



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 pyrifolium*
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 pyrifolium</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 pyrifolium</i> Mart. & Zucc. (Apocynaceae).....	42
Resumo	42
Introdução.....	44
Material e Métodos	46
<i>Análises Moleculares</i>	<i>46</i>
Filogenéticas.....	48
Populacionais.....	487
<i>Análises Morfométricas</i>	<i>49</i>
<i>Modelagem de Nicho Ecológico</i>	<i>51</i>
Resultados.....	52
<i>Análises Filogenéticas</i>	<i>52</i>
<i>Populacionais</i>	<i>54</i>
<i>Análises Morfométricas</i>	<i>58</i>

<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 pyrifolium* 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 pyrifolium* 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 pyrifolium* 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 pyrifolium* 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 pyrifolium* Mart. & Zucc. com base em 13 marcadores microsatélites. AU = Aiuaba (CE), CR = Crateús (CE), CO = Corumbá (MS), PM = Porto Murtinho (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 pyrifolium* Mart. & Zucc., com base 13 marcadores microsatélites. 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 Murtinho (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 Murtinho (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 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)..... 20

Capítulo I

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

Table 2. Genetic parameters for each locus in different populations of *Aspidosperma pyrifolium*. 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 pyrifolium* 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 pyrifolium* 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 pyriforme* 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 pyrifolium 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 monofilismo do complexo e seus grupos. Desenvolvemos marcadores microssatélites polimórficos para *A. pyrifolium* 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. pyrifolium* 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 pyrifolium*, 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 pyrifolium 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. pyrifolium* 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 pyrifolium* 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 pyrifolium*, 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 morfolologicamente 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 pyrifolium* 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., *Strempeliopsis* 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 pyrifolium 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. pyrifolium* 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. pyrifolium* e *A. macrocarpon* Mart. & Zucc. e entre *A. pyrifolium* e *A. subincanum* Mart., considerando características morfológicas intermediárias, principalmente as relacionadas às dimensões e indumentos das folhas e flores.

A variação morfológica associada a distribuição resultou na descrição de outras espécies, atualmente sinonimizadas em *A. pyrifolium*. 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. pyrifolium* var. *molle* (Mart.) Müll. Arg.) por Müller-Argovensis (1860) e sinonimizada à *A. pyrifolium* 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. pyrifolium* 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 pyrifolium*) 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 morfológicamente relacionadas, incluindo mapas, pranchas, descrições e chave de identificação.

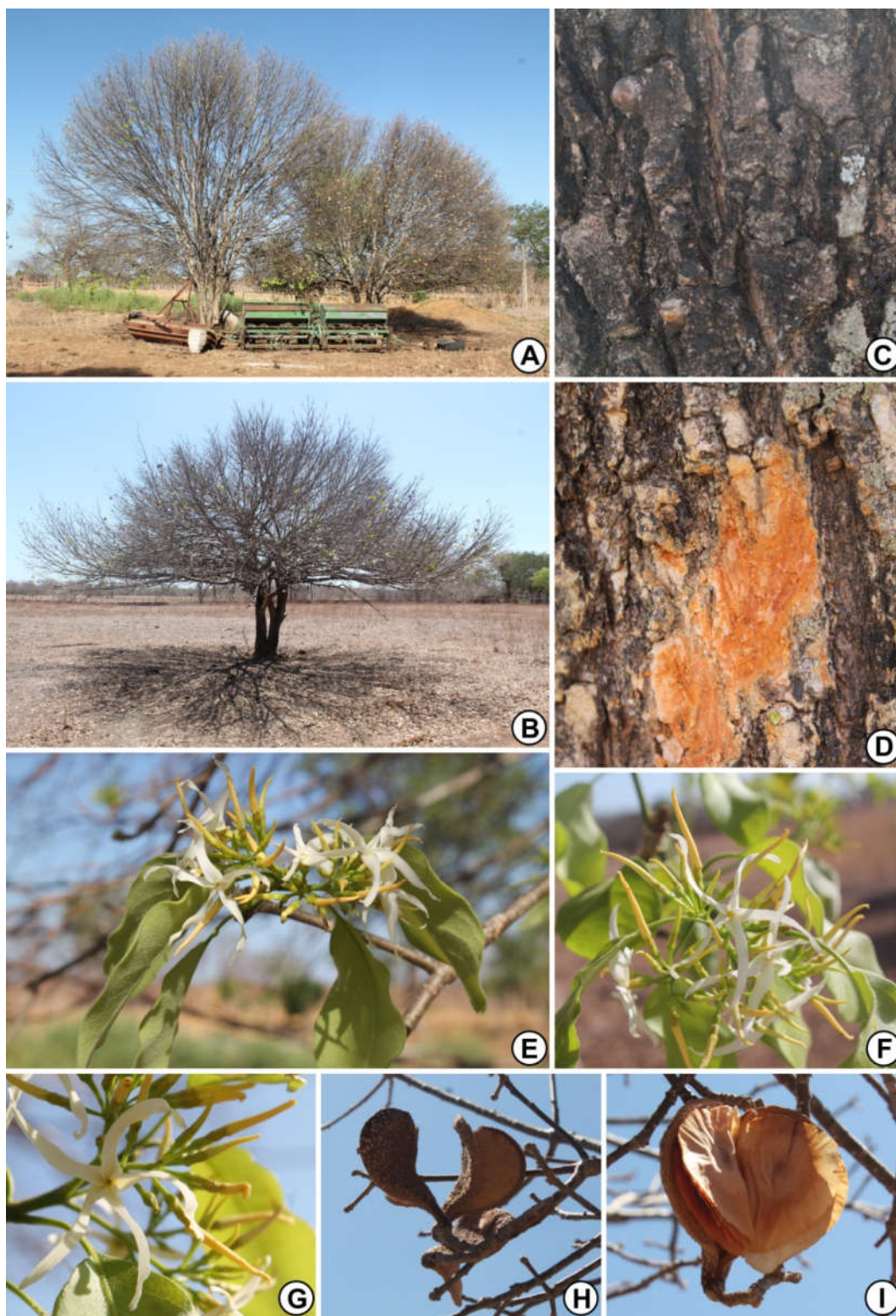


Figura 1. *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. A e B. Porte, exemplificando os tipos de ramificação; B. copa característica da espécie; C. fissuras do tronco; D. coloração da entrecasca; E, F e G. flores; H. frutos; e I. sementes (Fotos: A.C.D. Castello).

