversidade haplotípica para o conjunto de dados foi de 0.7966, e variou entre 0 e 0.9 nas populações analisadas (Tabela 1). A população que apresentou mais alto índice de diversidade e maior número de haplótipos foi a tetraploide BAE, seguidas das diploides CEC, população mais ao norte, e RJ, população localizada mais ao sul da distribuição da espécie (Tabela 1). De acordo com a análise obtida pelo GENLAND cinco grupos genéticos foram formados (Figura 1a). De forma geral houve proximidade geográfica entre os grupos obtidos, com exceção do grupo amarelo, que teve três populações diploides localizadas mais ao norte situadas no mesmo grupo de uma população diploide mais ao sul (Figura 1b). Um segundo grupo foi formado por três populações exclusivamente tetraploides – grupo rosa -, um terceiro por duas populações tetraploides e duas diploides - grupo verde bandeira -, e um quarto por duas populações diploides localizadas mais ao sul da distribuição da espécie que formaram o grupo branco (Figura 1b). Um quinto grupo é sugerido pelo programa – em verde – entretanto nenhuma população coletada foi encontrada nesses pontos. Quando analisadas por grupo, a diversidade haplotípica apresentou-se semelhante entre os grupos localizados nos extremos da distribuição, amarelo mais ao norte com 0.621, e branco mais ao sul com 0.6071, seguidas dos grupos localizados mais ao centro da distribuição, verde com 0.581 e rosa, composto por populações tetraploides, com 0.257.

Dentre o conjunto de haplótipos observados, cinco estiveram presentes exclusivamente em indivíduos diploides, dois encontrados exclusivamente em indivíduos tetraploides e três compartilhados entre indivíduos de níveis de ploidia distintos (Tabela 2). A partir desses dados podemos sugerir três origens distintas para os indivíduos tetraploides, sendo contadas pelo número de haplótipos compartilhados. As populações tetraploides parecem ter se originado através de três rotas distintas, duas delas no sentido norte - sul. A primeira com o H2, presente nas populações diploide PBM e PBMA e nas tetraploides BA e CES, e a segunda com o H5, presente na população diploide CEC e na tetraploide CES (Figura 2a). Já o haplótipo H3, o mais frequente na espécie e mais bem distribuído geograficamente, está presente em populações diploides do norte (AS, CEC, CEG e PBMA) e do sul (ESL e RJ), além de ser encontrado em três populações tetraploides (BAE, PBA e PEP). A partir da análise do GENLAND, quando o k = 2 (Figura suplementar 2), as populações tetraploides aparecem no mesmo cluster da população diploide PBMA e permanecem agrupados até o K = 5. Dessa forma podemos inferir a rota de origem do haplotipo H3 também no sentido norte-sul.

Dois haplótipos (H1 e H4) foram encontrados exclusivamente em populações tetraploides. O H1 está presente em todas as populações tetraploides, enquanto o H4 é exclusivo de BA, o que pode sugerir tempos de origem distintos. Ambos se originaram a partir de H3 (Figura 2b), o haplótipo possivelmente ancestral e que também está presente em tetraploides. Apenas três haplótipos se mostraram exclusivos de determinada população: além de H4, presente na população tetraploide BA também são exclusivos os haplótipos H7 e H8, nas diploides CEP e ESL, respectivamente (Figura 2a).

Foi observada fraca estruturação geográfica na distribuição dos haplótipos nas populações de *L. ferrea*. O haplótipo central (H3) foi amplamente distribuído ao longo de toda a área de ocorrência da espécie tanto em populações diploides como nas tetraploides (Figura 2a). No entanto, uma pequena diferença foi observada quando comparamos haplótipos localizados em populações dos extremos norte e sul. Os haplótipos H8, H9 e H10 estiveram presentes exclusivamente em populações localizadas ao sul e os haplótipos H6 e H7, exclusivamente em populações mais ao norte (Figura 2a). Além disso, a partir da análise do network entre os 10 haplótipos, é possível observar dois grupos estreitamente relacionados: uma primeira linhagem composta pelos haplótipos H1, H3, H4, H8, H9 e H10, e uma segunda linhagem, separadas por três passos mutacionais da primeira, formadas pelos haplótipos H2, H5, H6 e H7, nesta última todos os haplótipos estão localizados na região norte (Figura 2b).

Esta estruturação geográfica fraca pode ser corroborada pelo Teste de Mantel, que, apesar de significativo, indica que a distância geográfica entre as populações explica apenas 4% (R^2 = 0,0392) da sua estruturação genética (R = 0.198, *P* = 0.000) (Figura 3).

Análises de divergência filogenética e datação molecular

A análise bayesiana indicou uma clara separação entre os haplótipos de *L. ferrea* e *L. coriaria*. Para *L. ferrea* foi observado um clado maior bem suportado - dividido em dois subclados - e outro menor, sem suporte (Figura 4). O primeiro subclado, sem suporte, foi composto por quatro haplótipos, cujas relações também não apresentaram suporte. Este subclado incluiu o haplótipo central H3, outro exclusivo de uma população diploide localizada ao sul (H8) e dois haplótipos exclusivos de populações tetraploides, H1 e H4, respectivamente (Figura 4). No segundo subclado, bem suportado, detectamos uma diferença entre o haplótipo H5, presente numa população diploide do norte da distribuição da espécie e numa população tetraploide central, e os demais, H2, H6 e H7 e, exclusivos de populações diploides do norte (H6 e H7) ou compartilhado entre diploides do norte e tetraploides. O segundo clado foi composto exclusivamente por haplótipos localizados nas populações diploides do sul da distribuição da espécie (H9 e H10).

As relações filogenéticas entre os haplótipos foi semelhante à relação entre os haplótipos obtidas pelo método *median joining* (Figura 2b), com exceção dos haplótipos H9 e H10, ambos localizados ao sul, que aparecem em um clado separado, porém sem suporte (Figura 2). De forma geral, com exceção do haplótipo central, haplótipos mais relacionados geneticamente estiveram localizados em populações próximas entre si (Figura 2a e 2b; Figura 4). A exceção foram duas populações tetraploides, BA e CES, onde haplótipos de diferentes linhagens e distantes geograficamente coocorrem dentro dessas populações (Figura 1a e b).

A datação molecular mostrou que *L. ferrea* tem se diversificado há aproximadamente 6 Ma, compatível com a última etapa do Mioceno, que aconteceu entre cinco e sete milhões de anos. O tempo de separação entre as linhagens aponta que os dois haplótipos localizados nas populações mais ao sul (H9 e H10) se diversificaram antes dos demais (Figura 4). Posteriormente, o clado maior passou por um processo de divergência em torno dos 4 Ma, com o primeiro subclado se diversificado há aproximadamente 2 Ma e o segundo há aproximadamente 1,5 Ma (Figura 2).

SSRcp

Distribuição e estrutura geográfica da variação genética

Dentre os oito locos microssatélites testados, quatro apresentaram polimorfismo e foram selecionados para o estudo: *ccmp2*, *ccmp5*, *ccmp6* e *ccmp7*. A análise destes quatro locos polimórficos em 169 indivíduos pertencentes a todo o conjunto de populações amostradas revelou alelos de tamanho esperado (Weising & Gardner 1999). O número de alelos variou para cada região, o loco *ccmp7* apresentou maior quantidade de alelos, com sete, seguidos dos locos *ccmp2*, *ccmp5* e *ccmp6*, todos com 5 alelos encontrados.

Através da análise dos fragmentos, foi encontrado um número total de 22 haplótipos para a espécie *L. ferrea* (Tabela 3). O valor da diversidade haplotípica para todo o conjunto de dados foi de 0.385, e variou entre 0 a 0.9 nas populações analisadas (Tabela 1). A população que apresentou o mais alto índice de diversidade foi a MG, localizada mais ao sul, seguidas das tetraploides ALP e BA, e das diploides PBM e CEC, ambas localizadas ao norte da distribuição da espécie (Tabela 3). Através das análises no Geneland, dessa vez com as populações mistas incluídas, foram encontrados três grupos genéticos (K = 3) (Material suplementar Figura 3) (Figura 1c). De forma geral, a maioria das populações analisadas foram alocadas no grupo laranja, formado por populações de ambos os níveis de ploidia e localizadas ao longo de toda a área de ocorrência da espécie (Figura 1d). Em adição, o grupo branco, foi composto pelas duas populações mistas mais uma população tetraploide próxima geograficamente, e o grupo verde, composto de uma população diploide ao norte (Figura 1d).

Dos 22 haplótipos encontrados a partir das regiões microssatélites, 15 estiveram presentes apenas em indivíduos diploides, quatro exclusivos de indivíduos tetraploides e três compartilhados entre os dois níveis de ploidia (Tabela 3). Podemos, dessa forma, inferir três origens distintas para os indivíduos tetraploides da espécie. Além disso, a distribuição desses haplótipos sugere que os eventos de poliploidização podem ter ocorrido fora da zona de distribuição atual dos poliploides. Hipotetizamos que essas origens foram dadas em duas vias: tanto do norte para o sul, com o H22 ocorrendo na população diploide PBM e nas tetraploides BA e SEC, como do sul para o norte, com o H11 sendo encontrado na população diploide ESL e nas tetraploides ALP, SEC, BA, PEP e PBA (Figura 3a). Por outro lado, os indivíduos tetraploides presentes nas populações mistas PEC e PEAZ apresentaram apenas o haplótipo H3 presente nos diploides da mesma população, mas também em toda a zona de distribuição da espécie, de modo que não é possível afirmar se esses indivíduos tetraploides foram originados dentro dessas populações (Figura 5a).

