



**Delimitação de espécies do complexo *Aspidosperma pyrifolium*
Mart. & Zucc. (Apocynaceae)**

Patrícia Aparecida Messias

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração Morfologia e Diversidade Vegetal.

BOTUCATU – SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Delimitação de espécies do complexo *Aspidosperma pyrifolium*
Mart. & Zucc. (Apocynaceae)**

Discente: Patrícia Aparecida Messias

Orientadora: Prof^a Dra. Ingrid Koch

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutora no Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Botânica), Área de
concentração Morfologia e Diversidade Vegetal.

BOTUCATU – SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Messias, Patrícia Aparecida.

Delimitação de espécies do complexo *Aspidosperma pyriforme* Mart. & Zucc. (Apocynaceae) / Patrícia Aparecida Messias. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Ingrid Koch
Capes: 20300000

1. Morfometria. 2. Filogenia. 3. Nicho (Ecologia). 4. Modelagem de dados. 5. Apocynaceae.

Palavras-chave: Análise Morfométrica; Coalescência; Filogenia; Modelagem de Nicho Ecológico; Similaridade de Nicho.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) pela concessão da bolsa de doutorado.

À Prof^ª. Dra. Ingrid Koch pela orientação, paciência, amizade e carinho durante todos esses nove anos de parceria. Você é muito especial, mãe acadêmica!

Aos meus colaboradores, Prof^º. Dr. Fábio Pinheiro, Prof^ª. Dr. Anete Pereira de Souza, e Dr. Alessandro Alves pelas discussões, ensinamentos e apoio. Ao Dr. Fábio de Matos Alves, colaborador, pela paciência e dedicação durante o período de bancada.

Às Bancas de qualificação e defesa pelas ótimas contribuições para trabalho.

Ao Apocygrupo e irmãs, Ana Laura Scudeler, Daniela Martins Alves e Andreza Pereira pelo apoio, amizade, troca de conhecimento e companheirismo. Em especial, a irmã mais velha e colaboradora Ana Carolina Devides Castello, pelas discussões principalmente no café da manhã, apoio, amizade, e grande dedicação.

A todos funcionários de herbários visitados e companheiros em viagens de campo realizadas.

À minha família que sempre acreditou e apoio meus sonhos. Esse título também é de vocês, mãe (Carminha) e pai (Gordinho)! Aos meus sobrinhos, Carsudo e Majú, quanta saudade senti de vocês durante esse período!

Ao meu companheiro, Carlos Eduardo, pelo apoio e amor incondicional!

Ao José Osvaldo, Zebinho, por todo carinho. Obrigada por deixar a gente chamar você de pai!

A todos e todas do Departamento de Botânica da UNICAMP por terem me acolhido tão bem, principalmente aos que viraram amigos. Nossa... E como eu fiz amigos!

Aos companheiros do curso de Pós-Graduação da UNESP de Botucatu, apesar da pouca convivência, sempre eram muito queridos, receptivos e prestativos.

Aos amigos e amigas companheiros de trabalho da escola, pelo apoio e amizade. Aos alunos e alunas, pela compreensão e carinho.

SUMÁRIO

Resumo	11
Abstract	12
Introdução Geral.....	13
Delimitação de Espécies.....	13
Modelo de estudo: <i>Aspidosperma pyriforme</i> Mart. & Zucc (APOCYNACEAE).....	15
Objetivos	16
Referências Bibliográficas.....	21
Capítulo I - Development and transferability of microsatellite markers for a complex of <i>Aspidosperma</i> Mart. & Zucc. (Apocynaceae) species from South American Seasonally Dry Tropical Forests	27
Abstract	28
1. Introduction.....	29
2. Material and Methods	30
2.1. <i>Population Sampling and DNA extraction</i>	30
2.2. <i>Genomic library building and primer design</i>	31
2.3. <i>Microsatellite validation and characterization</i>	31
3. Results	32
4. Discussion.....	33
Capítulo II - Delimitação do complexo <i>Aspidosperma pyriforme</i> Mart. & Zucc. (Apocynaceae).....	42
Resumo	42
Introdução.....	44
Material e Métodos	46
<i>Análises Moleculares</i>	46
Filogenéticas.....	48
Populacionais.....	48
<i>Análises Morfométricas</i>	49
<i>Modelagem de Nicho Ecológico</i>	51
Resultados.....	52
<i>Análises Filogenéticas</i>	52
<i>Populacionais</i>	54
<i>Análises Morfométricas</i>	58

<i>Modelagem de Nicho Ecológico</i>	61
Discussão	66
<i>Análises genéticas</i>	66
<i>Análises Morfométricas</i>	67
<i>Análises de Nicho Ecológico</i>	68
Considerações Finais.....	69
Referências Bibliográficas.....	70
Apêndices	77
Capítulo III - Monograph of the Pyrifolia group: <i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart. & Zucc. (Apocynaceae) and associated species	89
Abstract	89
Introduction	89
Materiais e Métodos.....	90
Taxonomic treatment	91
<i>Aspidosperma</i>	91
<i>Key to species of the Pyrifolia group</i>	92
1. <i>Aspidosperma guaraniticum</i> Malme.....	93
2. <i>Aspidosperma martii</i> Silva Manso	94
3. <i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart. & Zucc.	96
4. <i>Aspidosperma refractum</i> Mart. & Zucc.,.....	97
5. <i>Aspidosperma resonans</i> H.J. Will. & Goyde.	99
Literature cited.....	107
Considerações Finais.....	109

Índice de Figuras

Introdução Geral

Figura 1. *Aspidosperma pyriforme* Mart. & Zucc. A e B. Porte, exemplificando os tipos de ramificação; B. copa característica da espécie; C. fissuras do tronco; D. coloração da casca; E, F e G. flores; H. frutos; e I. sementes (Fotos: A.C.D. Castello).....18

Figura 2. Distribuição geográfica de *Aspidosperma pyriforme* Mart. & Zucc. Pontos de ocorrência obtidos a partir do banco de dados on-line *speciesLink* e do herbário virtual Jabot. 19

Capítulo I

Figure 1. Localities of the populations collected for the characterization of the microsatellite markers.....37

Capítulo II

Figura 1 - Distribuição do Complexo *Aspidosperma pyriforme* Mart. & Zucc., localidades das populações coletadas para as análises populacionais e localidades amostradas para filogenia. 47

Figura 2 - A. Árvore obtida por Análise de Inferência Bayesiana utilizando matriz concatenada, e B. Árvore de Espécies obtida por Análise de Coalescência. Ambas para o Complexo *Aspidosperma pyriforme* Mart. & Zucc. Utilizando os marcadores ITS e rpl32-trnL 32. Valores de suporte são probabilidades posteriores. 53