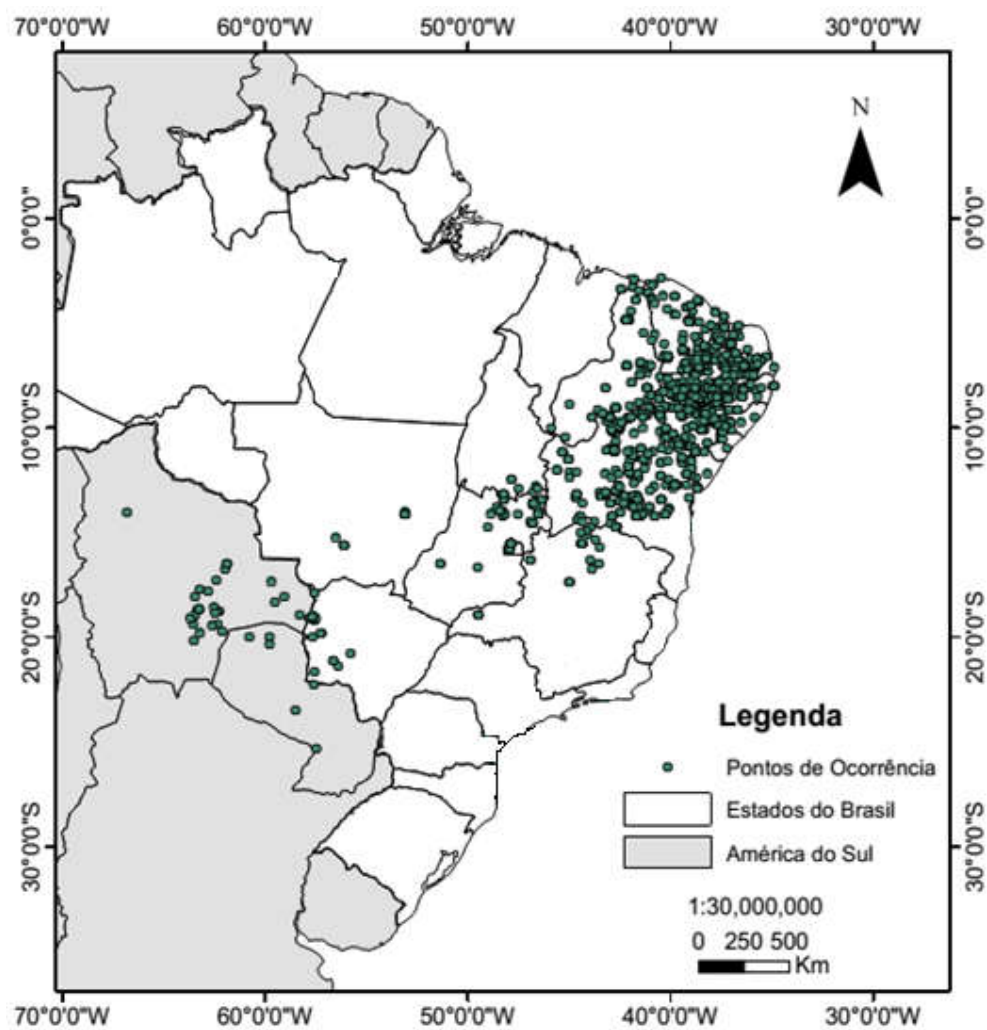


Figura 2. Distribuição geográfica de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. Pontos de ocorrência obtidos a partir do banco de dados on-line *speciesLink* e do herbário virtual Jabot.

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. 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: Echymidae). 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) *Prodomus 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 infragenérica 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, quae suis aliorumque botanicorum studiis descriptas et methodo naturae digestas partim iconibus 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), Manus. 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.

Capítulo I

Development and transferability of microsatellite markers for a complex of *Aspidosperma* Mart. & Zucc. (Apocynaceae) species from South American Seasonally Dry Tropical Forests

PATRÍCIA APARECIDA MESSIAS¹, FÁBIO MATOS ALVES ², FÁBIO PINHEIRO², ANETE PEREIRA DE SOUZA², INGRID KOCH²

¹ Postgraduate Program in Biological Sciences (Botany), Institute of Bioscience, Department of Botany, University of State São Paulo “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 18618-689, SP, Brazil

² Plant Biology Department, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, 13083-862, SP, Brazil

Corresponding author:

Patrícia Aparecida Messias / pabioufscar@gmail.com / 55 15 98151-5271

ORCID number:

Patrícia Aparecida Messias: 0000-0003-2775-4278

Fábio Alves de Matto: 0000-0002-7902-4915

Fábio Pinheiro: 0000-0003-3243-2652

Anete Pereira de Souza: 0000-0003-3831-9829

Ingrid Koch: 0000-0003-3256-5922

Abstract: (Development and transferability of microsatellite markers for a complex of *Aspidosperma* Mart. & Zucc. (Apocynaceae) species from South American Seasonally Dry Tropical Forests) In this study, we developed and characterized microsatellite markers for *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc., considered a complex of species because of its morphological variation and disjunct area distribution. This complex is predominant in the Caatinga of northeastern Brazil, but also occurs in semideciduous seasonally forest areas of central Brazil and in Chaco areas in southwestern Brazil, Bolivia and Paraguay. These formations are included in the definition of Seasonally Dry Tropical Forests (SDTFs). SDTFs are considered one of the most endangered forests in the world, mainly due to suffering great anthropic pressures, and have high levels of endemism and exclusivity in their composition. Little is known about the genetic structure of *A. pyrifolium* populations and the effects of disjunct distribution on their levels of exchange and genetic variability. In this study, 16 polymorphic and 4 monomorphic microsatellites were characterized in 82 *Aspidosperma pyrifolium* individuals from three populations in Brazil's Northeast. The transferability analysis resulted in an average of seven markers, amplified in 11 other species of the genus (*A. brasiliense* A.S.S. Pereira & A.C.D. Castello, *A. illustre* (Vell.) Kuhlmann & Pirajá, *A. inundatum* Ducke, *A. multiflorum* A.DC., *A. nobile* Müll.Arg., *A. polyneuron* Müll.Arg., *A. quebracho-blanco* Schltdl., *A. ramiflorum* Müll.Arg., *A. rigidum* Rusby, *A. schultesii* Woodson and *A. subincanum* Mart.). These markers could be used to estimate genetic parameters and help us better understand the boundaries between *A. pyrifolium* species, as well as the conservation of their populations and consequently of the SDTFs. In addition, they may be used in studies on other species of the genus.

Keywords: *Aspidosperma pyrifolium*, Caatinga, Chaco, SDTF, SSR

1. Introduction

Aspidosperma pyrifolium Mart. & Zucc., popularly known in Northeast Brazil as Pau-Pereiro, Pereiro or Pereiro-de-Saia (Marcondes-Ferreira 1988), is regarded as a Caatinga environmental indicator (Velooso et al. 1991). Endemic to Seasonally Dry Tropical Forests (SDTFs) of the South American continent, it has a disjunct geographical distribution, with most of its populations in the Caatinga (northeast of Brazil), and others in the semi-deciduous seasonally forest areas of central Brazil and Chaco (Mato Grosso do Sul, Paraguay and Bolivia) (Woodson 1951; Marcondes-Ferreira 1988). There is a close relationship between the morphological variation of this species and its geographic distribution, hence it is treated here as the “*A. pyrifolium* complex” (Grube & Kroken 2000). *Aspidosperma pyrifolium* individuals are 3 to 8 meter-high trees. They have obovate to oval leaves with reticulated venation, in addition to inflorescences with many white flowers, and woody, pyriform, brown and lenticellate follicles, besides papyraceous seeds (Woodson 1951; Marcondes-Ferreira 1988).

Seasonally Dry Tropical Forests (SDTFs) are deciduous and semi-deciduous plant formations that occur widely in the tropics, although fragmented in their distribution (Pennington et al. 2009; DRYFLOR et al. 2016). They have closed canopies, fertile soils with few grasses, and an average precipitation of less than 1800 mm per year, reaching as low as less than 100 mm per month in the driest periods, which last 3 to 6 months (Murphy & Lugo 1986; Gentry 1995; DRYFLOR et al. 2016). In South America, SDTFs are distributed from the Caatinga of the Brazilian northeast to the Chaco in the northern of Argentina, besides some areas in the dry Andean valleys (Prado and Gibbs 1993), as well as small spots in the Cerrado and Amazon biomes (Prado & Gibbs 1993; Pennington et al. 2000; DRYFLOR et al. 2016).