De maneira semelhante aos dados de regiões plastidiais, foi observada uma estruturação geográfica fraca na distribuição dos haplótipos ao longo das populações, com o haplótipo central (H3) distribuído amplamente ao longo de toda a área de ocorrência da espécie (Figura 5a). Quando comparamos populações das diferentes regiões, conseguimos encontrar diferenças nos haplótipos compartilhados entre elas, a exemplo, o haplótipo H17, exclusivo de populações localizadas ao sul, e o H9, exclusivo daquelas localizadas ao norte da distribuição (Figura 5a). A região central, onde encontramos populações tetraploides e mistas, possui, além do haplótipo central, haplótipos tais como o H11 e H22, oriundos dos limites sul e norte da distribuição da espécie, respectivamente.

A partir da análise do *network* entre os nove haplótipos selecionados (excluindo os exclusivos de uma única população), é possível observar a formação de quatro grupos mais relacionados (Figura 5b). O primeiro composto pelo haplótipos H3, amplamente distribuído dentro das populações, o H11, oriundo da população ESL localizada ao sul e compartilhado entre os tetraploides centrais, e por fim, o H5, exclusivo de uma população ao norte (Figura 5a e 5b). O segundo grupo é composto pelos haplótipos diploides H8 e H20, exclusivos de populações localizadas ao norte, e o H22, sendo encontrado também compartilhado com os tetraploides centrais. Os demais grupos (H16 e H17, e H9 isolado), menos relacionados aos dois primeiros, são compostos por haplótipos localizados ao sul da distribuição da espécie (Figura 5a e 5b).

DISCUSSÃO

Origens múltiplas dos autopoliploides

Os dados oriundos de cpDNA e SSR indicam três origens distintas para a espécie autopoliploide *Libidibia ferrea*, como aponta o compartilhamento dos haplotipos entre as populações diploides e tetraploides. Como exemplo, as populações diploides PBM e ESL (SSR), ambas localizadas em regiões de floresta Atlântica, compartilhando seus haplotipos com as tetraploides situadas em Caatinga. A formação recorrente de indivíduos poliploides dentro das populações (Ramsey e Shemse 1998) e múltiplas origens independentes podem conferir uma maior variabilidade genética e riqueza alélica (Parisod et al. 2010; Segraves et al. 1999), o que facilita a adaptação do novo citótipo formado a longo prazo (Husband 2004; Parisod et al. 2010). Para a espécie *L. ferrea* nós hipotetizamos que a formação recorrente de linhagens poliploides pode ter contribuído para a seleção daquelas mais adaptadas ao cenário de floresta seca. Dessa forma, algumas linhagens conseguiram ocupar áreas do novo ambiente

localizado entre as zonas de populações exclusivamente diploides, embora permaneça incerto se esse mecanismo contribuiu para o seu estabelecimento ou que fatores levaram a formação desses novos poliploides.

Além das múltiplas origens observadas para os indivíduos poliploides, todas as populações tetraploides de *L. ferrea* consistem de combinações de haplótipos com pelo menos duas origens distintas e ou, exclusivos de indivíduos tetraploides. Por exemplo, os dados de cpDNA mostram a presença do haplótipo H1, exclusivo de populações tetraploides, em todas as populações analisadas, estando esse haplótipo a apenas um passo mutacional do H3, mais comum e amplamente distribuído. A presença de diferentes origens dentro da mesma população não é uma condição comum em espécies autotetraploides, sendo observada até o presente momento apenas para *Heuchera grossulariifolia* – Saxifragaceae (Segraves et al. 1999). Os autores argumentam que esse comportamento pode refletir altas taxas de migrações passadas, extinção de muitos ancestrais diploides e ou divergência de tetraploides após a sua formação. A presença de haplótipos exclusivos e oriundos do haplótipo ancestral dentro de populações tetraploides de *L. ferrea* apontam que essas populações podem ter passado por um processo de diversificação após a sua formação e que essa condição tenha contribuído para seu sucesso evolutivo.

Variação da diversidade genética

Libidibia ferrea apresentou elevado índice de diversidade genética (h = 0.796), que não esteve distribuída aleatoriamente ao longo de sua zona de distribuição. Os grupos genéticos localizados em populações no extremo da distribuição, norte e sul, para os dados de DNAcp mostraram maior diversidade quando comparados aqueles localizados mais ao centro, que inclui as populações tetraploides. Apesar da variação na diversidade genética, a estruturação geográfica das populações foi fraca, onde a distância geográfica explicou pouco da variação genética. Esse padrão observado para *L. ferrea* é bem diferente do que vem sendo encontrado para outras espécies de leguminosas arbóreas através de DNA plastidial. *Caesalpinia echinata (*Lira et al. 2003), *Dalbergia nigra* (Ribeiro et al. 2011) e *Hymenaea stigonocarpa (*Ramos et al. 2007), apresentaram, nos três casos, três grupos fortemente suportados, com diferenciação clara entre os haplótipos e os autores sugeriram barreiras passadas ao fluxo gênico associado ao potencial limitado de dispersão dessas espécies. Apesar do baixo potencial de dispersão em *L. ferrea* via peso/gravidade, ou seja, barocoria (Griz & Machado 2001), não foi possível observar uma forte estruturação geográfica. Com isso,

acreditamos que a distribuição da variação genética na espécie não pode ser explicada somente por barreiras geográficas ou por sua estratégia de dispersão e que para esse entendimento, devemos incluir outros processos envolvidos na história de vida da espécie, como, por exemplo, os múltiplos eventos de poliploidização.

O conjunto de dados de microssatélites plastidiais (SSRcp) gerados para *L. ferrea* mostraram resultados congruentes com os dados obtidos a partir do sequenciamento das regiões plastidiais *ndh*f e *ycf*1 e revelaram padrões de distribuição dos haplótipos, numero de eventos de poliploidização semelhantes e, sobretudo, uma grande quantidade de haplótipos. Resultado semelhante foi encontrado para um complexo autopoliploide da família Brassicaceae (Parisod & Besnard, 2007). Neste estudo, além de encontrarem um maior número de haplótipos para os dados SSRcp, os autores identificaram altos níveis de polimorfismo, mesmo em indivíduos localizados próximos geograficamente, e os microssatélites se mostraram mais informativos que os fragmentos PCR-RFLP e DNAcp. De forma geral, dados SSRcp apresentam maior número de haplótipos, o que pode ser devido a maior variabilidade dos nucleotídeos dentro desses locos, bem como a maior quantidade de indivíduos amostrados (Oliveira et al 2006). Ainda assim, o número de haplótipos encontrados para *L. ferrea* mostrou-se elevado quando comparamos com estudos prévios com outras espécies. Lira et al. (2003), analisando a espécie arbórea e de floresta seca *Caesalpinia echinata*, utilizando dois dos marcadores utilizados para nosso estudo, *ccmp6* e *ccmp7*, além de mais três desenhados para a espécie, encontraram apenas oito haplótipos. Assim, acreditamos que os marcadores SSRcp utilizados neste estudo, apesar de não desenhados para a espécie em questão, são confiáveis, informativos e apresentam potencial para análises de filogeografia em outras espécies do grupo.

Haplótipos e distribuição dos citótipos

Libidibia ferrea não mostrou uma clara estruturação geográfica de seus haplótipos. Foi possível observar um haplótipo amplamente distribuído e pequenas diferenças entre populações localizadas no norte e sul, e na faixa central de ocorrência dos tetraploides e populações mistas. De forma geral, espécies autopoliploides apresentam estruturações geográficas dos haplótipos complexas e difíceis de interpretar (Van Dijk & Schotman 1997). Parte dessa complexidade pode estar relacionada às múltiplas origens que vem sendo encontradas dentro de populações autopoliploides (ver Soltis & Soltis 1999; Servick, *et al.* 2015) e alopoliploides (ver Peirson *et al.* 2013). A partir das múltiplas linhagens formadas,

diferenças na distribuição são criadas entre os diferentes níveis de ploidia, onde indivíduos poliploides são geralmente encontrados separados de seus progenitores com alguma área de coocorrência (Van Dijk & Bakx-Schotman 1997; Husband & Schemske 1998; Petit *et al*. 1999). Para *L. ferrea* populações tetraploides foram encontradas na região central de distribuição da espécie e exclusivamente sob os domínios de floresta seca, reconhecida pelos baixos índices pluviométricos e forte incidência luminosa. Fatores abióticos, como disponibilidade de água e temperatura, vem sendo apontados como fatores determinantes para a distribuição das espécies autopoliploides estudadas até o momento: *Achillea millefolium, Arabidopsis thaliana, Biscutella laevigata, Chamerion angustifolium, Dactylis glomerata, Dactylorhiza maculata, Senecio carniolicus* e *Tolmiea menziesii (*Spoelhof et al 2017). De maneira semelhante, fatores abióticos, sobretudo a disponibilidade água, parece ser um dos fatores para explicar a distribuição da linhagem autotetraploide de *L. ferrea*.