Figura 3 - Análises de Diversidade Genética nas populações do complexo *Aspidosperma pyriforme* Mart. & Zucc. com base em 13 marcadores microssatélites. AU = Aiuaba (CE), CR = Crateús (CE), CO = Corumbá (MS), PM = Porto Murinho (MS), CA = Cabrobó (PE). A. Análise de Coordenadas Principais (PCoA). B. Distância Genética de Nei com a matriz com os valores das distâncias entre as populações e dendrograma com os valores de suporte dos ramos. C. Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre e dentro das populações. GL = graus de liberdade, SS = soma de quadrados, MS = média de quadrados, Est. Var. = variância estimada, % = porcentagem da variação..... 55

Figura 4 - Análise discriminante de componentes principais para as populações do complexo *Aspidosperma pyriforme* Mart. & Zucc., com base 13 marcadores microssatélites. A – Número de agrupamentos mais provável indicado pelo menor valor de probabilidade segundo o critério de informação Bayesiana (BIC). B – Organização dos grupos de acordo com os eixos 1 e 2. C

– Grupos genéticos formados pelo cluster mais provável. AU = Aiuaba (CE), CR = Crateús (CE), CO = Corumbá (MS), PM = Porto Murinho (MS), CA = Cabrobó (PE). 56

Figura 5 - Análises de Estrutura Populacional para as populações do complexo *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc., com base em 13 marcadores microssatélites. AU = Aiuaba (CE), CR = Crateús (CE), CO = Corumbá (MS), PM = Porto Murinho (MS), CA = Cabrobó (PE). Structure: A – Valores de ΔK (Evanno *et al*, 2005); B – Gráfico de barras construído considerando $K = 2$; C – Gráfico de barras construído considerando $K = 3$. D. Valores de F_{st} par a par. * valores com estrutura genética moderada. ** valores com altíssima estruturação genética. 57

Figura 6. Análise de componentes principais (PCA) a partir dos caracteres quantitativos vegetativos e florais do complexo *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. Eixos 1 e 2 da PCA com seus autovalores variação. 58

Figura 7. Boxplots das características vegetativas dos clados do complexo de espécies *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. Valores médios representados pelos triângulos vermelhos; pontos valores originais das características..... 59

Figura 8. Boxplots das características florais dos clados do complexo de espécies *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. Valores médios representados pelos triângulos vermelhos e pontos valores originais das características. 60

Figura 9. A-C. Teste de identidade de nicho dos clados de *Aspidosperma pyrifolium* Mart & Zucc. A. clado 1 e clado 2; B. clado 1 e clado 3; C. clado 2 e clado 3. As linhas vermelhas indicam os verdadeiros resultados de sobreposição de nicho calculados. As colunas representam os valores de sobreposição de nicho criados nas réplicas do teste de identidade..... 63

Figura 10. Áreas de adequabilidade para a ocorrência dos diferentes clados genéticos encontrados no complexo *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc., obtidas a partir da modelagem de nicho ecológico. 64

Figura 11. Boxplots das variáveis climáticas utilizadas nos modelos de nichos ecológicos para os clados do complexo de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc..... 65

Capítulo III

Figura 1. Characteristics of the species of the Pyrifolia group. A. *Aspidosperma guaraniticum*; B. *A. martii*; C, D-E. *A. pyrifolium*; G-H. *A. refractum*. A-C. Leaf abaxial surface; D-E. Reproductive branches; F. Follicle; G. Reproductive branches; H. Follicle. [Vouchers: A. M. Nee 51416 (UEC); B. T.B. Cavalcanti et al. 2637 (UEC); C. R.R. Farias et al. 64 (UEC). 102

Figura 2. Characteristics of the species of the *Pyrifolia* group. A-H. *Aspidosperma guaraniticum*; H-L. *A. martii*; M-U. *A. pyrifolium*. A. Reproductive branches with adaxial surface of the leaves, B. Reproductive branches with abaxial surface of the leaves; C. Detail of the petiole; D. Corolla externally; E. Calyx and pistil; F. Detail of the ovary, G. Corolla internally; H. Follicle. I. Reproductive branches with adaxial surface of the leaves; J. Corolla externally, K. Calyx and pistil; L. Detail of the ovary, M. Corolla internally; N. Reproductive branches with adaxial surface of the leaves; O. Corolla externally, P. Calyx and pistil with glabrous ovary; Q. Detail of the glabrous ovary; R. Calyx and pistil with tomentose ovary; S. Detail of the tomentose ovary; T. Calyx and pistil with a trichome arch on the ovary; U. Detail of the trichome arch on the ovary; V. Corolla internally. [Vouchers: A and B. J.A. Ratter et al. 5129 (K); C and H. M. Nee 49081 (UEC); D-G. P.P. Oliveira et al. s.n. (COR); I. A.A. Santos et al. 2248 (CEN); J-M. B.A.S. Pereira 1715 (UEC); N. F.S. Araújo s.n. (EAC); O-Q and V. B.A.S. Pereira & D. Alvarenga 3607 (UEC); R-S. A.P. Duarte 9549 (UEC); T-U. L.P. Queiróz 1121 (UEC).]..... 103

Figure 3. Characteristics of the species of the *Pyrifolia* group. A-D. *Aspidosperma resonans*; E-I. *Aspidosperma refractum*. A. Reproductive branches, B. Detail of the leaves; C. Flower; D. Follicle; E. Reproductive branches; F. Corolla externally; G. Corolla internally; H. Calyx and pistil; I. Follicle. [Vouchers: A-D. J.R.I. Wood 8771 (K); E. S.A. Mori et al. s.n. (NY), e F-I: P.C. Porto s.n. (RB).] 104

Figure 4. Characteristics of the species of the *Pyrifolia* group. A-B. *Aspidosperma guaraniticum*; C-E. *A. pyrifolium*; F-G. *Aspidosperma refractum*. [Fotos: A-B. A.L. Scudeler; C-E. A.C.D. Castello; F-G. A.O. Simões] 105

Figure 5. Occurrence of *pyrifolia* group in South America. 106

Índice de Tabelas

Introdução

Tabela 1. Histórico taxonômico de *Aspidosperma pyriforme* Mart. & Zucc., com todos os sinônimos relacionados, autores e obras. Nomes em cinza são sinônimos atuais e nomes em preto são nomes aceitos (**Aspidosperma bicolor* Mart. & Zucc. foi considerada sinônimo de *A. cuspa* (Kunth.) S.F.Blake por Castello *et al.*, 2017)..... 20

Capítulo I

Table 1. Primers developed for *Aspidosperma pyriforme* Mart. & Zucc.38

Table 2. Genetic parameters for each locus in different populations of *Aspidosperma pyriforme*. Population Aiuabá – CE (AI), Crateús – CE (CR), Cabrobó – PE (CA); Number of individuals sampled (N); Total Number of Alleles (A); Heterozygosity Observed (Ho) and Expected (He) - in bold, Ho values greater than He; Fixation Index (Fis); Null Alleles (NA) - * values above 20%; Hardy-Weinberg Equilibrium (HW) - ** significant values using Bonferroni correction (P-value is 5% = 0.003125); Polymorphic Information Content (PIC) – “a” values of low polymorphism (PIC <0.25), “b” values of moderate polymorphism (0.25 ≤ PIC <0.50) and “c” high polymorphism values (PIC ≥ 0.50).....39