SDTF conservation has historically been neglected, due to these forests' intense human occupation and use. SDTFs are thus one of the most threatened forests in the world, with only 10% of their original extension remaining and very few protected areas in existence (Miles et al. 2006; DRYFLOR et al. 2016). The Caatinga, a biome restricted to Brazil and with great potential for ecosystem services, has had 46% of its area deforested due to agriculture and illegal logging, and only 7.8% is currently under the protection of Conservation Units (Brasil 2018). The small portion of the Chaco biome located in Brazilian territory (the majority is in Paraguay and Bolivia) is not protected by

any Conservation Units, and by 2008, 36% of its original coverage had been destroyed, mainly by extensive cattle raising (Alves 2014).

Due to their restrictive characteristics, SDTFs are inhabited by many species and even endemic genera (Pennington et al. 2009; DRYFLOR et al. 2016). In addition, each biome fragment is virtually unique, as up to 73% of their tree and shrub species may be exclusive (DRYFLOR et al. 2016), meaning that the selection of only a single SDTF fragment for protection would result in great loss of diversity. Thus, actions to aid in the conservation of SDTF biodiversity are urgent.

The genetic diversity analysis of natural populations of species like the *A. pyrifolium* complex by means of informative genetic markers such as microsatellites can contribute to decision making in the conservation of both, the species complex and the forest where it occurs (Conner and Hartl 2004). It can also subsidize decisions on the delimitation of species in the complex and elucidate part of their demographic histories. Microsatellites, besides having high polymorphism, codominant inheritance and high mutation rates, are inexpensively and easily developed and genotyped (Alves 2014; Chen 2017; Lee 2017).

In this study, we developed and characterized microsatellite markers for *Aspidosperma pyrifolium* and tested its inter-species transferability within the genus, in order to support studies on genetic diversity, population structure, phylogeography and conservation of both, the species and SDTFs.

2. Material and Methods

2.1. Population Sampling and DNA extraction

Leaf samples from three natural populations of *Aspidosperma pyrifolium* were collected in the Northeast region of Brazil - 30 individuals from Aiuabá (AI), and 27 from Crateús (CR), both in the state of Ceará, and 25 individuals from Cabrobó (CA), state of Pernambuco (Figure 1). The vouchers were deposited in the herbarium of the Institute of Biosciences of Botucatu (BOTU). Genomic DNA was extracted using 20 mg dry leaves on silica, following the modified protocol proposed by Doyle (1991). Quantification was performed with the Nanodrop spectrophotometer.

Another 11 species of the genus were tested for transferability: *A. brasiliense* A.S.S. Pereira & A.C.D. Castello, *A. illustre* (Vell.) Kuhl. & Pirajá, *A. inundatum* Ducke, *A. multiflorum* A.DC., *A. nobile* Müll.Arg., *A. polyneuron* Müll.Arg., *A. quebracho-blanco*

Schltl., *A. ramiflorum* Müll.Arg., *A. rigidum* Rusby, *A. schultesii* Woodson and *A. subincanum* Mart. (Appendix A). Uniform extraction and quantification procedures were performed in one individual of each selected species.

2.2. Genomic library building and primer design

The microsatellite library was built following the modified protocol of Billotte et al. (1999). DNA was digested using *Afa I* enzyme (10u/μL), ligated to Rsa21 (10μM) and Rsa25 (10μM) adapters, and then amplified and purified. The PCR's product was enriched using magnetic beads and hybridized with (CT)₈ and (GT)₈ oligonucleotides. The selected fragments were amplified and quantified. Cloning of the fragments was performed with the pGem-T vector. The competent cells with the selected fragments were subjected to transformation through XL1-BLUE electroporation and cultivated in agar. Clones were selected in an Elisa plaque. Plasmid extraction was performed and then the sequencing kit was added.

Chromas software v.2.6.5 was used for primer design (Technelysium – <https://technelysium.com.au/wp/chromas/>), while *Chromatogram Explorer* (Heracle BioSoft 2015) was employed to remove the adapters and perform sequence trimming. The clone consensus sequence was generated in *CAP3* (Huang & Madan 1999). *VecScreen* (NCBI – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/about/>) was used to search for vector segments, and *BLAST* (NCBI – <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) to check for material contamination. Microsatellites were identified using *SSRIT* software (Temnykh 2001), while primers were designed in *Primer3 Plus* (Untergasser 2012).

2.3. Microsatellite validation and characterization

The concentration of the genomic DNA used for amplification was 5 ng/μL. Polymerase chain reaction (PCR) employed 0.6 μL MgCl₂ (25 mM), 0.75 μL 10x PCR Buffer, 0.4 μL dNTP (2.5 mM), 0.8 μL BSA (2.5 mg/mL), 0.1 μL of each primer (10 mM), 0.3 μL Taq DNA (1 U) and 4 μL DNA. The final volume of each reaction was 12 μL (Mili-Q Water). The temperature cycle used in the PCR was: initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 34 cycles at 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, 72° C for 1 min, and final elongation at 72 °C for 8 min. The PCR were first performed at 60 °C, and those that failed were tested at a temperature of 55 °C. Amplification was evaluated in 2% agarose gel. Genotyping was performed using vertical electrophoresis, with a 6% polyacrylamide

gel; band staining was done with silver nitrate. We used 10 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) to estimate fragment sizes.

For the characterization of the primers, we calculated Expected Heterozygosity (H_e) and Observed Heterozygosity (H_o) in the *GDA* software (Lewis & Zaykin, 2000), and Polymorphism Information Content (PIC) in *Molkin* v.3.0 (Gutiérrez 2005). We estimated the Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE), Fixation Index (F_{IS}) and Linkage Disequilibrium (LD) using *GENEPOP* v. 4.2 (Rousset 2008). *FreeNA* was employed to calculate Null Allele Frequency (NA) (Chapuis & Estoup 2007). The Bonferroni correction was applied to all P-values (Rice 1989).

3. Results

We sequenced 48 clones and among which 22 had SSR. We were able to draw 31 primer pairs. All were successfully amplified, resulting in 16 polymorphic and 4 monomorphic markers (Apy_08, Apy_18, Apy_19 and Apy_20) for *Aspidosperma pyrifolium*. Motifs were for the most part dinucleotides, divided into: nine simple, five perfect compounds, and four imperfect compounds. Two trinucleotides also occurred. Primer length ranged from 20 to 25 bp, and the amplified products ranged from 105 (Apy_13) to 290 bp (Apy17) (Table 1).

Transferability resulted in an average of seven amplified markers for the tested species. The markers Apy_01, Apy_02, Apy_05, Apy_07 and Apy_16 were amplified in all 11 species, while Apy_08, Apy_14 and Apy_17 failed to amplify. The species with the highest amplification rates were *A. schultesii* and *A. subincanum*, both with 16 markers, and the species with the lowest amplification was *A. illustre*, with seven (Appendix A).

The number of alleles found for *Aspidosperma pyrifolium* microsatellite markers varied between 2 and 15. Polymorphic Information Content (PIC) values ranged from 0.115 to 0.910. Observed Heterozygosity (H_o) per loci ranged from 0 to 1 and Expected Heterozygosity (H_e) ranged from 0.081 to 0.924, with mean H_o values of 0.612, 0.607 and 0.540, and mean H_e values of 0.657, 0.661 and 0.619, for the AI, CR and CA populations respectively (Table 2).