Populações autopoliploides podem apresentar discrepância quanto a proximidade geográfica do novo poliploide formado e seu progenitor (Segraves et al 1999; Van Dijk & Bakx-Schotman 1997). Para *Heuchera grossulariifolia* - Saxifragaceae, foram encontradas sete origens distintas de indivíduos poliploides, dentre elas, apenas duas mostraram congruência geográfica e ao mesmo tempo, populações tetraploides foram encontradas com diferentes origens e além de haplótipos exclusivos. No que se refere às origens de *L. ferrea*, constatamos que as populações tetraploides estiveram localizadas relativamente próximas aos seus prováveis progenitores diploides, com exceção da tetraploide SEC que se encontra distante geograficamente da sua progenitora CEC. Para a última, é possível que não se tenha amostrado o indivíduo diploide mais próximo geograficamente. Além disso, populações tetraploides foram encontradas com haplótipos exclusivos oriundos de outros haplótipos por poucos passos mutacionais, o que sugerem sua diversificação dentro dessas populações. E de forma semelhante ao exemplo com *H. grossulariifolia* origens distintas puderam ser encontradas dentro de uma mesma população tetraploide. Apesar da limitada capacidade de dispersão da espécie, parece haver grande fluxo entre elas, embora a proximidade em vários casos pode sugerir que essa origem aconteceu em diferentes momentos de tempo. Além disso, a diversificação de haplótipos encontrada dentro de populações tetraploides coloca a poliploidia com importante papel evolucionário, o que contraria a idéia de indivíduos poliploides como "*Dead end*" (Mayrose et al 2011).

Padrões filogeográficos

O haplótipos H3, de ambos os marcadores analisados, estiveram abundantemente distribuídos em toda a área de ocorrência *L. ferrea* e presente tanto em áreas de floresta Atlântica como em áreas de florestas secas. Sabe-se que a floresta Atlântica formava uma floresta continua e ainda mais extensa que as atuais antes do Mioceno médio, cerca de 10 Ma (Carvalho e Almeida 2011). Contudo, a partir do Plioceno, cerca de 5 Ma, com o início dos ciclos glaciais e interglaciais, houve a expansão das florestas com formações abertas tropicais estacionais secas da América do sul, incluindo as províncias biogeográfica da Caatinga, do Cerrado e o Chaco (Ab' Sáber, 1977; Silva, 1995; Silva et al. 2017). A datação molecular indica que *L. ferrea* começou a se diversificar há cerca de 6 Ma, com o subclado do haplótipo H3 passando por nova diversificação há aproximadamente 3 Ma, período que coincide com o período de mudanças climáticas e expansões das florestas secas. Dessa forma, a estrutura encontrada pode ser consequência de conexões pretéritas entre essas áreas.

Acredita-se que as oscilações climáticas do período quaternário se comportaram como um gatilho para os processos de diversificação e especiação. O clima seco e as glaciações podem ter favorecido a expansão de algumas espécies enquanto outras estiveram restritas em áreas conhecidas como refúgios. A exemplo a espécie autopoliploide *Aucuba japonica* (Ohi et al 2003). Os autores encontraram um haplótipo exclusivamente tetraploide e amplamente distribuídos nessas populações e, com o auxilio de dados de tempo de divergência associaram o surgimento dele ao de mudanças associadas a adaptação ao gelo durante o período quaternário, marcado por períodos cobertos por gelo e vários ciclos de expansão e contração da vegetação. Além disso foi possível identificar a presença de várias áreas de refúgio ao longo da distribuição da espécie. Nossa datação molecular mostrou que o haplótipos H1 encontrado na espécie *L. ferrea*, exclusivamente em populações tetraploides – todas as analisadas – se diversificou a aproximadamente 1,5 Ma, que coincide com as oscilações climáticas no período Pleistoceno. Além disso, os dados encontrados para a espécie *L. ferrea* apontam que os indivíduos tetraploides colonizaram áreas de floresta seca, localizadas na região central de distribuição da espécie. Esse comportamento sugere que a linhagem H1 tenha surgido em resposta a oscilações climáticas e tenha conseguido se adaptar a essa faixa antes não habitadas por seus progenitores (capítulo 1 desta tese).

Quando se avaliam as reconstruções filogenética, outro achado interessante diz respeito às possíveis rotas de colonização de *L. ferrea*. De acordo com a última classificação do gênero, três espécies de *Libidibia*, incluindo *L. ferrea*, ocorrem na América do Sul, sendo

as outras duas: *L.* paraguariensis, ocorrente na região do Chaco (Paraguai e Argentina) e *L. punctata* (Willd.) Britton, ocorrente na Venezuela (Gagnon et al. 2016). Nossa datação molecular aponta que os haplótipos localizados mais ao Sul do Brasil se diversificaram primeiro. Entretanto, esse achado não indica que a rota de colonização tenha se dado pelo sul, uma vez que não encontramos centros de diversidade genética em nenhum dos extremos da distribuição. Ambas as regiões mostraram diversidade alta e similar. Em contrapartida, temos indícios que a colonização pode ter se dado pela região norte, onde, de acordo com a filogenia mais recente do gênero, a espécie irmã *L. punctata* (E. Gangnon, com. pessoal) ocorre na porção mais ao norte, na Venezuela, e poderia ter chegado através da conexão da Amazônia com a floresta Atlântica.

CONCLUSÕES

Para a espécie autopoliploide *Libidibia ferrea* encontramos através dos marcadores analisados três eventos distintos de poliploidização. Essa formação recorrente parece ter contribuído para a seleção daquelas linhagens mais adaptadas ao cenário climático de florestas secas, onde as populações tetraploides estão estabelecidas. Dentro das populações poliploides, a presença de múltiplas linhagens indica alto fluxo gênico passado, apesar da limitada capacidade de dispersão da espécie. Além disso, a presença de muitos haplótipos exclusivos e oriundos de outros, a poucos passos mutacionais, sugere que a poliploidia não é um "*dead end"* evolucionário. A distribuição dos haplótipos indicam conexão pretérita entre as áreas. A datação realizada por nós indica que a poliploidia pode ter surgido como resposta às oscilações climáticas do pleistoceno e que contribuiu para a colonização de áreas não ocupadas por seus progenitores. Nossos resultados indicam que a rota de colonização via norte-sul de *L. ferrea*, devido a localização do grupo irmão da espécie (*L. punctata*).

REFERENCIAS

BAACK, E.J. 2004. Cytotype segregation on regional and microgeographic scales in snow buttercups (*Ranunculus adoneus* : Ranunculaceae). *American Journal of Botany* 91: 1783–1788.

BANDELT, H.J., P. FORSTER, and A. RÖHL. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.

BORGES, L.A., L.G.R. SOUZA, M. GUERRA, I.C. MACHADO, G.P. LEWIS, and A.V. LOPES. 2012. Reproductive isolation between diploid and tetraploid cytotypes of Libidibiaferrea (= Caesalpinia ferrea) (Leguminosae): ecological and taxonomic implications. *Plant Systematics and Evolution* 298: 1371–1381.

CHASE, M.W., and H.H. HILLS. 1991. Silica Gel: An Ideal Material for Field Preservation of Leaf Samples for DNA Studies. *Taxon* 40: 215–220.

DIJK, P.V., and T. BAKX-SCHOTMAN. 1997. Chloroplast DNA phylogeography and cytotype geography in autopolyploid Plantago media. *Molecular Ecology* 6: 345–352.

DIJK, P.V., M. HARTOG, and D.V. WILKE. 1992. Single cytotype areas in autopolyploid Plantago media L. *Biological Journal of the Linnean Society* 46: 315–331.

DONG, W., C. XU, C. LI, J. SUN, Y. ZUO, S. SHI, T. CHENG, ET AL. 2015. ycf1, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific Reports* 5: . Available at: http://www.nature.com/articles/srep08348 [Accessed January 31, 2019].

DOYLE, J.J., J.L. DOYLE, J.L. DOYLE, J. DOYLE, J.J. DOYLE, J. DOYLE, J.J. DOYLE, ET AL. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. Available at: https://www.scienceopen.com/document?vid=1cd6f3da-bc63-466b-9990-270af0960e2a [Accessed January 31, 2019].

DRUMMOND, A.J., M.A. SUCHARD, D. XIE, and A. RAMBAUT. 2012. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969–1973.

EXCOFFIER, L., and H.E. LISCHER. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources* 10: 564–567.

FERREIRA, M.E., and D. GRATTAPAGLIA. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA. Available at: http://rgdoi.net/10.13140/2.1.3757.8881 [Accessed February 13, 2019].

FÖRSTER, J., I. FAMILI, P. FU, B.Ø. PALSSON, and J. NIELSEN. 2003. Genome-Scale Reconstruction of the Saccharomyces cerevisiae Metabolic Network. *Genome Research* 13: 244–253.

FU, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.

GAGNON, E., A. BRUNEAU, C.E. HUGHES, L. DE QUEIROZ, and G.P. LEWIS. 2016. A new generic system for the pantropical Caesalpinia group (Leguminosae). *PhytoKeys* 71: 1–160.

GRANT, V. 1981. Plant Speciation. Columbia University Press. New York.