Capítulo II

Tabela 1. Sequência de primers utilizados para as análises filogenéticas do complexo *Aspidosperma pyriforme* Mart. & Zucc. 47

Tabela 2. Características quantitativas selecionada para as análises morfométricas a partir dos estudos de Candolle (1844), Müller-Argoviensis (1860), Schumann (1895), Pichon (1947), Woodson (1951), Duarte (1970), Marcondes-Ferreira (1988) e Marcondes-Ferreira & Kinoshita (1996). 50

Tabela 3. Estimativas de diversidade genéticas e do coeficiente de endogamia para populações de *Aspidosperma pyriforme* Mart. & Zucc. São apresentados valores médios de 13 locus de SSR para cada população. N = número de indivíduos, NA = número médio de alelos, AP = número de alelos privados, Ho = heterozigosidade observada, He = heterozigosidade esperada, Fis = coeficiente de endogamia, ta = taxa do cruzamento aparente. * Valores de Ho menores que He. ** Valores de Fis significativo. 54

Tabela 4. Matriz com valores de sobreposição de nicho ecológico calculados a partir da superfície de probabilidades geradas com Maxent, usando tanto I (o triângulo superior) e D (o triângulo inferior)..... 62

Índice de Apêndices

Capítulo I

Apêndice A. Transferability of microsatellites to species of the genus *Aspidosperma*....40

Capítulo II

Apêndice A. Lista de espécies amostradas nas análises filogenéticas com o código da amostra, voucher e localidade de origem. 77

Apêndice B. Lista de materiais examinados do Complexo *Aspidosperma pyriformium* Mart. & Zucc. para realização de análises morfométricas. 81

Apêndice C. Árvore obtida por Análise de Máxima Verossimilhança utilizando matriz concatenada. Utilizando os marcadores ITS e rpl32-trnL 32. Valores de suporte são probabilidades posteriores..... 84

Apêndice D. Árvore obtida por Análise de Inferência Bayesiana utilizando os marcadores ITS. Valores de suporte são probabilidades posteriores..... 85

Apêndice E. Árvore obtida por Análise de Inferência Bayesiana utilizando os marcadores rpl32-trnL 32. Valores de suporte são probabilidades posteriores. 86

Apêndice F. Árvore obtida por Análise de Máxima Verossimilhança utilizando os marcadores ITS. Valores de suporte são probabilidades posteriores. 87

Apêndice G. Árvore obtida por Análise de Máxima Verossimilhança utilizando os marcadores rpl32-trnL 32. Valores de suporte são probabilidades posteriores. 88

RESUMO

Aspidosperma pyriforme Mart. & Zucc. é uma espécie com distribuição ampla e disjunta, variação morfológica e taxonomia complexa. Neste estudo é tratada como um complexo de espécies, e utilizada como modelo para delimitação de espécies através de múltiplos critérios operacionais (genéticos, morfológicos e ecológicos). Consideramos que espécies são segmentos de linhagens de uma metapopulação evoluindo separadamente, pois este é um conceito universal que diminuiu as visões conflitantes do que é considerado espécie. Realizamos análises filogenéticas com dados concatenados (ITS e rpl32-trnL) e de coalescência para testar o monofiletismo do complexo e seus grupos. Desenvolvemos marcadores microssatélites polimórficos para *A. pyriforme* usados na avaliação da diversidade genética e estruturação de cinco populações naturais. Analisamos a morfologia através de morfometria, incluindo características quantitativas, tanto vegetativas quanto reprodutivas. As análises ecológicas, incluíram modelagem e testes de similaridade de nicho ecológico. Nossos resultados recuperaram o complexo *A. pyriforme* como monofilético, com 3 subclados relacionados a regiões geográficas e vegetações específicas, resultados também corroborados na árvore de espécies. O clado 1 ocorre na Caatinga no Nordeste do Brasil, o clado 2 nas manchas de Floresta Estacional na região Centro-Oeste no Brasil e clado 3 na vegetação chaqueana no Mato Grosso do Sul, Paraguai e Bolívia. Todas as análises de estrutura populacional sugeriram a formação de dois grupos genéticos, um com as populações do Mato Grosso do Sul (clado 3) e o outro com as populações do Nordeste (clado 1), concordando com os resultados da filogenia e coalescência. Entretanto, ressaltamos que o clado 2 não pode ser testado nas análises populacionais pois essas mesmas não puderam ser coletadas. Esses clados não foram recuperados nas análises morfométricas (PCAs), devido a grande sobreposição dos caracteres morfológicos. Os modelos de nicho ecológico e o teste de similaridade indicaram baixa sobreposição do nicho entre os clados. Assim, com base nos resultados obtidos, propomos uma nova circunscrição de *Aspidosperma pyriforme*, com segregação dos clados 2 (*A. martii*) e 3 (*A. guaraniticum*), que são diferenciados pela genética, nicho ecológico e áreas de distribuição geográfica. Essa nova circunscrição foi apresentada em uma monografia que inclui descrições, chave de identificação, pranchas, informações sobre distribuição, habitat preferencial, fenologia e *status* de conservação.

Palavras-Chaves: Filogenia, Coalescência, Análise morfométrica, Modelagem de nicho ecológico e Similaridade de nicho.

ABSTRACT

Aspidosperma pyriformium Mart. & Zucc. is a species with wide distribution and disjunct, morphological variation and complex taxonomy. In this study, we treated it as a species complex, and used as a model for species delimitation using multiple operational criteria (genetic, morphological and ecological). We consider species as segments of separately evolving metapopulation lineages, since this is a universal concept that diminished the conflicting visions of what is considered species. For this, we performed phylogenetic with concatenated data (ITS and rpl32-trnL) and coalescence analyzes to test the monophyly of the complex and its groups. We developed polymorphic microsatellites for complex *A. pyriformium* for evaluated the genetic diversity and structure of five natural population. We analyzed morphology through morphometry, including quantitative characteristics, both vegetative and reproductive. The ecological analyzes included modeling and testing of ecological niche similarity. Our results recovered *Aspidosperma pyriformium* complex as monophyletic, with 3 subclades related to geographic regions and specific vegetation, results also corroborated in the species tree. Clade 1 occurs in the Caatinga in Northeast Brazil, clade 2 in the Seasonal Forest patches in the Center-West region of Brazil and clade 3 in the Chaqueana vegetation in Mato Grosso do Sul, Paraguay and Bolivia. All analyzes of population structure suggested the formation of two genetic groups, one with the populations of Mato Grosso do Sul (clado 3) and the other with the populations of the Northeast (clado 1), agreeing with the results of phylogenetic and coalescence analyzes. However, we emphasize that clade 2 can not be tested in the population analyzes because they could not be collected. These clades were not recovered in the morphometric analyzes (PCAs), due to the great overlapping of the morphological characters. The ecological niche models and the similarity test indicated that there little niche overlap among the clades. Thus, based on the results obtained, we propose a new circumscription of *Aspidosperma pyriformium*, with the segregation of clades 2 (*A. martii*) and 3 (*A. guaraniticum*), which are distinguished mainly by the ecological niche and geographic distribution areas. This new circumscription was presented in a monograph that includes descriptions, identification keys, plates, information about distribution, preferential habitat, phenology and conservation status.