The Fixation Index presented values between -0,600 and 1, and averages of 0.069, 0.082 and 0.129 for the AI, CR and CA populations, respectively. The Hardy–Weinberg Equilibrium deviation was observed in some populations in the Apy_02, Apy_09,

Apy_11, Apy_12, Apy_14, Apy_15, and Apy_17 loci (P-value = 0.003, Bonferroni-corrected). Evidence of Null Alleles occurred only in the Apy_02 loci in the AI and CA populations, and in the Apy_14 in the AI and CR populations. Linkage Disequilibrium (LD) was not significant for any marker (P-value = 0.000417, Bonferroni-corrected).

4. Discussion

The recovery of microsatellites in the sequenced clones had great results, with a success rate of about 65%, much higher than the 2.3% average plant recovery ratio (Zane et al. 2002). Primer amplification and transferability were also successful, with all primers synthesized for *Aspidosperma pyrifolium* individuals successfully amplified, and as much as 16 primers for other species of the genus.

Among the 16 polymorphic markers of *Aspidosperma pyrifolium* populations, PIC pointed out that 81.25% markers developed have high polymorphism, according to Chen's classification (2017). This result agrees with Bhargava & Fuentes (2010), who associated more repetition with higher mutation rates. Some locus indicated excess heterozygotes, with higher H_o values in comparison to H_e (Apy_01, Apy_05, Apy_06, Apy_09, Apy_15 and Apy_17). This excess could also be observed in the F_{IS} negative values seen in Apy_1, Apy_3, Apy_5, Apy_6, Apy_9, Apy_13, Apy_15, Apy_16 and Apy_17. In the HWE test, H_e was significantly different from H_o in the Apy_02, Apy_09, Apy_11, Apy_12, Apy_14, Apy_15 and Apy_17 loci. The evidence of null alleles in Apy_02 and Apy_14 merits attention, as these were significant in the HWE due to the low value of H_o and high F_{IS} . However, we cannot fail to point out that amplification errors may lead to false null alleles (Foucult et al. 1996).

In conclusion, we highlight that the success of the amplifications seen here, as well as the high polymorphism and good indicators used in the descriptive statistics of primer sets for the studied species, show that these new markers have great potential as tools for future studies involving diversity, genetic structure and conservation of their populations and, consequently, for SDTFs. In addition, they may be used in studies on other species of the genus.

Authors' contributions:

PAM: study design, field sample collection, laboratory procedure execution, data analysis, and writing of the manuscript. FMA: assistance with laboratory procedures, data

analysis, and writing of the manuscript. FP: study design and writing of the manuscript. APS: supervision of laboratory procedures, methodological support and laboratory equipment provision. IK: study design and writing of the manuscript.

Acknowledgements

To the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for funding this work by means of a scholarship provided to PAM. To the Support Fund for Teaching, Research and Extension (FAEPEX – process no. 519.292) for granting funding for sequencing of library clones and field trips to the Northeast. To *Espaço da Escrita – Pró-Reitoria de Pesquisa – UNICAMP* for the services provided. To the employees of the Aiuaba Ecological Park for their help during collections. To Ana Carolina Castello Devides for her assistance during routine work in the Laboratory of Molecular Systematics. To Danilo Augusto Sforça and Aline da Costa Lima Moraes for their assistance during routine work in the LAGM.

References

- Alves FM. (2014). Population genetics analysis of *Prosopis rubriflora* Hassler ("Espinheiro") and *Prosopis ruscifolia* Griseb. ("Algaroba") (Leguminosae, Mimosoideae) in remnants of Brazilian chaco. Thesis - State University of Campinas, Institute of Biology, Campinas-SP.
- Alves FM, Zucchi MI, Azevedo-Tozzi AMG, Sartori ALB, Souza AP. (2014). Characterization of microsatellite markers developed from *Prosopis rubriflora* and *Prosopis ruscifolia* (Leguminosae - Mimosoideae), legume species that are used as models for genetic diversity studies in Chaquénian areas under anthropization in South America. BMC Res Notes 7:1–6. doi: 10.1186/1756-0500-7-375.
- Bhargava A, Fuentes FF. (2010). Mutational dynamics of microsatellites. Mol Biotechnol 44:250–266. doi: 10.1007/s12033-009-9230-4
- Billotte N, Lagoda PJL, Risterucci AM, Baurens FC. (1999). Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. Fruits (Paris) 54:277–288
- Brasil. (2018). Caatinga. In: Ministério do Meio Ambient. <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga> (accessed 2018 Febr 16).
- Chapuis MP, Estoup A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population

- differentiation. *Mol Biol Evol* 24:621–631. doi: 10.1093/molbev/msl191
- Chen FF, Ma CY, Yan LP, Zhang H, Wang W, Zhang Y, Ma LB. (2017). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers for the chub mackerel (*Scomber japonicus*) and cross-species amplification in the blue mackerel (*S. australasicus*). *Genet Mol Res* 16:1–7
- Conner JK, Hartl DL. (2004). *A Primer of Ecological Genetics*. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Doyle, J. (1991) DNA Protocols for Plants. In: Hewitt. G.M.; Johnston, A.W.B.; Young, J.P.W. (eds) *Molecular Techniques in Taxonomy*. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), vol 57.
- DRYFLOR. (2016). Plant diversity patterns in neotropical dry forests and their conservation implications. *Science* (80) 353:1383–1388. doi: 10.1126/science.aaf5080
- Foucault F, Praz F, Jaulin C, Amor-Gueret M. (1996). Experimental limits of PCR analysis of (CA)_n repeat alterations. *Trends in Genetics*, 7: 450–452.
- Gentry HA. (1995). Diversity and floristic composition of neotropical dry forests. pp. 146-194. In: S. Bullock, H. Mooney EM (ed) *In Seasonally Dry Tropical Forests*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Grube M, Kroken S. (2000) Molecular approaches and the concept of species an. 104:1284–1294.
- Gutiérrez JP, Royo LJ, Álvarez I, Goyache F. (2005). Molkin v2.0: a computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. *J Hered* 96:718–721.
- Heracle BioSoft. (2015). Chromatogram Explorer. <http://www.dnabaser.com/download/chromatogram-explorer/> (Accessed 2017 Mar 11).
- Huang X, Madan A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. 868–877
- Lee MY, Moon HC, Jeon HS, Song EG, Woo D, Park HB, Choi TY, Eo KY, Hyun Y, Lee K, Park YS, Moon JY, Han HJ, An J. (2017). Characterization of 33 microsatellite markers and development of multiplex PCR for yellow-throated marten (*Martes flavigula*). *Genet Mol Res* 16:1–8. doi: 10.4238/gmr16039854.
- Lewis P, Zaykin D. (2000). Genetic Data Analysis (GDA): computer program for the analysis of allelic data (software). <http://en.bio-soft.net/dna/gda.html>.
- Marcondes-Ferreira W. (1988). *Aspidosperma* Mart., nom. cons. (Apocynaceae): estudos