GRIZ, L.M.S., and I.C.S. MACHADO. 2001. Fruiting phenology and seed dispersal syndromes in caatinga, a tropical dry forest in the northeast of Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 17: 303–321.

GUILLOT, G., F. MORTIER, and A. ESTOUP. 2005. Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5: 712–715.

HALVERSON, K., S.B. HEARD, J.D. NASON, and J.O. STIREMAN. 2008. Origins, distribution, and local co-occurrence of polyploid cytotypes in *Solidago altissima* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 95: 50–58.

HUSBAND, B.C., and H.A. SABARA. 2004. Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, Chamerion angustifolium (Onagraceae). *New Phytologist* 161: 703–713.

HUSBAND, B.C., and D.W. SCHEMSKE. 1998. Cytotype distribution at a diploid–tetraploid contact zone in Chamerion (Epilobium) angustifolium (Onagraceae). *American Journal of Botany* 85: 1688–1694.

JIAO, Y., N.J. WICKETT, S. AYYAMPALAYAM, A.S. CHANDERBALI, L. LANDHERR, P.E. RALPH, L.P. TOMSHO, ET AL. 2011. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* 473: 97–100.

KEARSE, M., R. MOIR, A. WILSON, S. STONES-HAVAS, M. CHEUNG, S. STURROCK, S. BUXTON, ET AL. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 28: 1647–1649.

KUMAR, S., G. STECHER, and K. TAMURA. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874.

LEVIN, D.. 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. The American Naturalist.

LEWIS, G.., B. SCHIRE, B. MACKINDER, and M. LOCK. 2005. Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew.

LIRA, C.F., S.R.S. CARDOSO, P.C.G. FERREIRA, M.A. CARDOSO, and 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.

MASTERSON, J. 1994. Stomatal Size in Fossil Plants: Evidence for Polyploidy in Majority of Angiosperms. *Science* 264: 421–424.

MORRONE, J.J. 1994. On the Identification of Areas of Endemism. *SYSTEMATIC BIOLOGY*4.

N -G ELIADES, and D G ELIADES. 2009. HAPLOTYPE ANALYSIS: software for analysis of haplotype data. *Unpublished*. Available at: http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.2.19029.93922 [Accessed February 3, 2019].

OHI, T., T. KAJITA, and J. MURATA. 2003. Distinct geographic structure as evidenced by chloroplast DNA haplotypes and ploidy level in Japanese *Aucuba* (Aucubaceae). *American Journal of Botany* 90: 1645–1652.

OLIVEIRA, E.J., J.G. PÁDUA, M.I. ZUCCHI, R. VENCOVSKY, and M.L.C. VIEIRA. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294–307.

OLMSTEAD, R.G., and J.A. SWEERE. 1994. Combining Data in Phylogenetic Systematics: An Empirical Approach Using Three Molecular Data Sets in the Solanaceae. *Systematic Biology* 43: 467–481.

PARISOD, C., and G. BESNARD. 2007. Glacial in situ survival in the Western Alps and polytopic autopolyploidy in Biscutella laevigata L. (Brassicaceae). *Molecular Ecology* 16: 2755–2767.

PARISOD, C., R. HOLDEREGGER, and C. BROCHMANN. 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy: Research review. *New Phytologist* 186: 5–17.

PEDROSA, A., and J. GITAÍ. citogenética de angiospermas coletadas em pernambuco - vi. *Família*12.

PEIRSON, J.A., C.W. DICK, and A.A. REZNICEK. 2013. Phylogeography and polyploid evolution of North American goldenrods (Solidago subsect. Humiles, Asteraceae). *Journal of Biogeography* 40: 1887–1898.

PEIRSON, J.A., A.A. REZNICEK, and J.C. SEMPLE. Polyploidy, infraspecific cytotype variation, and speciation in Goldenrods: The cytogeography of Solidago subsect. Humiles (Asteraceae) in North America. 21.

PETIT, NULL, NULL BRETAGNOLLE, and NULL FELBER. 1999. Evolutionary consequences of diploid-polyploid hybrid zones in wild species. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 306–311.

POSADA, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253–1256.

QUEIROZ, L.. 2009. Leguminosas da Caatinga. Editora da Universidade Estadual de Feira de Santana.

RAMOS, A.C.S., J.P. LEMOS-FILHO, R.A. RIBEIRO, F.R. SANTOS, and M.B. LOVATO. 2007. Phylogeography of the Tree Hymenaea stigonocarpa (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the Influence of Quaternary Climate Changes in the Brazilian Cerrado. *Annals of Botany* 100: 1219–1228.

RAMSEY, J., and D.W. SCHEMSKE. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 467–501.

RIBEIRO, R.A., J.P. LEMOS-FILHO, A.C.S. RAMOS, and M.B. LOVATO. 2011. Phylogeography of the endangered rosewood Dalbergia nigra (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 106: 46–57.

RONQUIST, F., M. TESLENKO, P. VAN DER MARK, D.L. AYRES, A. DARLING, S. HÖHNA, B. LARGET, ET AL. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.

ROZAS, J. DnaSP v6. Documentation. 112.

SANG, T., D.J. CRAWFORD, and T.F. STUESSY. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84: 1120–1136.

SEGRAVES, K.A., J.N. THOMPSON, P.S. SOLTIS, and D.E. SOLTIS. 1999. Multiple origins of polyploidy and the geographic structure of *Heuchera grossulariifolia*. *Molecular Ecology* 8: 253–262.

SERVICK, S., C.J. VISGER, M.A. GITZENDANNER, P.S. SOLTIS, and D.E. SOLTIS. 2015. Population genetic variation, geographic structure, and multiple origins of autopolyploidy in Galax urceolata. *American Journal of Botany* 102: 973–982.

SHAW, J., E.B. LICKEY, E.E. SCHILLING, and R.L. SMALL. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275–288.

SOLTIS, NULL, and NULL SOLTIS. 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 348–352.

SOLTIS, D.E., P.S. SOLTIS, and J.A. TATE. 2003. Advances in the study of polyploidy since Plant speciation: Research review. *New Phytologist* 161: 173–191.

SOLTIS, D.E., C.J. VISGER, and P.S. SOLTIS. 2014. The polyploidy revolution then...and now: Stebbins revisited. *American Journal of Botany* 101: 1057–1078.

SPOELHOF, J.P., P.S. SOLTIS, and D.E. SOLTIS. 2017. Pure polyploidy: Closing the gaps in autopolyploid research: Pure polyploidy. *Journal of Systematics and Evolution* 55: 340–352.

STEANE, D.A., R.C. JONES, and R.E. VAILLANCOURT. 2005. A set of chloroplast microsatellite primers for Eucalyptus (Myrtaceae). *Molecular Ecology Notes* 5: 538–541.

STEBBINS, G. 1950. Variation and evolution in plants. Columbia University Press. New York.

STEBBINS, G.L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. *Chromosomal evolution in higher plants*. Available at: https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19711606614 [Accessed January 31, 2019].

TABERLET, P., L. GIELLY, G. PAUTOU, and J. BOUVET. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.

TAJIMA, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.

TURCHETTO-ZOLET, A.C., F. PINHEIRO, F. SALGUEIRO, and C. PALMA-SILVA. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology* 22: 1193–1213.

VAN DIJK, P., and T. BAKX-SCHOTMAN. 1997. Chloroplast DNA phylogeography and cytotype geography in autopolyploid Plantago media. *Molecular Ecology* 6: 345–352.

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. 42: 11.

Tabela 1. Populações analisadas de *Libidibia ferrea* (Leguminosae), com código dado a população, número de indivíduos utilizados para cada marcador (N), coordenadas geográficas, nível de ploidia e domínio fitogeográfico. Nh - Número de haplótipos encontrados por população; Hap - diversidade haplotípica por população; Nu - diversidade nucleotídica por população da espécie *L. ferrea*. Os valores para o conjunto total de dados, soma de todas as populações, encontra-se no final desta tabela.

Populações/estado	Sigla	N (ssr)	N (cp)	Latitude	Longitude	Nível de ploidia	Domínio	Nh (ssr)	nh (cp)	Hap (ssr)	hap (cp)	Nu
Piranhas Novas/AL	ALP	14	9	-9.62361	-37.7567	Tetraploide	Caatinga	3	1	0,657	0	0
Paulo Afonso/BA	BA	7	5	-9.53896	-38.03749	Tetraploide	Caatinga	3	4	0,667	0.900	0.0030
Caucaia/CE	CEC	10	6	-3.75536	-38.639137	Diploide	Tabuleiro	4	3	0,694	0.733	0.0018
Guaramiranga/CE	CEG	11	6	-4.22629	-38.96139	Diploide	Brejo de Altitude	1	1	0,000	0,000	0
Pentecoste/CE	CEP	1	1	-3.831334	-39.282051	Diploide	Caatinga	1	1	0,429	0,000	0
Crateús/CE	CES	15	7	-5.1165	-40.87274	Diploide	Caatinga	4	2	0,200	0.476	0.0018
Alagoinha/PE	PEA	10	**	-8.48227	-36.79004	Tetraploide	Caatinga	2	**	0,500	**	**
Catimbau/PE	PEC	10	**	-8.094535	-39.575884	Mista	Caatinga	2	**	0,200	**	**
Parnamirim/PE	PEP	8	5	-8.094535	-39.575884	Tetraploide	Caatinga	2	2	0,900	0.400	0.0003
Pesqueira/PE	PEA	7	**	-8.353924	-36.693663	Mista	Caatinga	1	**	0,556	**	**
Santa Rita/PB	PBM	15	7	-7.127642	-34.953066	Diploide	floresta Atlântica	3	1	0,667	0,000	0
São José dos Cordeiros/PB	PBA	19	7	-7.466564	-36.833950	Tetraploide	Caatinga	3	2	0,511	0.476	0.0004
Mataraca/PB*	PBMA*	8	11	-6.592844	-35.058175	Diploide	Restinga	2	2	0,182	0.509	0.0019
Campo dos Goytacazes/RJ	RJ	9	6	-21.37001	-41.929997	Diploide	Flor. Estacional semi-decidual	4	3	0,556	0.733	0.0011
Canindé do São Francisco/SE	SEC	10	7	-9.59222	-37.93282	Tetraploide	Caatinga	3	3	0,511	0.523	0.0015
Pirapora/MG	MG	5	2	-17.273488	-44.860923	Diploide	Caatinga	4	1	0,900	0,000	0
Linhares/ES	ESL	10	6	-19.10905	-39.8918	Diploide	floresta Atlântica	2	2	0,200	0.333	0.0006
Todas as populações		**169**	**85**					**22**	**10**	**0,385**	**0,7966**	