Keywords: Phylogeny, Coalescence, Morphometric analysis, Ecological niche modeling and Niche similarity.

INTRODUÇÃO GERAL

Delimitação de Espécies

A descrição da biodiversidade ainda é desvalorizada dentro da ciência e, como consequência, cerca de 10 milhões de espécies ainda permanecem desconhecidas (Wilson, 2004). Essa estimativa evidencia a importância da taxonomia, pois espécies são unidades fundamentais, bases para as demais áreas dentro da Biologia (Sites & Marshall, 2004; Wilson, 2004), assim como tem impacto direto na sociedade, que demanda cada vez mais por informações taxonômicas para entender a biodiversidade (Wheeler *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2014). Entretanto, estabelecer os limites entre as espécies é uma tarefa desafiadora, e dependendo dos critérios e conceitos adotados, uma espécie pode ou não ser reconhecida (De Queiroz, 2007).

Os conceitos mais amplamente utilizados são: (1) o Conceito Biológico, que considera espécie como populações de indivíduos que se cruzam e geram descendentes férteis (Wright, 1940; Mayrs, 1942); (2) o Conceito Ecológico, no qual uma espécie compreende linhagens que ocupam uma mesma zona de adaptação (Van Valen, 1976; Anderson, 1990); (3) o Conceito Evolutivo, onde uma espécie é um conjunto de indivíduos que compartilham a mesma linhagem evolutiva (Simpson, 1951; Wiley, 1978); (4) o Conceito Filogenético, que considera que uma espécie é definida por indivíduos que apresentam monofilia e coalescência exclusiva de alelos (Baum & Shaw, 1995; Rosen, 1979); e (5) o Conceito Genotípico, em que uma espécie é composta por populações que compartilham grupos de genótipos, sem fusão com os grupos irmãos (Mallet, 1995).

Para diminuir a problemática da delimitação de espécies gerada pelos diversos conceitos existentes, De Queiroz (2007) propôs um conceito unificador, na qual espécies são consideradas segmentos de linhagens de uma metapopulação evoluindo separadamente, ou seja, as subpopulações que acumulam diferenciações em suas características intrínsecas darão origem as novas espécies (De Queiroz, 2007; Leaché *et al.*, 2009). Esse processo é temporalmente estendido, e o acúmulo de divergências não ocorre ao mesmo tempo para os diferentes critérios e não possui uma ordem regular (De Queiroz, 1998).

As características intrínsecas são utilizadas como critérios operacionais que possibilitam a delimitação entre uma espécie e outra, evidenciando que houve separação. Portanto, basta uma única evidência de separação das linhagens para inferir a existência de espécies diferentes (De Queiroz, 2007). Abordagens integrativas, ou seja, que utilizam de multicritérios, diminuem as visões conflitantes do que aquelas baseadas em um único critério podem gerar (André *et al.*, 2015; Knowles & Carstens, 2007; Leaché *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2015), e aumentam a

capacidade de detectar linhagens recentemente separadas, como os complexos de espécies (Sites & Marshall, 2004; Leaché *et al.*, 2009; Padial *et al.*, 2010).

Complexos de espécies são grupos que não possuem os limites entre as espécies claros, devido a sobreposição morfológica, amostragem baixa, ampla distribuição geográfica, processos de hibridação, retenção de polimorfismo ancestral (Grube & Kroken, 2000; Prata, 2017). Taxonomicamente, esses grupos possuem muitos sinônimos, descrições com sobreposições morfológicas ou com variação morfologia intra-específica (Fujita *et al.*, 2012; Prata, 2017).

Tradicionalmente, caracteres morfológicos são a base para delimitação de espécies, devido a sua praticidade de uso, fácil obtenção e baixo custo (Souza *et al.*, 2014; André *et al.*, 2015). Entretanto, existe uma grande discussão sobre a quantidade e qualidade de características necessárias para reconhecer que uma espécie é diferente de outra (Prata 2017). Para táxons morfológicamente muito similares, provavelmente devido recente especiação ou introgressão, estudos morfométricos auxiliam na compreensão da variação morfológica existente e na circunscrição dos táxons de maneira mais objetiva (Souza *et al.*, 2014; Vigalondo *et al.*, 2015; Zapata, 2014).

Com o desenvolvimento tecnológico, foi incorporado análises genéticas na resolução de problemas em diferentes níveis taxonômicos (Armond, 2016) permitindo a compreensão da história evolutiva e diversidade entre as linhagens genéticas (André *et al.*, 2015; Carstens *et al.*, 2013; Knowles & Carstens, 2007). Estes métodos possuem como vantagem a obtenção de maior quantidade de caracteres com relação aos dados morfológicos, e consegue fornecer evidência de divergência em estágio inicial de especiação (Knowles & Carstens, 2007; Lima, 2016). Muitas espécies crípticas foram descobertas com o uso de dados genéticos (Leaché & Fujita, 2010; Bagley *et al.*, 2015; Prata, 2017).

Entre as análises, temos as abordagens filogenéticas que inferem as relações de parentesco entre as diferentes linhagens (Patwardhan *et al.*, 2014), que podem utilizar de métodos de sequenciamento com alta qualidade, concatenação dos dados e modelos de coalescência, diminuindo os conflitos entre árvores de genes e árvores de espécie (Prata, 2017). Adicionalmente, a abordagem populacional permite verificar como a variabilidade genética está distribuída entre e dentro das populações, além de inferir quais os mecanismos microevolutivos que levam a formação de diferentes linhagens, como dinâmica de fluxo genético, sistemas reprodutivos e taxas de mutação (Rodrigues, 2015; Alves, 2018).

A diferenciação de nicho ecológico é outro critério que tem sido bastante relacionado a divergência das linhagens (Bonetti & Wiens, 2014; Riser *et al.*, 2018). Condições ecológicas distintas podem reforçar o processo de especiação, alterando as semelhanças de nichos ao longo

da escala evolutiva (Yousefkhani *et al.*, 2016). Principalmente devido ao aumento e precisão dos dados de ocorrência de espécies, bem como também a disponibilidade de dados climáticos (Hijmans *et al.*, 2005; Rissler & Apodaca, 2007), e metodologias recentes que permitem identificar necessidades ambientais, nichos hipotéticos, testes de hipóteses sobre a história de diversificação, e medir a diferença entre os nichos de espécies próximas (Wiens & Graham, 2005; Knouft *et al.*, 2006; Cadena & Cuervo, 2010; Riser *et al.*, 2018).