- taxonômicos. Universidade Estadual de Campinas, SP. pp. 431.
- Miles L, Newton AC, DeFries RS, Ravilious C, May I, Blyth S, Kapos V, Gordon JE. (2006). A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *J Biogeogr* 33:491–505. doi: 10.1111/j.1365-2699.2005.01424.x
- Murphy PG, Lugo AE. (1986). Ecology of Tropical Dry Forest. *Annu Rev Ecol Syst* 17:145–155. doi: 10.1146/annurev.es.17.110186.000435.
- NCBI. VecScreen. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/> (Accessed 2017 Mar 10).
- NCBI. BLAST. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Accessed 2017 Mar 10).
- Pennington RT, Lavin M, Oliveira-Filho A. (2009). Woody Plant Diversity, Evolution, and Ecology in the Tropics: Perspectives from Seasonally Dry Tropical Forests. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40:437–457. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.110308.120327.
- Pennington RT et al. (2000). Neotropical Seasonally Dry Forests and Quaternary Vegetation Changes. *J Biogeogr* 27:261–273. doi: 10.1046/j.1365-2699.2000.00397.x.
- Prado DE, Gibbs PE. (1993). Patterns of Species Distributions in the Dry Seasonal Forests of South America. *Ann Missouri Bot Gard* 80:902. doi: 10.2307/2399937.
- Rice WR. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1), 223–225. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb04220.x>.
- Rousset F. (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the gene pop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8:103–106.
- Technelysium. Chromas v.2.6.5 - DNA sequencing software. <https://technelysium.com.au/wp/chromas/> (Accessed 2017 Mar 10).
- Temnykh S, DeClerck, Lukashova A, Lipovick L, Cartinhor S, McCouch S. (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res* 11:1441–1452.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40:e.115.
- Veloso HP, Rangel Filho ALR, Lima JCA. (1991). Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. IBGE, Departamento de recursos Naturais, Rio de Janeiro.

Woodson RE. (1951). Studies in the Apocynaceae. VIII. A Interim Revision of Genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc. Ann Missouri Bot Gard, 38:119–206.

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: A review. Mol Ecol 11:1–16. doi: 10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x.

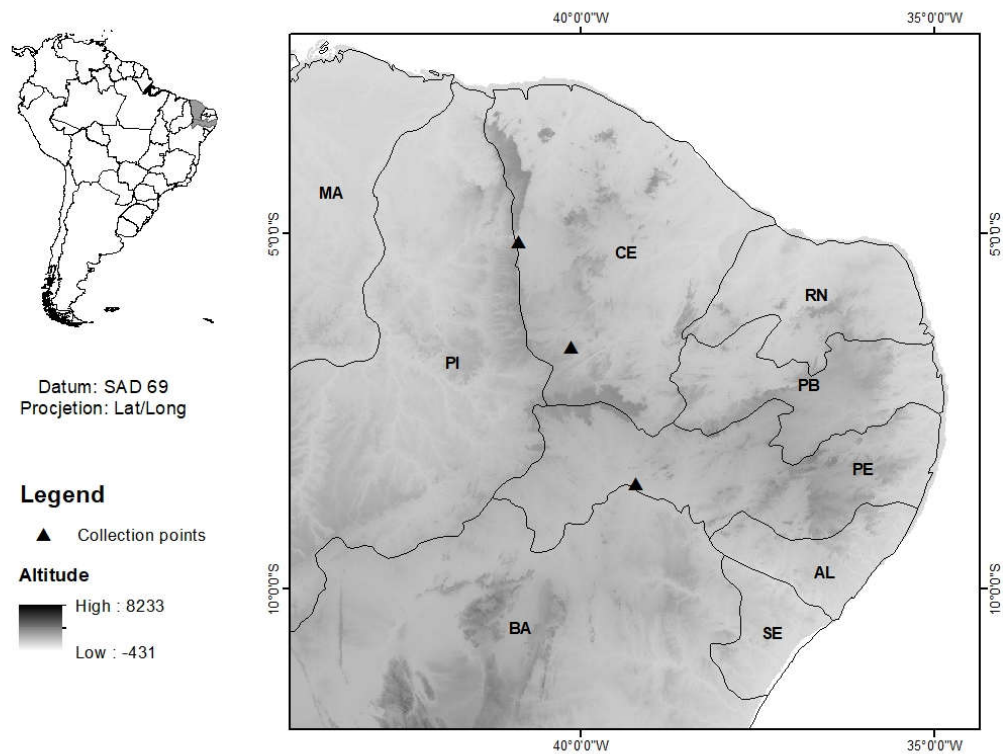


Figure 2. Localities of the populations collected for the characterization of the microsatellite markers.

Table 1. Primers developed for *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc.

Marker	Primer Sequence (5'-3')	Motif	Ta (°C)	Range size (bp)	GenBank
Apy_01	F: TCTCCCTCGTTACTCCGTAT R: TCCTTCCTTACCCTCTGTGA	(GT) ₈	60	157	MK425611
Apy_02	F: GCTGGTAGTGAAGGGACAGG R: TCATTGAACTTCCCCCTGCC	(GT) ₆ (TG) ₅ (GA) ₁₁ (CGGA) ₃	55	278	MK425612
Apy_03	F: TCCAGCTGGGAATGAGTTTT R: CGAAGGCAAGAAAATGACGT	(AG) ₃₂	60	260	MK425613
Apy_04	F: TGTTCCTCTCTCCTCGCTTC R: CAAACTCGCCATTACTGCAA	(TG) ₈	60	241	MK425614
Apy_05	F: GGCTTTTTACACCAAAACCT R: GTATGGAATTTTGGTGGGGC	(CT) ₁₉	60	176	MK425615
Apy_06	F: ACAGTAGTGATATTTGCGCT R: AAGGCTGTTAATGCTACCCA	(CT) ₂₅	60	249	MK425616
Apy_07	F: CCGATCGAAGAGGATGTAGG R: CCACTGTGTCATACTTTGGC	(CT) ₁₀ (CA) ₁₁	60	257	MK425617
Apy_08	F: TCTTGTGACGAAGGTTACACA R: TTGACTTGAGCAGACAACCT	(TG) ₇	55	238	MK425618
Apy_09	F: CTTCTGCAATCTTAAGAAGGG R: CGGCAACCTGAAAATGTGAT	(GT) ₁₀ (G) ₁₀	60	179	MK425619
Apy_10	F: GCAGCTGGAGAATTTGCACT R: ATGTCCAGGGGGTTGTGTAT	(CT) ₉ (TC) ₁₀	60	237	MK425620
Apy_11	F: TAACGAGGCCCCACAATAGC R: CCTGTGATGCAAGGGAAGGT	(GT) ₁₀ ... (GA) ₁₅ (A) ₉	60	249	MK425621
Apy_12	F: GCTGGTCTTGTGGGACTTGA R: TCCTAGCCCGTTCTCATCCA	(TGA) ₄ ... (GT) ₃	60	257	MK425622
Apy_13	F: ACCTTTTGCTTGCTTTAGAAAAAGT R: CACGGCTTCCAGACTGTCTT	(TG) ₁₀	55	105	MK425623
Apy_14	F: AGCAATTCAACATCCAAGCA R: AGATCTTTTTCGCACTCTCTC	(GT) ₉	60	211	MK425624
Apy_15	F: AGAGTCTATTTTAATCTCTGTCCA R: TCCACTTCTAAACCAGGCCA	(TG) ₁₁	60	282	MK425625
Apy_16	F: GCGTAGTTTAAAGATCTTTTCGCA R: GGGATGGTAAGAAGAGGGCG	(CT) ₃ (CA) ₉	60	177	MK425626
Apy_17	F: TGCTTGTTTCCATGGTTGCT R: CCTAAGGGTTCAGGGCGATT	(CT) ₄ ... (CT) ₃ ... (CT) ₄	55	290	MK425627
Apy_18	F: TGCCATTTAGGAGGAATCAATG R: TGAACCCTGTGAATTGCGTG	(AG) ₄ ... (AG) ₄	60	226	MK425628
Apy_19	F: TCAAGTTTGGCAATTACCTGCC R: TCCGGATGTTGCAGAGCTAC	(TGA) ₃	60	178	MK425629
Apy_20	F: GAAACAACCTCTGACACGGG R: AATTCACGACCCCAGGAG	(ATC) ₃	60	151	MK425630

Table 2. Genetic parameters for each locus in different populations of *Aspidosperma pyrifolium*. 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).