Tabela 2. Frequência (F), nível de ploidia (P) e descrição dos 10 haplótipos encontrados para *Libidibia ferrea* (Leguminosae) a partir da análise dos dados das regiões *ndh*f e *ycf*1 combinadas.

Ndhf + Ycf1			48	102	257	363	681	712	763	854	856	937	986	1025	1043
H	**F**	**P**													
H1	20	T	-	C	C	C	T	T	A	T	G	G	C	G	T
H2	18	D/T	-	A	T	C	T	T	G	T	A	A	C	G	T
H3	27	D/T	-	C	C	C	T	T	G	T	G	G	C	G	T
H4	1	T	-	C	C	C	T	T	G	G	G	G	C	G	T
H5	4	D/T	-	A	T	C	T	T	G	T	G	A	C	G	T
H6	6	D	-	A	T	A	T	T	G	T	G	A	C	G	T
H7	1	D	A	A	T	C	T	A	G	T	G	A	A	G	T
H8	1	D	-	C	C	C	T	T	G	T	G	G	C	G	G
H9	5	D	-	C	C	C	G	T	G	T	G	G	C	A	T
H10	2	D	A	C	C	C	G	T	G	T	G	G	C	A	T

Tabela 3. Frequência (F), nível de ploidia (P) e descrição dos 22 haplótipos encontrados para *Libidibia ferrea* (Leguminosae) a partir da análise de quatro locos de cpSSR.

SSRcp			*locus*			
H	**F**	**P**	*1*	*2*	*3*	4
H1	1	T	100	139	137	261
H2	1	T	100	139	137	262
H3	55	D/T	100	139	139	256
H4	1	D	100	139	139	262
H5	5	D	100	139	140	256
H6	1	D	100	140	138	256
H7	1	D	100	140	139	256
H8	5	D	100	140	139	261
H9	9	D	100	140	140	262
H10	1	D	100	141	140	261
H11	47	D/T	101	139	139	256
H12	1	D	101	140	138	260
H13	1	T	101	140	140	256
H14	1	D	101	140	140	261
H15	1	D	101	140	160	261
H16	2	D	101	141	140	268
H17	7	D	101	142	140	268
H18	1	D	102	139	134	212
H19	1	D	98	139	138	260
H20	3	D	98	139	138	261
H21	1	T	98	139	139	256
H22	23	D/T	98	140	138	260

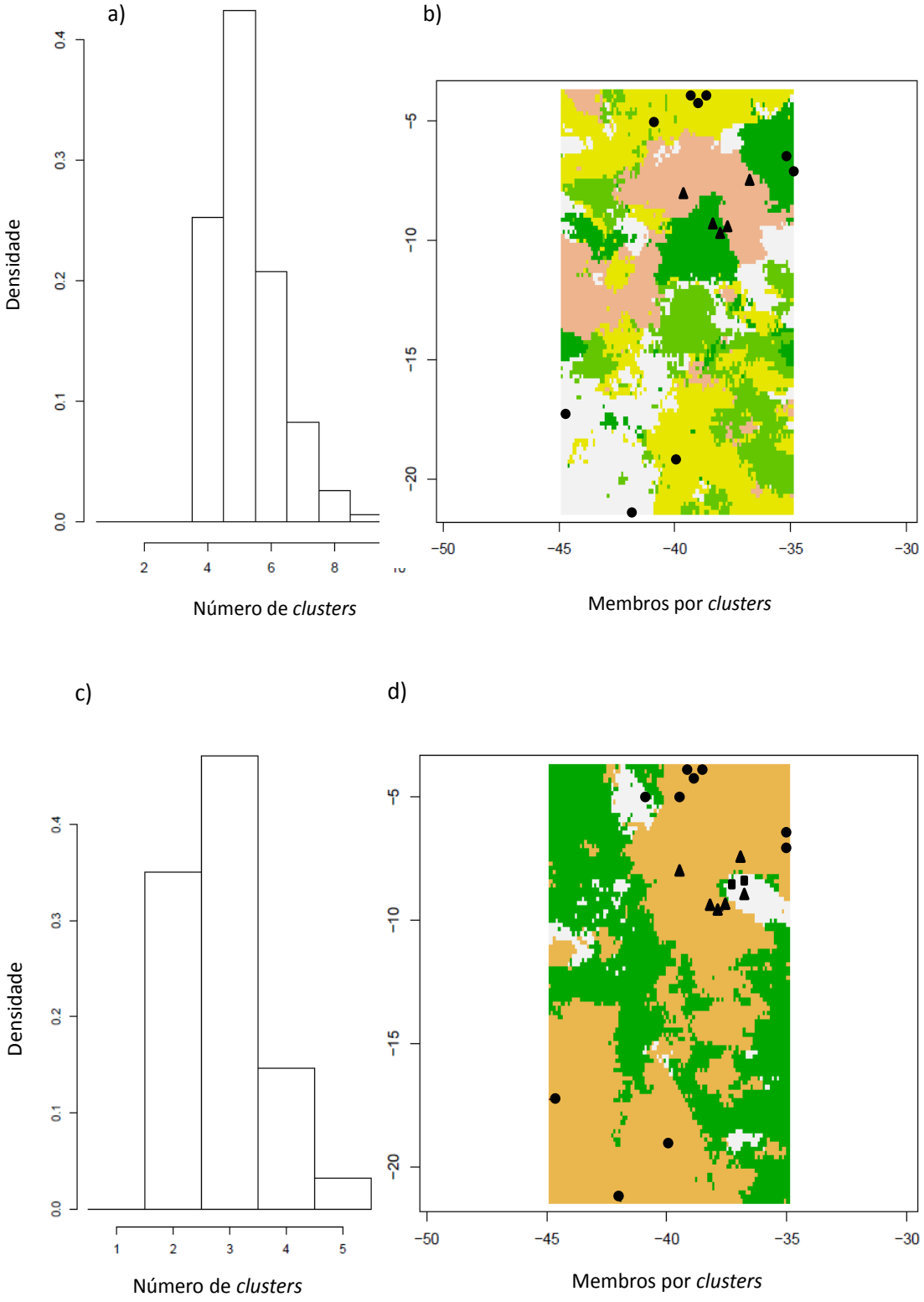

Figura 1**.** Número de *clusters* formados a partir do programa GENLAND mostrando os agrupamentos genéticos das populações de *Libidibia ferrea* no espaço geográfico. (a) Números mais prováveis de grupos formados com o conjunto de dados utilizando os marcadores *ndh*F e *ycf*1- *ycf*2. (b) Apresentação geográfica dos grupos formados a partir de dados com os marcadores *ndh*F e *ycf*1- *ycf*2. (c) Números mais prováveis de grupos formados com o conjunto de dados utilizando os marcadores SSR. (d) Apresentação geográfica dos grupos formados a partir de dados com os marcadores SSR. Os círculos indicam populações diploides da espécie, os triângulos populações tetraploides e os quadrados áreas onde os dois citótipos coocorrem.