Modelo de estudo: *Aspidosperma pyriforme* Mart. & Zucc (APOCYNACEAE)

A família Apocynaceae Juss., pertencente a ordem Gentianales, apresenta distribuição cosmopolita e é reconhecida como uma das famílias mais diversas das Angiosperma, com mais de 360 gêneros e 5000 espécies (Rapini, 2012; Endress *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2016; Simões *et al.*, 2016). Divide-se em três subfamílias (Periplocoideae, Secamonoideae, Asclepiadoideae), dois grados (rauvolfioide e apocynoide), 25 tribos e 44 subtribos (Endress *et al.*, 2014; Simões *et al.*, 2016). No Brasil, é representada por rauvolfioide, apocynoide e Asclepiadoideae, com mais de 750 espécies (Castello, 2018; Castello *et al.*, 2019).

Aspidosperma Mart. & Zucc. é um dos gêneros mais representativos da família Apocynaceae, com mais de 70 espécies (Castello *et al.*, 2019). Pertencente ao grado rauvolfioide e a tribo Aspidospermateae Miers com outros cinco gêneros (*Geissospermum* Allemão, *Haplophyton* A.DC., *Microplumeria* Baill., *Strempeleopsis* Benth. e *Vallesia* Ruiz & Pav.) (Simoes *et al.*, 2007; Castello, 2018). Divide-se em dois subgêneros (*Aspidosperma* e *Coutinia* (Vell.) Marc.-Ferr.) Suas espécies ocorrem em diversos ambientes, desde o México até a Argentina (Woodson, 1951), e possuem valor medicinal e econômico (Marcondes-Ferreira, 1988).

Apesar de tratado em diversos estudos taxonômicos, a delimitação de algumas espécies ainda possui problemas, como distintas circunscrições, principalmente devido a sobreposição de características morfológicas, muitas sinonímias, nomes não publicados e ocorrência de hibridação (Woodson, 1951; Marcondes-Ferreira, 1988; Marcondes-Ferreira & Kinoshita, 1996; Potgieter, 1999), evidenciando alguns complexos de espécies. Exemplificando essa problemática, um grupo de pesquisadoras que estuda o gênero descreveu entre 2016 e 2018, quatro espécies novas (Castello *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2017; Scudeler *et al.*, 2018), revalidaram seis nomes (Pereira *et al.* 2016; Castello *et al.*, 2017; Castello, 2018) e estão reavaliando as seções do gênero (inf. Pess.).

Aspidosperma pyriforme Mart. & Zucc. (Figura 1) é um desses exemplo de espécie taxonomicamente complexa, conhecida popularmente como “pereiro”, é uma espécie muito característica da Caatinga (Veloza *et al.*, 1991), e ocorre também em outras formações com

solos pedregosos nas regiões Centro-Oeste e Sudeste (Minas Gerais) e no Chaco do Brasil, Paraguai (Marcondes-Ferreira, 1988) e Bolívia (Jørgensen *et al.*, 2014; Killeen, 1993) (Figura 2). Sua distribuição geográfica é particularmente interessante por seu padrão disjunto, ocorrendo nas Florestas Tropicais Sazonalmente Secas (FTSS) com variação morfológica ao longo de sua distribuição.

Na Caatinga, algumas populações de *A. pyriforme* são conhecidas como “pereiro-de-saia”, além da baixa estatura, possuem uma forma de crescimento característica (Figura 1B). Estas populações localizam-se nas áreas mais secas da Paraíba e do Ceará (Marcondes-Ferreira, 1988). Nos indivíduos destas populações a gema apical cessa o crescimento em determinada altura, e surgem gemas laterais que produzem ramos, alguns menores, paralelos ao solo, e outros mais robustos, na posição vertical, o que lhes confere um aspecto peculiar e identificável, que justifica o nome popular (Marcondes-Ferreira, 1988). E em outras populações do Nordeste os indivíduos apresentam crescimento normal sem a formação desse formato de copa específico de “saia”, assim como no Centro-Oeste e Sudeste (obs. em campo). Nessas regiões os indivíduos são morfológicamente maiores, em altura, tamanho das folhas, flores e frutos. Além disso, Woodson (1951) sugeriu a formação de híbridos entre *A. pyriforme* e *A. macrocarpon* Mart. & Zucc. e entre *A. pyriforme* e *A. subincanum* Mart., considerando características morfológicas intermediárias, principalmente as relacionadas às dimensões e indumentas das folhas e flores.

A variação morfológica associada a distribuição resultou na descrição de outras espécies, atualmente sinonimizadas em *A. pyriforme*. Resumidamente, em seu histórico taxonômico há sete nomes de espécies atualmente tratados como sinônimos (Tabela 1): *A. molle* Mart. descrita para a Bahia, foi tratada posteriormente como subespécie (*A. pyriforme* var. *molle* (Mart.) Müll. Arg.) por Müller-Argovensis (1860) e sinonimizada à *A. pyriforme* por Miers *et al.*, (1878); *A. refractum* Mart. & Zucc. também descrita para a Bahia, foi sinonimizada por Woodson (1951) e foi restabelecida (Castello *et al.*, 2019); além de *A. populifolium* A.DC. (Piauí), *A. martii* Silva Manso (Mato Grosso) e *A. guaraniticum* Malme (Paraguai) foram sinonimizadas à *A. pyriforme* por Woodson (1951). Assim, a espécie constitui um ótimo modelo para estudos populacionais e de delimitação de espécies.

Objetivos

Nesse estudo, avaliamos as linhagens dentro de um complexo de espécies (*Aspidosperma pyriforme*) amplamente distribuído em áreas secas da América do Sul a fim de verificar se há uma ou várias espécies, a partir de diferentes critérios. Além disso, fornecemos

uma sinopse taxonômica para o clado do qual o complexo faz parte (Pyrifolia). Especificamente, respondemos às seguintes perguntas:

1. *Aspidosperma pyrifolium* é um complexo monofilético?
2. Há formação de grupos geneticamente diferentes?
3. Existem características morfológicas diagnósticas para embasar a circunscrição das espécies do complexo?
4. Existem diferenças entre possíveis nichos climáticos?

O texto está organizado em três capítulos: (I) “Development and transferability of microsatellite markers for a complex of *Aspidosperma* Mart. & Zucc. (Apocynaceae) species from South American Seasonally Dry Tropical Forests” que apresenta a construção de marcadores microssatélites polimórficos para espécie; (II) “Delimitação de espécies do complexo *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc.” que discute a circunscrição dos morfotipos do complexo de espécies com base em critérios morfológicos, genéticos e ecológicos; e (III) “Monograph of the Pyrifolia group: *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. (Apocynaceae) and associated species” que pretende descrever essas espécies morfolologicamente relacionadas, incluindo mapas, pranchas, descrições e chave de identificação.