LOCI	AI (N = 30)						CR (N = 27)						CA (N = 25)						
	A	Ho	He	Fis	NA	HW	A	Ho	He	Fis	NA	HW	A	Ho	He	Fis	NA	HW	PIC
APY_01	2	0.166	0.155	-0.074	0	1	2	0	0.088	1	0.142	0.023	2	0	0.102	1	0.152	0.028	0,115 ^a
APY_02	6	0.416	0.775	0.468	0.203*	0.000**	4	0.444	0.582	0.242	0.061	0.227	4	0.238	0.6	0.609	0.235*	0.001**	0,677 ^c
APY_03	12	0.666	0.818	0.188	0.07	0.015	13	0.826	0.877	0.059	0.025	0.24	14	1	0.908	-0.102	0	0.924	0,865 ^c
APY_04	15	0.814	0.888	0.084	0	0.037	12	0.666	0.83	0.201	0.104	0.051	12	0.6	0.761	0.215	0.094	0.103	0,875 ^c
APY_05	5	0.724	0.69	-0.049	0	0.004	6	0.894	0.648	-0.394	0	0.014	7	0.59	0.693	0.15	0.007	0.514	0,653 ^c
APY_06	13	0.966	0.881	-0.097	0	0.3	15	0.857	0.903	0.052	0	0.837	14	0.818	0.924	0.117	0.034	0.156	0,910 ^c
APY_07	10	0.533	0.658	0.193	0.083	0.077	10	0.681	0.801	0.152	0.073	0.374	11	0.608	0.807	0.25	0.103	0.009	0,742 ^c
APY_09	4	0.633	0.575	-0.103	0	0.056	5	0.555	0.65	0.15	0.017	0.114	5	0.391	0.723	0.464	0.182	0.000**	0,623 ^c
APY_10	9	0.666	0.703	0.052	0.053	0.076	7	0.652	0.764	0.149	0.077	0.022	9	0.75	0.828	0.096	0.053	0.085	0,782 ^c
APY_11	10	0.655	0.783	0.166	0.079	0.095	13	0.8	0.905	0.118	0.024	0.001**	8	0.625	0.843	0.262	0.103	0.04	0,908 ^c
APY_12	3	0.166	0.409	0.597	0.158	0.000**	3	0.35	0.619	0.441	0.153	0.000**	2	0.125	0.19	0.349	0.084	0.203	0,383 ^b
APY_13	4	0.9	0.648	-0.398	0	0.004	3	0.608	0.491	-0.244	0	0.171	4	0.666	0.507	-0.321	0	0.317	0,505 ^c
APY_14	4	0.269	0.671	0.604	0.244*	0.000**	4	0.133	0.531	0.755	0.269*	0.000**	5	0.619	0.632	0.022	0.031	0.566	0,621 ^c
APY_15	5	0.827	0.695	-0.194	0	0.000**	5	0.772	0.764	-0.011	0.006	0.003**	5	0.75	0.676	-0.111	0	0.013	0,711 ^c
APY_16	5	0.633	0.681	0.072	0.026	0.139	7	0.72	0.647	-0.114	0.026	0.119	6	0.791	0.635	-0.252	0	0.396	0,603 ^c
APY_17	2	0.766	0.494	-0.565	0	0.002**	2	0.76	0.48	-0.6	0	0.004	2	0.083	0.081	-0.022	0	1	0,370 ^b
Valores Médios/Totais		0.612	0.657	0.069				0.607	0.661	0.082				0.54	0.619	0.129			

Appendix A. Transferability of microsatellites to species of the genus *Aspidosperma*.

	Apy_01	Apy_02	Apy_03	Apy_04	Apy_05	Apy_06	Apy_07	Apy_08	Apy_09	Apy_10
<i>A. multiflorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>A. brasiliense</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>A. nobile</i>	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>A. polyneuron</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>A. quebrabro- blanco</i>	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>A. ramiflorum</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>A. inundatum</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>A. rigidum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>A. schultesii</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>A. illustre</i>	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>A. subincanum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Total	11	11	8	9	11	5	11	0	8	5

Continued from Appendix A. Transferability of microsatellites to species of the genus *Aspidosperma*.

	Apy_11	Apy_12	Apy_13	Apy_14	Apy_15	Apy_16	Apy_17	Apy_18	Apy_19	Apy_20	Total
<i>A. multiflorum</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	13
<i>A. brasiliense</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	13
<i>A. nobile</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	10
<i>A. polyneuron</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	12
<i>A. quebrabro- blanco</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	10
<i>A. ramiflorum</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	9
<i>A. inundatum</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	13
<i>A. rigidum</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	14
<i>A. schultesii</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	16
<i>A. illustre</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	7
<i>A. subincanum</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	16
Total	10	5	5	0	2	11	0	10	9	4	

CAPÍTULO II - DELIMITAÇÃO DO COMPLEXO *Aspidosperma pyrifolium* MART. & ZUCC. (APOCYNACEAE)

PATRÍCIA APARECIDA MESSIAS¹, ANA CAROLINA DEVIDES CASTELLO²,
ALESSANDRO PEREIRA ALVES², FÁBIO MATOS ALVES², FÁBIO PINHEIRO²,
ANETE PEREIRA DE SOUZA², INGRID KOCH²

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Instituto de Bioiências, Departamento de Botânica, Universidade do estado de São Paulo “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 18618-689, SP, Brasil

² Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, 13083-862, SP, Brazil

Resumo

“Espécie” dentro da biologia é um termo cercado por debates e contradições. Definir o que é espécie é essencial, pois são unidades fundamentais para a biologia. Mas, encontrar os limites entre as diferentes espécies não é uma tarefa fácil, principalmente em grupos complexos. A partir do conceito de que espécies são segmentos de linhagens de uma metapopulação evoluindo separadamente, e a utilização de uma abordagem interdisciplinar, realizamos a delimitação do complexo de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. através de critérios evolutivos, genéticos, morfológicos e ecológicos. Testamos a monofiletismo do complexo e seus grupos com análises filogenéticas Bayesianas e Máxima Verosimilhança, e através da Análise de Coalescência construímos uma árvore de espécie, todas com os marcadores ITS e rpl32-trnL. Medimos a diversidade genética e estruturação das populações do complexo com 13 microsatélites polimórficos para cinco populações do complexo. Realizamos análises morfométricas com características quantitativas de estruturas vegetativas e florais. Para as análises ecológicas construímos modelos de nicho e realizamos testes de similaridade. As filogenias resultaram em monofiletismo para complexo *A. pyrifolium*, e apresentaram 3 subclados relacionados a regiões geográficas e vegetações específicas, clado 1 na Caatinga no Nordeste do Brasil,

clado 2 nas manchas de Floresta Estacional no Centro-Oeste, Sudeste e Tocantins, e clado 3 na vegetação chaqueana no Mato grosso do Sul, Paraguai e Bolívia. Todas as análises de estrutura e variação genética 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), reafirmando o resultado da filogenia. Os resultados das análises morfométricas (PCAs) não delimitou os grupos sugeridos pela filogenia, devido a grande sobreposição destes caracteres morfológicos. Os modelos de nicho ecológico e o teste de similaridade indicam que há baixa sobreposição do nicho entre as clados sugeridos pela filogenia. Portanto, com base nos resultados obtidos, sugerimos a reavaliação da circunscrição taxonômica de *A. pyriforme*, elevando ao nível de espécies os clados suportados por nichos ecológicos, áreas de distribuição geográfica e vegetações relacionadas distintas.