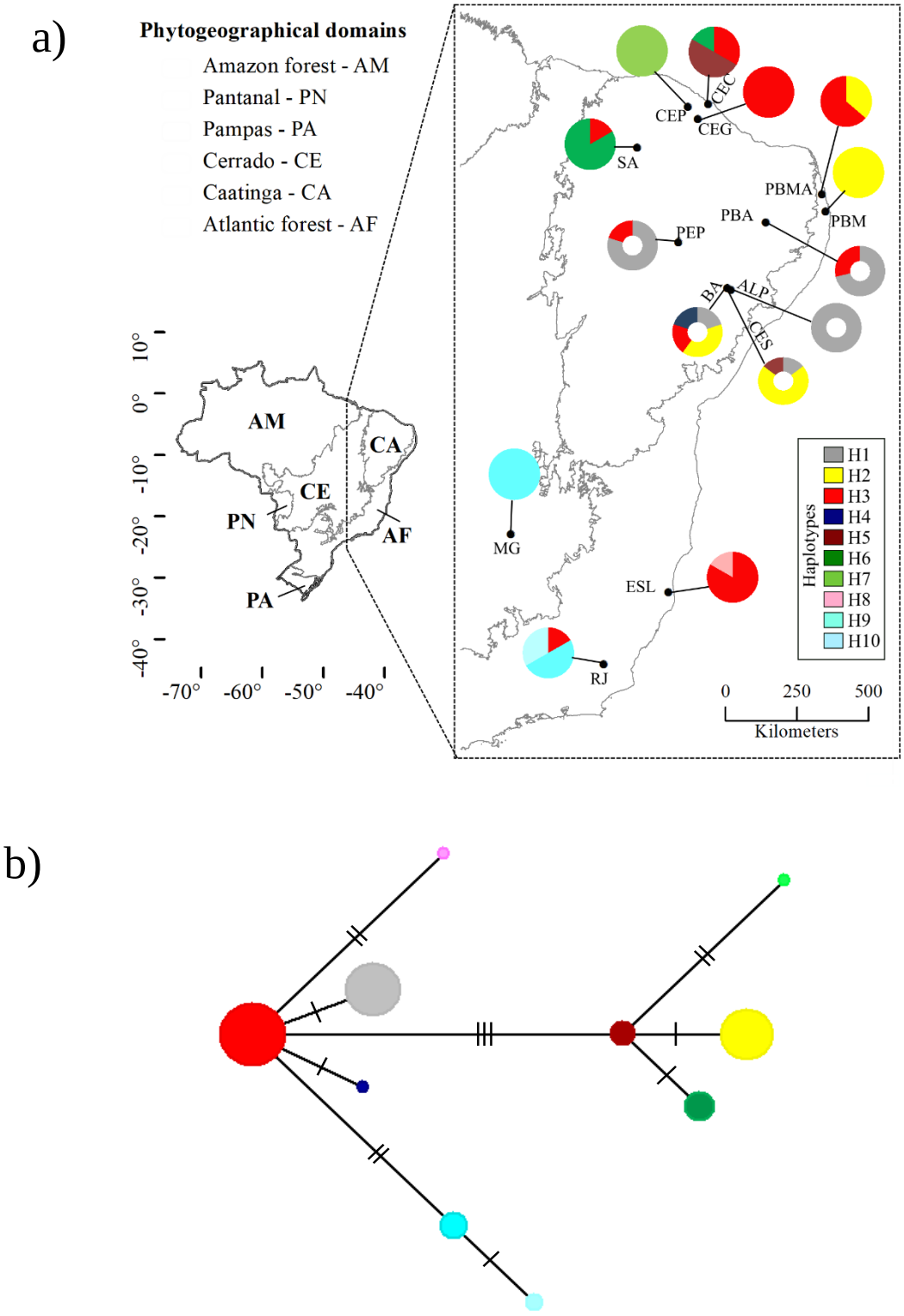

Figura 2. Distribuição e origem dos haplótipos de cpDNA de *Libidibia ferrea*. a) Mapa de distribuição das populações e haplótipos. b) Rede de haplótipos. Para cada haplótipo uma cor foi atribuída. Os círculos são proporcionais ao número de indivíduos encontrados para cada haplótipo. Os círculos fechados correspondem a populações diploides enquanto os abertos às populações tetraploides. O código de cada população é indicado no mapa. As linhas entre os círculos representam o número de passos mutacionais entre os haplótipos.

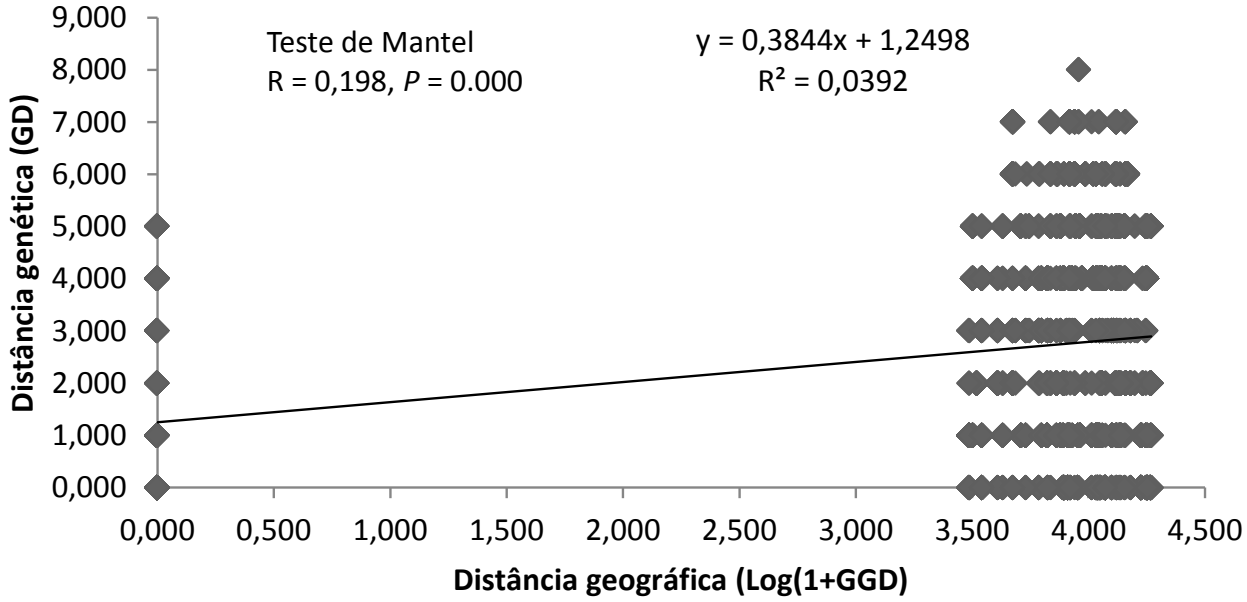

Figura 3. Teste de Mantel correlacionando a distância genética e geográfica entre todos os indivíduos de *L. ferrea* ao longo da sua área de ocorrência.

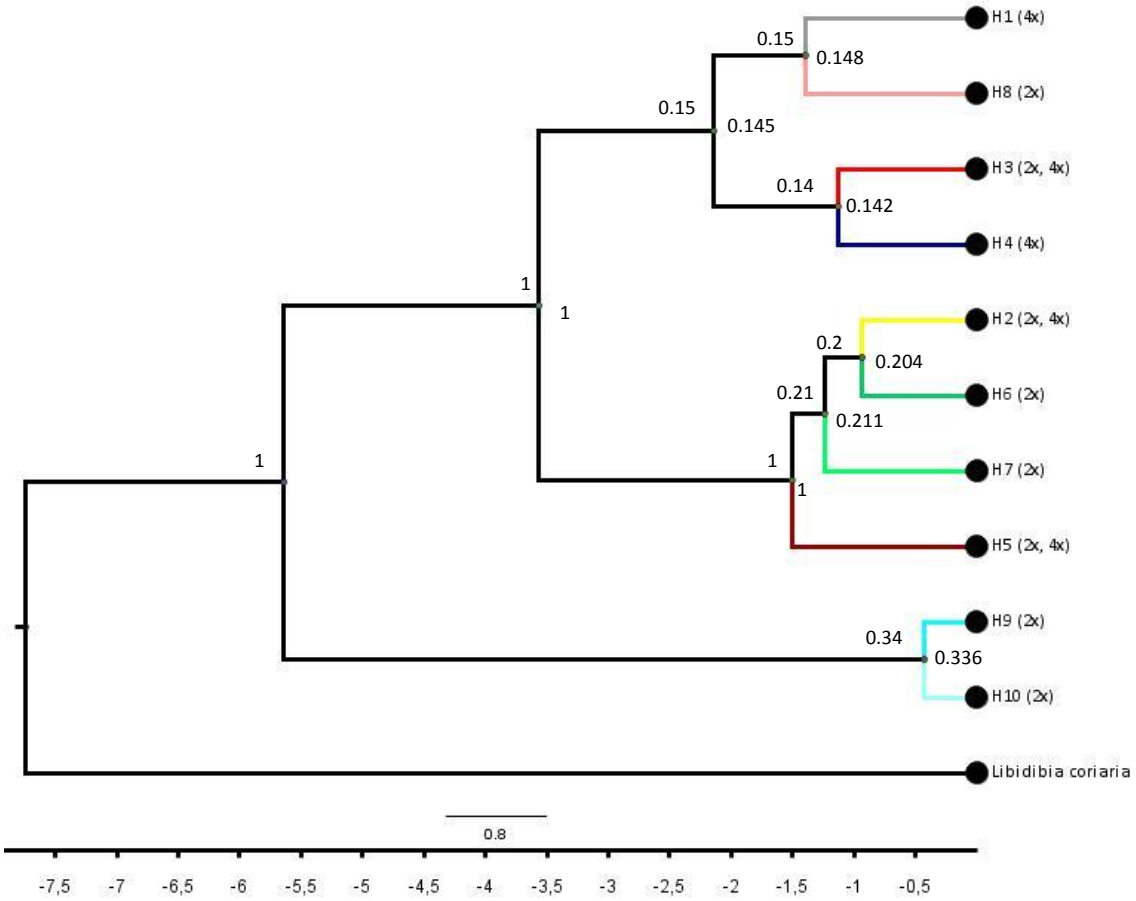

Figura 4. Árvore filogenética datada dos haplótipos de *Libidibia ferrea* baseada em duas regiões plastidiais concatenadas *ndh*f e *ycf*1. *Libidibia coriaria* foi utilizada como grupo externo e enraizada a árvore. Acima dos ramos está indicada a probabilidade a posteriori da inferência Bayesiana. Os ramos terminais estão indicados com as cores de cada haplótipo.