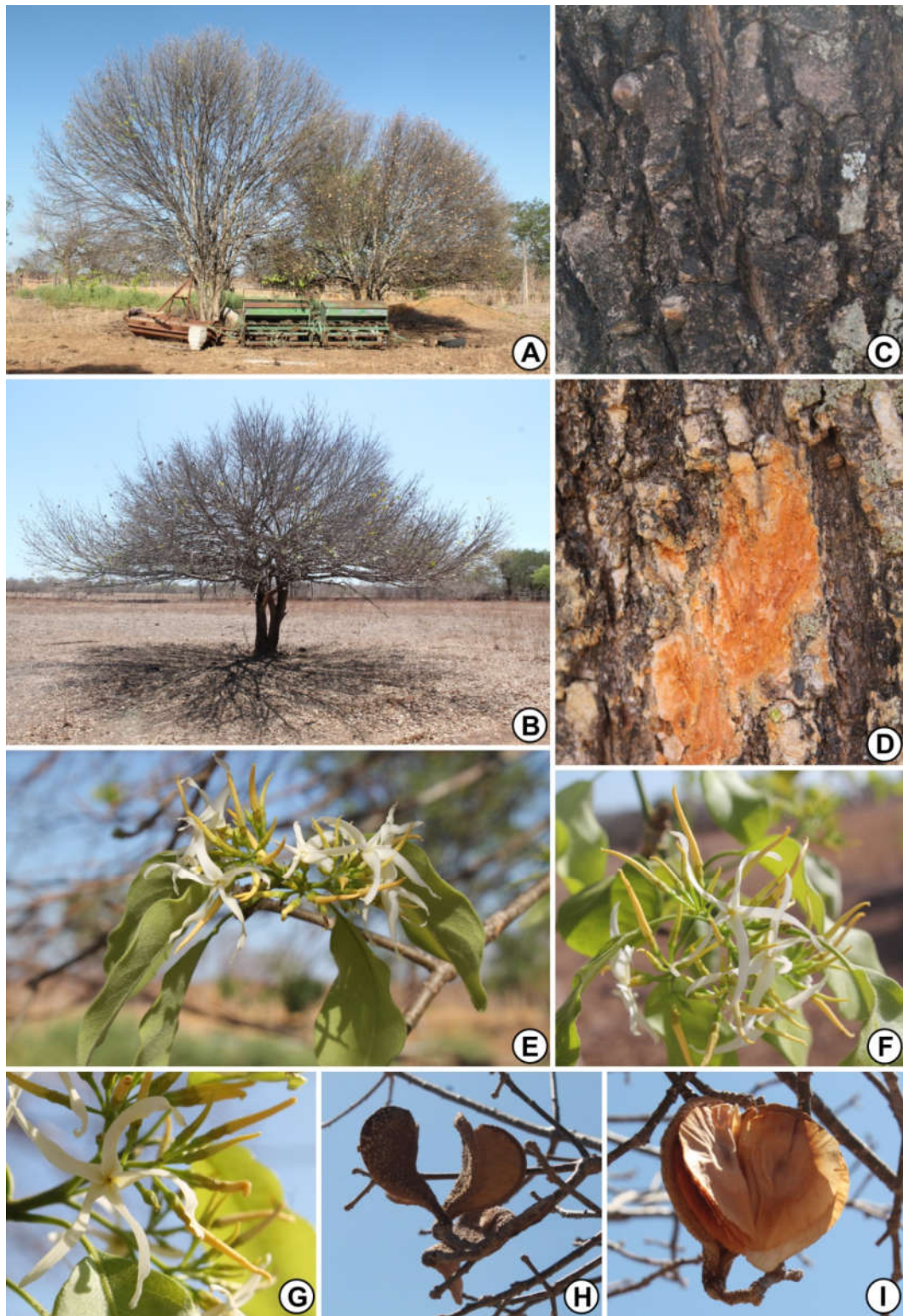


Figura 1. *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. A e B. Porte, exemplificando os tipos de ramificação; B. copa característica da espécie; C. fissuras do tronco; D. coloração da entrecasca; E, F e G. flores; H. frutos; e I. sementes (Fotos: A.C.D. Castello).

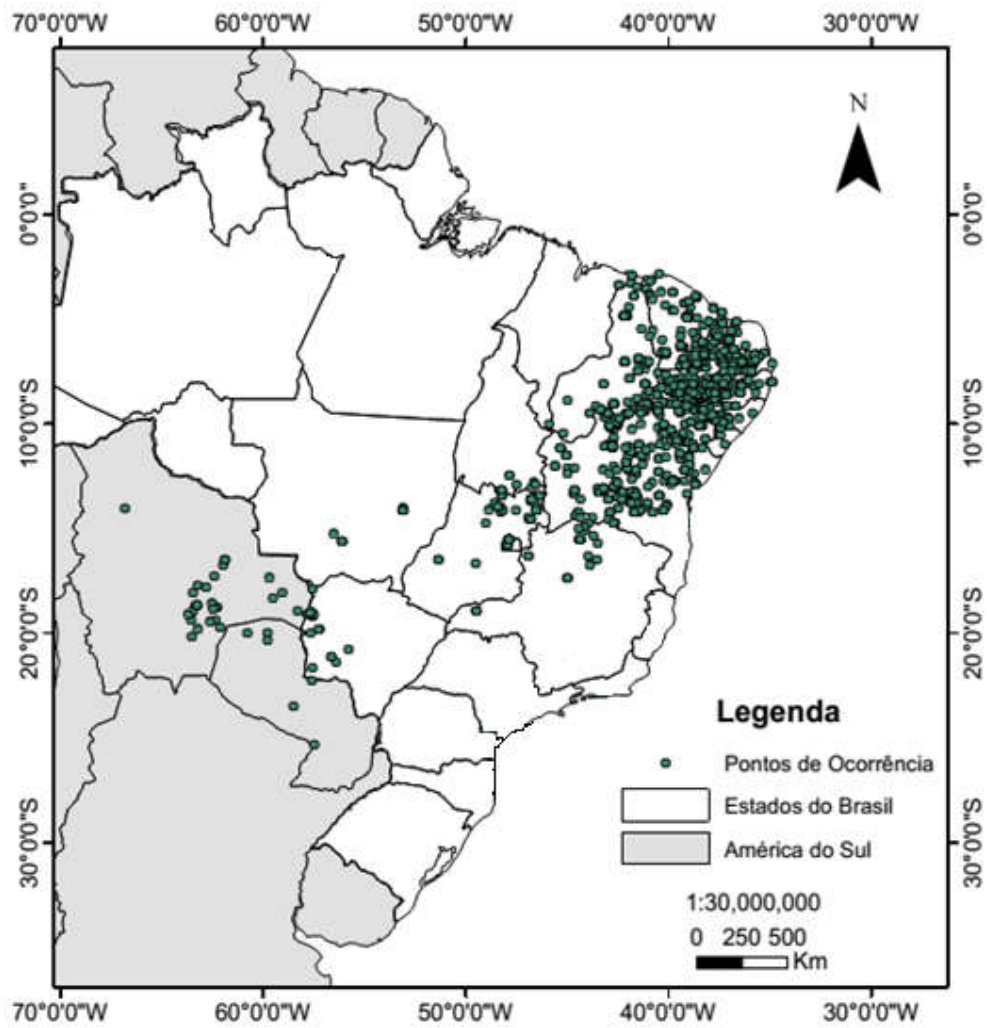


Figura 2. Distribuição geográfica de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. Pontos de ocorrência obtidos a partir do banco de dados on-line *speciesLink* e do herbário virtual Jabot.