Palavras-Chaves: Filogenia, Coalescência, Modelagem de Nicho Ecológico, Morfometria, Similaridade de Nicho

Introdução

O termo “espécie” dentro da biologia é cercado por debates e contradições, seja pela problemática da definição do conceito ou pelo entendimento do limite entre as espécies (De Queiroz, 2007). Definir esses limites é essencial, pois espécies são unidades fundamentais para o desenvolvimento de estudos em muitas áreas da biologia (Mayr, 2010). Delimitar as espécies não é uma tarefa fácil, principalmente em grupos complexos, devido a possibilidade de formação de híbridos e a existência de espécies crípticas (De Queiroz, 2007). Além disso, dependendo do conceito utilizado, pode-se chegar a circunscrições de espécies completamente diferentes (Mayden, 1997). Devido a essa problemática, De Queiroz (2007) propôs um conceito universal, onde as espécies são segmentos de linhagens de uma metapopulação evoluindo separadamente. Esse processo de divergência entre os segmentos de linhagens é temporalmente estendido, gerando um acúmulo de diferenciações nas características intrínsecas dos indivíduos, entre elas as genéticas, ecológicas e morfológicas, que ocorrem em diferentes momentos do processo (Leaché *et al.*, 2009).

A delimitação de espécies embasada em critérios operacionais múltiplos, de forma integrada, tende a diminuir as visões conflitantes que podem ocorrer quando se utiliza um único critério operacional (De Queiroz, 2007; Leaché *et al.*, 2009; Cadena & Cuervo, 2010), além de aumentar a capacidade de detectar linhagens recentemente separadas ou com rápida diversificação (Sites & Marshall, 2003).

Várias são as evidências que os sistematas podem utilizar para avaliar os limites entre as espécies, desde a tradicional morfologia até as usuais ferramentas genéticas e as abordagens ecológicas (De Queiroz, 2007). O critério morfológico é baseado na descontinuidade das características morfológicas entre as espécies (André *et al.*, 2015). Essa abordagem associada a análises morfométricas permite verificar os limites entre espécies de forma mais objetiva (Souza *et al.*, 2014; Simo-Droissart *et al.*, 2016). As análises morfométricas são utilizadas para elucidar padrões nos complexos de espécies e testar a diferenciação entre os grupos intraespecíficos (Kaplan & Marhold, 2012). Além disso, os resultados obtidos podem ser comparados com citótipos ou distribuições geográficas, e apontar os caracteres que podem ser utilizados para diferenciar os táxons (Marhold, 2011).

Análises filogenéticas, por sua vez, permitem testar o monofiletismo de uma espécie ou grupo de espécies e estimar as relações de parentesco, permitindo uma melhor compreensão dos limites entre as linhagens evolutivas (Knowles & Carstens, 2007). A

partir de um enfoque populacional é possível verificar agrupamentos genéticos, compreender as forças que alteram as frequências dos alelos, e consequentemente a diferenciação entre os grupos (Carstens *et al.*, 2013). A fusão dessas duas vertentes ocorre no modelo coalescente, onde é estimada a filogenia em níveis mais baixos de diversificação, intraespecíficos (Carstens *et al.*, 2013), o que permite avaliar a divergência entre linhagens em complexos em que não houve acúmulo de polimorfismos (Knowles & Carstens, 2007).

A divergência ecológica é também um fator importante no processo de separação de linhagens (Leaché *et al.*, 2009), pois mesmo espécies próximas podem possuir preferências ambientais que resultam em limites geográficos distintos (Poudel *et al.*, 2012). A modelagem de nicho ecológico é uma ferramenta que oferece uma abordagem eficaz para investigar os padrões de ocupação do ambiente (Peterson *et al.*, 2011; Tocchio *et al.*, 2015), explorando a divergência ou a similaridade entre os organismos, e identificando barreiras ou zonas de contato, evidências que facilitam a compreensão da separação de linhagens e processos evolutivos (Wiens & Donoghue, 2004; Tocchio *et al.*, 2015; Machate *et al.*, 2016).

Nesse estudo, selecionamos uma espécie de *Aspidosperma* Mart. & Zucc., um dos gêneros arbóreos mais representativos da família Apocynaceae no Brasil, com cerca de 60 espécies (Castello *et al.*, 2019). Em sua circunscrição atual, *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. possui ampla distribuição com populações disjuntas, ocorrendo em vegetação de Caatinga na região Nordeste do Brasil, e em formações vegetais com solos pedregosos nas regiões Centro-Oeste e Sudeste (Marcondes-Ferreira, 1988; Castello *et al.*, 2019). Ocorre também em vegetação de Chaco no Brasil, Paraguai e Bolívia (Jørgensen *et al.*, 2014; Killeen *et al.*, 1993).

Aspidosperma pyrifolium apresenta variação morfológica que podem ser relacionadas à sua distribuição. Estas discontinuidades embasaram decisões taxonômicas prévias, com táxons considerados sinônimos de *Aspidosperma pyrifolium*; *A. molle* Mart. (localidade típica: Bahia) foi tratada como *A. pyrifolium* var. *molle* (Mart.) Müll. Arg. por Müller-Argovensis (1860) e sinonimizada à *A. pyrifolium* por Miers *et al.* (1878); *A. refractum* Mart. & Zucc. (localidade típica: Bahia) foi sinonimizada por Woodson (1951) e restabelecida por Castello *et al.* (2019); e *A. populifolium* A.DC. (localidade típica: Piauí), *A. martii* Manso ex Mart (localidade típica: Mato Grosso) e *A. guaraniticum* Malme (localidade típica: Paraguai) foram sinonimizadas à *A. pyrifolium* por Woodson (1951).

Nesse contexto, testamos uma abordagem integrativa, utilizando critérios morfológicos, genéticos e ecológicos para avaliar a circunscrição de *Aspidosperma pyrifolium* e verificar se esta deve ser tratada como uma única espécie, amplamente distribuída, ou como um conjunto de espécies com padrões de distribuição mais restritos. Baseados na distância entre as populações e nas diferenças entre os ambientes de ocorrência, nossa hipótese é que devem ser reconhecidas mais de uma espécie nesse complexo.