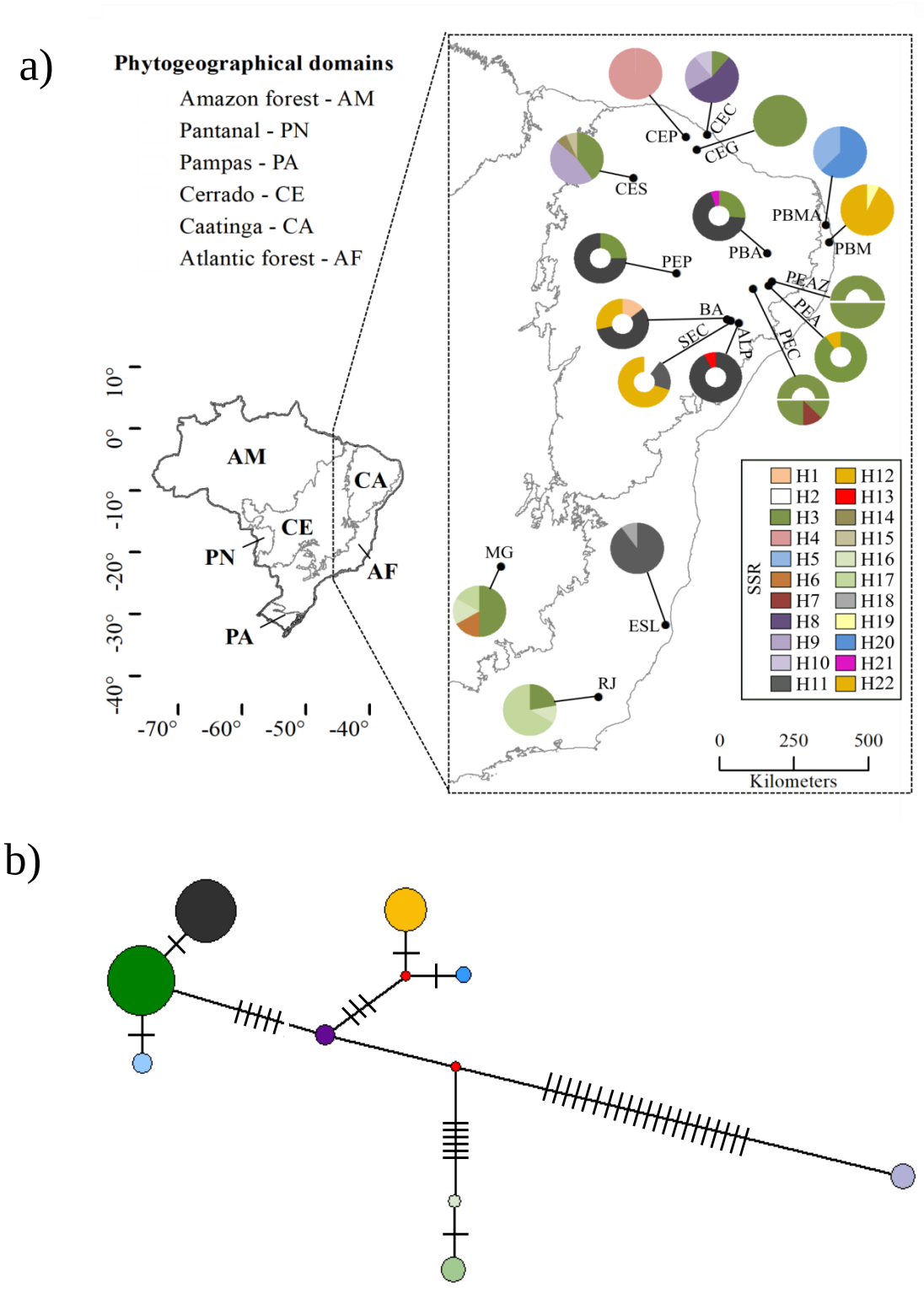

Figura 5 Distribuição e origem dos haplótipos de SSRcp de *Libidibia ferrea* – Leguminosae: a) Mapa de distribuição das populações e haplotipos da espécie *L. ferrea*. b) Rede de haplótipos gerada através programa *network* pelo método *median joining* a partir dos dados SSRcp. Para cada haplótipo uma cor foi atribuída. Os círculos são proporcionais ao número de indivíduos encontrados para cada haplótipo. Os círculos fechados correspondem a populações diploides, os abertos as populações tetraploides. Populações mistas estão representadas pelos dois símbolos. O código de cada população aparece plotado no mapa. As linhas entre os círculos representam o número de passos mutacionais entre os haplótipos e os círculos vermelhos correspondem aos vetores médios, quando um haplótipo não foi amostrado ou extinto.

MATERIAL SUPLEMENTAR

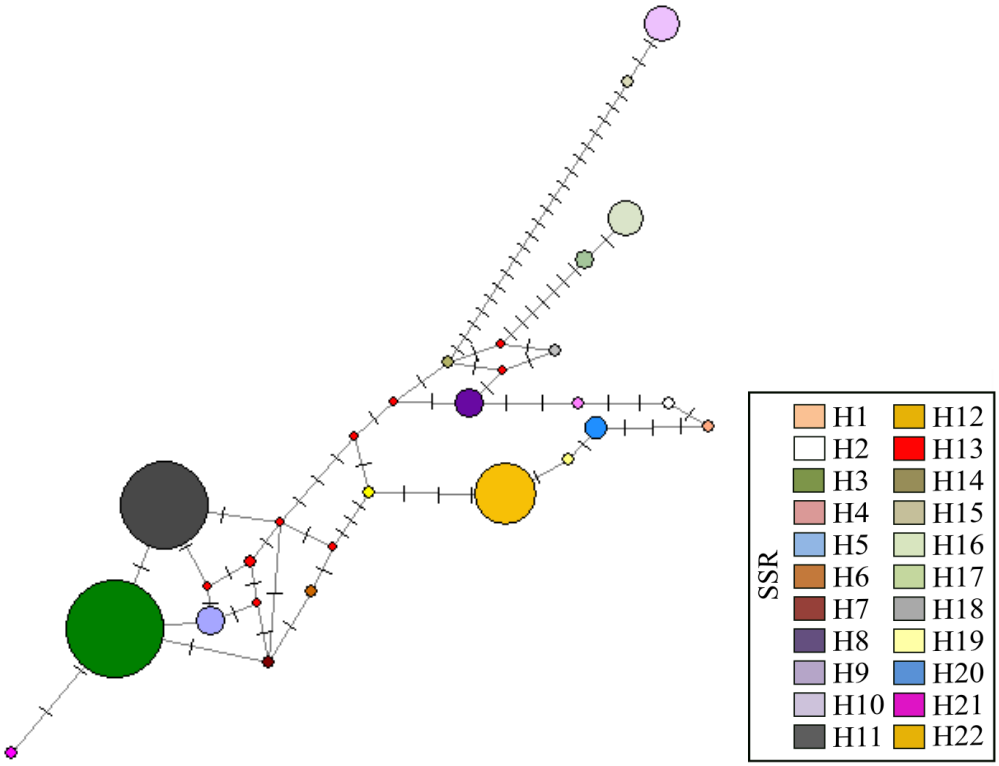

Figura 1. Rede de haplótipos completa para os dados SSRcp de *Libidibia ferrea* - Leguminosae. Para cada haplótipo uma cor foi atribuída. Os círculos são proporcionais ao número de indivíduos encontrados para cada haplótipos. As linhas entre os círculos representam o número de passos mutacionais entre os haplótipos. Os pontos em vermelho são vetores médios.