Tabela 1. Histórico taxonômico de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc., com todos os sinônimos relacionados, autores e obras. Nomes em cinza são sinônimos atuais e nomes em preto são nomes aceitos (**Aspidosperma bicolor* Mart. & Zucc. foi considerada sinônimo de *A. cuspa* (Kunth.) S.F.Blake por Castello *et al.*, 2017).

Mart. & Zucc. (1824)	De Candolle (1844)	Müller-Argovensis (1860)	Miers (1878)	Kuntze (1891)	Schumann (1895)	Pichon (1947)	Woodson (1951)	Marcondes-Ferreira (1999)	Castello <i>et al.</i> , 2019
Flora 7(1): 136	Prodr. 8:396	Fl. Bras. 6(1) 54	Apoc. So. Am. 25	Rev. Gen. (2) 416	Die Natürlichen Pflanzenfamilien 4	Bulletin du Muséum d'Histoire Naturelle 19(4)	Annals of the Missouri Botanical Garden 38(1)	Tese	Flora do Brasil 2020
<i>A. pyrifolium</i> Mart. & Zucc. Tipo: Bahia	<i>A. pyrifolium</i> Mart. & Zucc. <i>A. molle</i> Mart. Herb. Tipo: Bahia	<i>A. pyrifolium</i> Mart. & Zucc. <i>A. pyrifolium</i> var. <i>molle</i> (Mart.) Müll. Arg.	<i>A. pyrifolium</i> Mart. & Zucc.	<i>Macaglia pyrifolia</i> (Mart. & Zucc.) Kuntze	<i>A. pyrifolium</i> Mart. & Zucc.	<i>A. pyrifolium</i> Mart. & Zucc.	<i>A. pyrifolium</i> Mart. & Zucc.	<i>A. pyrifolium</i> Mart. & Zucc.	<i>A. refractum</i> Mart. & Zucc.
<i>A. refractum</i> Mart. & Zucc. Tipo: Bahia	<i>A. refractum</i> Mart. & Zucc.	<i>A. refractum</i> Mart. & Zucc.	<i>A. refractum</i> Mart. & Zucc.	<i>Macaglia refracta</i> (Mart. & Zucc.) Kuntze	-	<i>A. refractum</i> Mart. & Zucc.			<i>A. pyrifolium</i> Mart. & Zucc.
<i>A. bicolor</i> Mart. & Zucc. Tipo: Piauí	<i>A. bicolor</i> Mart. & Zucc.	<i>A. bicolor</i> Mart. & Zucc.	<i>Thycoma bicolor</i> (Mart. & Zucc.) Miers.	<i>Macaglia bicolor</i> (Mart. & Zucc.) Kuntze	<i>A. bicolor</i> Mart. & Zucc.*	-			<i>A. pyrifolium</i> Mart. & Zucc.
-	<i>A. populifolium</i> A.DC. (1844) Tipo: Piauí	<i>A. populifolium</i> A.DC.	<i>A. populifolium</i> A.DC. (1844)	<i>Macaglia populifolia</i> (A.DC.) Kuntze	-	<i>A. populifolium</i> A.DC.			
-	<i>A. marti</i> Manso ex Mart. Tipo: Mato Grosso	<i>A. marti</i> Manso ex Mart.	<i>A. marti</i> Manso ex Mart.	<i>Macaglia martii</i> (Manso) Kuntze	-	<i>A. marti</i> Manso ex Mart.			
-	-	-	-	-	-	<i>A. guaranaticum</i> Malme Tipo: Paraguai			

Referências Bibliográficas

- Alves FM *et al.* (2018) Genetic structure of two *Prosopis* species in Chaco areas: A lack of allelic diversity diagnosis and insights into the allelic conservation of the affected species. *Ecology and Evolution*, 8:6558–6574.
- Anderson L (1990) The driving force: Species concepts and ecology. *Taxon*, 39:375–382.
- André T *et al.* (2015) Evolution of species diversity in the genus *Chamaecostus* (Costaceae): molecular phylogenetics and morphometric approaches. *Phytotaxa*, 204:265–276.
- Armond T (2016) Filogeografia e delimitação de espécies do gênero *Clyomys* (Rodentia: Echymyidae). Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Zoologia. 75p.
- Bagley JC *et al.* (2015) Assessing species boundaries using Multilocus species delimitation in a morphologically conserved group of Neotropical freshwater fishes, the *Poecilia sphenops* species complex (Poeciliidae). *PLoS One*, 10:1–30.
- Baum DA & Shaw KL (1995) Genealogical perspectives on the species problem. In: P. C. Hoch & AGS (ed), *Experimental and molecular approaches to plant biosystematics*. Missouri Botanical Garden, St. Louis, pp 289–303.
- Bonetti MF & Wiens JJ (2014) Evolution of climatic niche specialization: A phylogenetic analysis in amphibians. *Proc. R. Soc. B*, 281: 20133229.
- Cadena CD & Cuervo AM (2010) Molecules, ecology, morphology, and songs in concert: How many species is *Arremon torquatus* (Aves: Emberizidae)? *Biol J Linn Soc*, 99:152–176.
- Castello ACD *et al.* (2018) Two New Species of *Aspidosperma* (Apocynaceae) from Northeast Brazil and a Monograph of the Species from Ceará State. *Systematic Botany*, 43:1030–1045.
- Castello ACD *et al.* (2019) *Aspidosperma* in Flora do Brasil 2020 under construction. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB4520>>. Acesso em: 21 Mar. 2019.
- Castello ACD (2018) Sistemática de *Aspidosperma* Mart. & Zucc. (Apocynaceae) com

- ênfase na seção típica. Tese (doutorado) - UNESP, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Botucatu - SP. 218p.
- Castello ACD *et al.* (2017) (2523) Proposal To Conserve the Name *Conoria cuspa* (*Aspidosperma Cuspa*) against *Aspidosperma bicolor* (Apocynaceae). *Taxon*, 66:753–754.
- Carstens BC *et al.* (2013) How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*, 22:4369–4383.
- Candolle ALPP (1844) Apocynaceae. In: de Candolle AP, de Candolle ALPP (eds) *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. Treuttel & Würtz, Paris, pp 317–489.
- de Queiroz K (2007) Species concepts and species delimitation. *Syst Biol*, 56:879–886.
- Endress ME, Liede-Schumann S, Meve U (2014) An updated classification for Apocynaceae. *Phytotaxa*, 159:175–194. doi: 10.11646/phytotaxa.159.3.2
- Fujita MK *et al.* (2012) Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution*, 27:480–488.
- Grube M & Kroken S (2000) Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fung. *Mycological Research*, 104:1284-1294.
- Hijmans RJ *et al.* (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25:1965–1978.
- Yousefkhani SSH, Rastegar-Pouyani E, Aliabadian M (2016) Ecological niche differentiation and taxonomic distinction between *Eremias strauchi strauchi* and *Eremias strauchi kopetdaghica* (Squamata: Lacertidae) on the Iranian Plateau based on ecological niche modeling. *Italian Journal Zoology*, 83:408–416.
- Jørgensen PM *et al.* (2014) Catálogo de las plantas vasculares de Bolivia, Monographs in systematic botany from the Missouri Botanical Garden. Missouri Botanical Garden Press - St. Louis.
- Killeen TJ *et al.* (1993) Guía Árb. Bolivia. Herbario Nacional de Bolivia & Missouri Botanical Garden (Edit.), Quipus srl - La Paz.
- Knouft JH *et al.* (2006) Phylogenetic analysis of the evolution of the niche in lizard of the *Anolis sagrei* group. *Ecology*, 87:S29–S38.