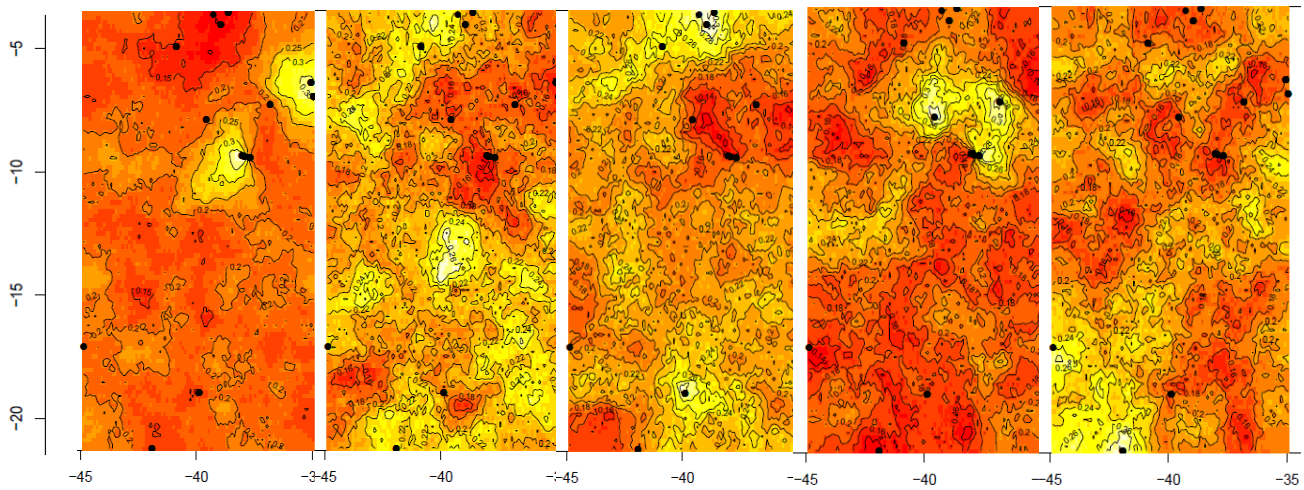

Figura 2 *Clusters* das populações de *Libidibia ferrea* formados a partir do programa GENLAND utilizando os marcadores *ndh*F e *ycf*1- *ycf*2. As imagens representam, respectivamente, da esquerda para direita os cinco agrupamentos genéticos possíveis para as populações (k = 1, k = 2, k = 3, k = 4 e k = 5) no espaço geográfico.

5 CONCLUSÕES

1. Populações diploides e tetraploides da espécie *Libidibia ferrea* apresentaram-se separadas espacialmente, com uma pequena zona de contato. Como as populações tetraploides estiveram presentes nesta faixa restrita entre populações diploides, concluímos que essas ocupam áreas antes inabitadas por seus progenitores.

2. Indivíduos tetraploides da espécie *Libidibia ferrea* apresentaram características anatômicas que permitem a otimização do uso da água e assim, maior adaptação a ambientes áridos. Esse fato pode ter servido como facilitador no estabelecimento das novas populações tetraploides.

3. Foi observada contração de nicho nas populações tetraploides da espécie *L. ferrea*, o que pode estar associado à limitada capacidade de dispersão da espécie e seu longo ciclo de vida.

4. As variedades da espécie não estiveram correlacionadas *L. ferrea* com o nível de ploidia e o tamanho dos folíolos não é indicativo de nível de ploidia. Dessa forma, não é recomendada elevação de variedades de *L. ferrea* ao nível de espécie uma vez que as variedades e citótipos não possuem nichos distintos e nem características morfológicas que diferenciem os indivíduos com níveis de ploidia distintos.

5. Nossos dados moleculares apontam que a poliploidia surgiu três vezes na espécie *L. ferrea*. Essas múltiplas origens pode ter contribuído para a seleção de linhagens mais adaptadas e contribuído para a descoberta de áreas antes não ocupadas por seus progenitores.

6. Nossa datação molecular apontou que a espécie *L. ferrea* começou a se diversificar a cerca de 6 Ma, período que coincide com o Plioceno, e início dos ciclos glaciais e interglaciais. Além disso, a ausência de estruturação dos haplótipos indica que antes desse períodos as áreas estiveram conectadas.

7. Nova diversificação também é observada após esse período, cerca de 3 Ma, o que aponta influencia também do período quaternário na distribuição da espécie *L. ferrea*, com provável origem poliploide como resposta a essas mudanças.

8. Através dos nossos dados podemos inferir a rota de colonização da espécie *L. ferrea* tanto sul-norte, como norte-sul. Entretanto, acreditamos que tenha se dado via norte-sul pela proximidade com seu grupo irmão.

REFERENCIAS

Avise 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Cambridge, MA: Harvard University Press. http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=lA7YWH4M8FUC&oi=fnd&pg=PA1&dq=phylogeography&ots=LvtP27mOaQ&sig=Hwppf0A7MZ_4U4fGSYKW_pbGg6I#v=onepage&q=phylogeography&f=false (acesso em 12/10/2015).

Baack, E.J. 2004. Cytotype segregation and regional and microgeographic scales in snow buttercups (*Ranunculus adoneus*: Ranunculaceae). **American Journal of Botany** 91(11): 1783–1788.

Beltrão, G.T.A.; Guerra, M. 1990. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco – III. **Ciência e Cultura 42**: 839-845.

Borges, L.A.; Souza, L.G.R.; Guerra, M.; Machado, I.C.; Lewis, G.P.; Lopes, A.V. 2012. Reproductive isolation between diploid and tetraploid cytotypes of *Libidibia ferrea* (= *Caesalpinia ferrea*) (Leguminosae): ecological and taxonomic implications. **Plant Systematics and Evolution**, Published online: 05 May 2012 Published online: 05 May 2012 (DOI: 10.1007/s00606-012-0643-3).

Felber, F. 1991. Establishment of a tetraploid cytotype in a diploid population: Effect of relative fitness of the cytotypes. **Journal of Evolutionary Biology 4**: 195-207.

Fowler, N.L., and D.A. Levin. 1984. Ecological constraints on the establishment of a novel polyploid in competition with its diploid progenitor. **Am. Nat.** 124: 703-711.

Grant, V. 1981. **Plant Speciation**. Columbia University Press. New York.

Halverson, K., Heard, S.B., Nason, J.D. & Stireman, J.O. (2008) Origins, distribution, and local co-occurrence of polyploid cytotypes in *Solidago altissima* (Asteraceae). **American Journal of Botany**, 95, 50–58.

Husband, B. C. & H. A. Sabara. 2003. Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). **New Phytologist 161**: 703–713.

Husband , B. C. , and D. W. Schemske . 1998. Cytotype distribution at a diploid tetraploid contact zone in *Chamerion (Epilobium) angustifolium* (Onagraceae). American Journal of Botany 85: 1688 – 1694.

Husband, B.C.; Schemske, D.W. 2000. Ecological mechanisms of reproductive isolation between diploid and tetraploid *Chamerion angustifolium*. **Journal of Ecology 88**: 689–701.

Jiao, Y. et al. 2011. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. **Nature 473**: 97-100.

Levin, D.A. 1975. Minority Cytotype Exclusion in Local Plant Populations. **Taxon 24**: 35-43.

Levin, D.A. 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. **The American Naturalist 122**: 1-25.

Levin, D.A. 2000. The Origin, Expansion, and Demise of Plant Species. Oxford University Press, New York.

Lewis, G. P.; Schire, B., Mackinder, B.; Lock, M. 2005. **Legumes of the world**. Royal Botanic Gardens, Kew.

Masterson, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in Majority of Angiosperms. **Science 264**: 421-424.

Mayrose , I. , S. H. Zhan , C. J. Rothfels , K. Magnuson-Ford , M. S. Barker , L. H.Rieseberg , and S. P. Otto . 2011. Recently formed polyploid plants diversify at lower rates. *Science* 333: 1257 .

Otto, S. P., AND J. Whitton. 2000. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics 34**: 401-437.

Peirson, J.A., Reznicek, A.A. & Semple, J.C. (2012) Polyploidy, infraspecific cytotype variation, and speciation in goldenrods: the cytogeography of *Solidago* subsect. *Humiles* (Asteraceae) in North America. **Taxon,** 61, 197–210.

Petit, C., Lesbros, P., Ge, X., Thompson, J.D. 1997. Variation in flowering phenology and selfing rate across a contact zone between diploid and tetraploid *Arrhenatherum elatius* (Poaceae). **Heredity** 79 (1997): 31- 40.

Petit C; Bretagnolle F,; Felber F. 1999. Evolutionary consequences of diploid-polyploid hybrid zones in wild species. **Trends in Ecology and Evolution** 14: 306–311.

Queiroz, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. 2009. Editora da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Ramsey J. & Schemske D.W. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploidy formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics 29**: 467-501.

Reisemberg, L.H.; WILLIS, J.H. 2007. Plant Speciation. **Science 317:** 910-15.

Segraves, K.A.; Thompson, J. N. 1999. Plant polyploidy and pollination. Floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. Evolution 53: 1114–1127.

Stebbins, G.L. 1971. **Chromosomal Evolution in HigherPlants.** Addison-Wesley, London.

Soltis, D.E; Soltis, P.S. 2012. **Polyploidy and Genome Evolution**. Springer, Berlin Heidelberg.

Soltis,D.E., Soltis, P.S., Schemske, D.W., Hancock, J.F., Thompson, J.N., Husband, B.C., Juddl, W.S. 2007. Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? **Taxon** 56 (1).

Soltis, D. E. , C. J. Visger , and P. S. Soltis . 2014. The polyploidy revolution then...and now: Stebbins revisited. **American Journal of Botany** 101 :1057 – 1078 .

Tayalé, A.; Parisod, A. 2013. Natural Pathoways to polyploidy in plants and consequences for genome reorganization. **Cytogenetic and Genome Research 143**: 79-96.

Van dijk, P.; Bakx-schotman, T. 1997. Chloroplast DNA phylogeography and cytotype geography in autopolyploid *Plantago media*. **Molecular Ecology** 6: 345-352.

ANEXO A

NORMA DA REVISTA

Artigo 1. Plant Systematics and Evolution

https://www.academia.edu/4801416/Plant_Systematics_and_Evolution_Instructions_for_Authors

ANEXO B

NORMA DA REVISTA

Artigo 2. American Journal of Botany

https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/15372197/homepage/ForAuthors.html