- Knowles LL & Carstens BC (2007) Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology*, 56:887–895.
- Kuntze CEO (1891) *Revisio Generum Plantarum* 2. Felix - Leipzig.
- Leaché AD & Fujita MK (2010) Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proc R Soc B Biol Sci*, 277:3071–3077.
- Leaché AD *et al.* (2009) Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the coast horned lizard species complex (*Phrynosoma*). *Proc Natl Acad Sci*, 106:12418–12423.
- Lima LCB (2016) Filogenia e delimitação de espécies no complexo *Boa constrictor* (Serpentes, Boidae) utilizando marcadores moleculares molecular markers. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. 122p.
- Mallet J (1995) A species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 10:294–299
- Marcondes-Ferreira W (1988) *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae): estudos taxonômicos. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Ciências Biológicas, Campinas - SP.
- Marcondes-Ferreira W & Kinoshita L (1996) Uma nova divisão infragênérica para *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae). *Revista Brasileira Botânica*, 19:203–214.
- Martius CFP & Zuccarini JG (1824) Ankündigung der fortsetzung eines werkes über brasilianische pflanzen. *Flora*, 7:129–142.
- Mayrs E (1942) *Systematics and the origin of species*. Columbia University, New York.
- Miers J *et al.* (1878) *On The Apocynaceae of South America*. Williams & Norgate, London, Edinburgh, England.
- Müller-Argovensis J (1860) Apocynaceae. In: Martius CFP (ed) *Flora brasiliensis enumeratio plantarum in Brasilia hactenus delectarum, que suis aliorumque botanicorum studiis descriptas et methodo naturai digestas partim icone illustratas*. vol. 6. Leipzig: F. Fleischer.
- Padial JM *et al.* (2010) The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7:16.
- Patwardhan A, Ray S, Roy A (2014) Molecular Markers in Phylogenetic Studies - A Review. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology*, 2:1–9.
- Pereira ASS, Simões AO, Santos JUM (2016) Taxonomy of *Aspidosperma* Mart.

- (Apocynaceae, Rauvolfioideae) in the State of Pará, Northern Brazil. *Biota Neotropica*, 16(2): e20150080.
- Pereira ASS *et al.* (2017) *Aspidosperma brasiliense* (Apocynaceae), a new and widely distributed species. *Phytoxa*, 326:235–244.
- Pichon M (1947) Classification des Apocynacées: VII, genre *Aspidosperma*. *Bull du Muséum d'Histoire Nat*, 19:362–369
- Potgieter K (1999) Phylogenetic study of Apocynaceae Juss. and *Aspidosperma* Mart. & Zucc. University of Illinois, Urbana - Champaign.
- Prata EMB (2017) Delimitação de espécies e história de diversificação do complexo *Pagamea guianensis* (Rubiaceae) na América do Sul Tropical. Tese (doutorado) - INPA, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Manaus. 143p.
- Rapini A (2012) Taxonomy “under construction”: Advances in the systematics of Apocynaceae, with emphasis on the Brazilian Asclepiadoideae. *Rodriguesia*, 63:75–88.
- Riser JP, Emel SL, Roalson EH (2018) Genetics and Ecological Niche Define Species Boundaries in the Dwarf Milkweed Clade (*Asclepias*: Asclepiadoideae: Apocynaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 180:000–000.
- Rissler LJ & Apodaca JJ (2007) Adding more ecology into species delimitation: Ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the black salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Systematic Biology*, 56:924–942.
- Rodrigues JF (2015) Relações filogenéticas e filogeográficas das espécies do complexo *Cattleya coccinea* (Orchidaceae). Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba - SP. 141p.
- Rodrigues JF *et al.* (2015) Species delimitation of *Cattleya coccinea* and *C. mantiqueirae* (Orchidaceae): insights from phylogenetic and population genetics analyses. *Plant Systematics and Evolution*, 301:1345–1359.
- Rosen DE (1979) Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala: Revisionary studies and comparative geography. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 162:267–376.
- Schumann K (1895) Apocynaceae. In: Engler A, Prantl K (eds) - *Die natürlichen*

pflanzenfamilien. W. Engelmann, Leipzig, pp 109–189

- Scudeler AL *et al.* (2018) A new species of *Aspidosperma* (Apocynaceae) from the Brazilian Cerrado. *Phytotaxa*, 333:117.
- Simões AO *et al.* (2016) Systematics and character evolution of Vinceae (Apocynaceae). *Taxon*, 65:99–122.
- Simoes AO *et al.* (2007) Phylogeny and Systematics of the Rauvolfioideae (Apocynaceae): Based on Molecular and Morphological Evidence. *Annals of the Missouri botanical Garden*, 94:268–297.
- Simpson GG (1951) The species concept. *Evolution*, 5:285–298.
- Sites JW & Marshall JC (2004) Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35:199–227.
- Souza I, Funch L, de Queiroz LP (2014) Morphological analyses suggest a new taxonomic circumscription for *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *PhytoKeys*, 38:101–118.
- Van Valen L (1976) Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon*, 25:233–239.
- Veloso H P, Rangel-Filho ALR, Lima JCA (1991) Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um Sistema Universal. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro.
- Vigalondo B *et al.* (2015) Unmasking cryptic species: Morphometric and phylogenetic analyses of the Ibero-North African *Linaria incarnata* complex. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177:395–417.
- Wheeler QD, Raven PH, Wilson EO (2004) Taxonomy: Impediment or Expedient? *Science*, (80):303-285.
- Wiens JJ & Graham CH (2005) Niche Conservatism: Integrating Evolution, Ecology, and Conservation Biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36:519–539.
- Wiley EO (1978) The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology*, 27:17–26.

- Wilson EO (2004) Taxonomy as a fundamental discipline. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359:739–739.
- Woodson RE (1951) Studies in the Apocynaceae. VIII. A Interim Revision of Genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 38:119–206.
- Wright S (1940) The statistical consequences of Mendelian heredity in relation to speciation. In: Huxley J (eds) *The new systematics*. Oxford University Press, London, pp 161–183.
- Zapata F (2014) Analysis of geographic patterns of molecular, morphological, and bioclimatic variation to evaluate hypotheses of species boundaries in the South American montane genus. *Evolutionary Biology*, bioRxiv 009811.