Material e Métodos

Análises Moleculares

- **Análises Filogenéticas**

Amostramos dois a três espécimes de *A. pyrifolium* de cada uma de 12 localidades, totalizando 34 amostras do complexo (Figura 1). Além destas, amostramos também 55 outras espécies de *Aspidosperma*, uma espécie de *Microplumeria* e duas de *Geissospermum*, representando o grupo externo (Apêndice A). Extraímos o DNA do material utilizando o protocolo modificado desenvolvido por Doyle (1991), quando seco em sílica, e utilizando Tel-Zur *et al.* (1999) quando o material era herborizado. Realizamos a quantificação de DNA dos produtos da PCR no aparelho Nanodrop.

Utilizamos um marcador nuclear (ITS) (Pereira *et al.* dados não publicados) e um plastidial (rpl32-trnL) (Shaw *et al.*, 2014) (Tabela 1). Realizamos as amplificações dos fragmentos através de Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando 1.5 µL de DNA total, 1 µL de cada primer, 1 µL de Betaína, 1 µL de DMSO 5% ou 10% e 1 µL de Albumina do soro bovino (BSA) e 6.25 µL de Taq DNA polimerase Green Master®, resultando em um volume final de 11.25 µL. As temperaturas que utilizamos nos ciclos das PCRs com ITS foram: desnaturação inicial de 94° C por 3 min, seguida por 34 ciclos de 94° C por 1 min, 60° C por 1 min, 72 ° C por 1 min, e alongamento final de 72° C por 8 min (Simões *et al.*, 2016; Simões *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2007). Modificamos apenas a temperatura de anelamento para o primer rpl32-trnL para 56.4° C. A purificação dos produtos de PCR foi feita com Polietilenoglicol (PEG 20%) e dNTPs (Dunn & Blattner, 1987).

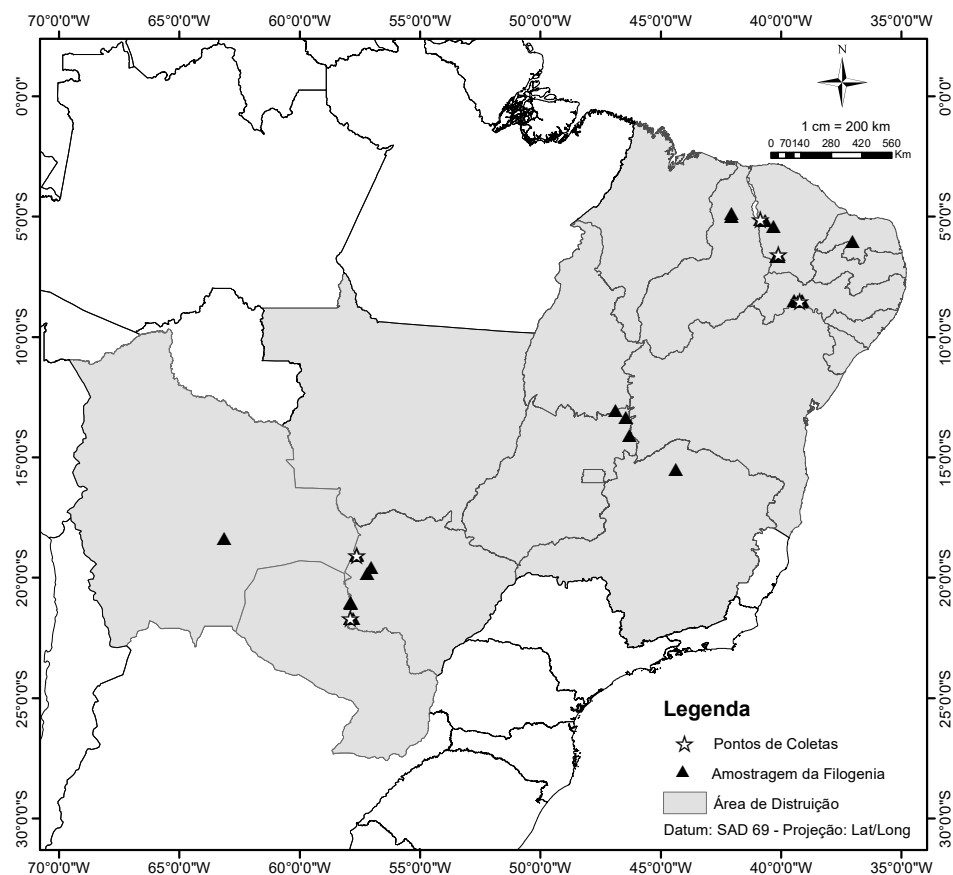


Figura 1 - Distribuição do Complexo *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc., localidades das populações coletadas para as análises populacionais e localidades amostradas para filogenia.

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

Marcador	Primer	Sequência 5'–3'	Referência
ITS	ITS_18S_25F	AAGTCGTAACAAGGTTTCCGT	Pereira <i>et al.</i> (dados não publicados)
	ITS_26S_21R	TGCTTAAACTCAGCGGGTAGT	
rpl32-trnL	rpl32	CAGTTCCAAAAAACGTACTT	Shaw <i>et al.</i> , 2014
	trnL	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	

Para as análises, realizamos testes com sequências isoladas e concatenadas. Alinhamos as sequências com o algoritmo MAFFT, versão 7.017 (Kato & Standley, 2013), implantado no programa Geneious v.10.2.3. (Kearse *et al.*, 2012) utilizando a estratégia G-INS-i. Selecionamos o modelo de substituição através do programa Partition Finder (Lanfear *et al.*, 2016), implantado na Cipres Science Gateway (Miller *et al.*, 2010), utilizando o Critério Bayesiano de Informação (BIC) para selecionar o melhor modelo.

Realizamos a Análise Bayesiana no programa MrBayes v.3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2016), com duas corridas independentes, quatro cadeias com 100 milhões de gerações, e amostragem a cada 1000 gerações. Combinamos as árvores resultantes na plataforma R (R CoreTeam, 2018) e aplicamos 25% de *burn-in*. Construímos uma árvore com o método de “*maximum clade credibility*” no software TreeAnnotator (Bouckaert *et al.*, 2014). Consideramos os clados com probabilidade posterior maior que 0,95 fortemente suportados (Huelsenbeck & Rannala, 2004).

Para a Máxima Verossimilhança utilizamos o RAxML on XSEDE (Stamatakis, 2014), com o modelo GTRGAMMA e 1000 interações de bootstrapping. Avaliamos os suportes dos clados como fracos quando os valores estavam entre 50 a 70%, moderados quando os valores estavam entre 71 a 85% e fortes para valores maiores que 85% (Kress *et al.*, 2008). O consenso de maioria foi utilizado para gerar as árvores. Realizamos ambas as análises na plataforma *CIPRESS Science Gateway* (Miller *et al.*, 2010).

Nós também estimamos as relações do complexo usando árvore de espécies no software Astral-II (Mirarab & Warnow, 2015). Este programa baseia-se em método coalescente e permite reconhecer melhor as relações entre complexos que possuem separação incompleta das linhagens (Mirarab & Warnow, 2015; Prata, 2017). Usamos para a análise um conjunto de 20000 árvores não enraizadas de cada marcador estimadas no programa RaxML v8 (Stamatakis, 2014), implementado na plataforma *CIPRESS Science Gateway* (Miller *et al.*, 2010).

- Análises Populacionais

Determinamos as localidades das coletas dos indivíduos em populações naturais de *Aspidosperma pyrifolium* a partir dos estudos de Woodson (1951), Marcondes-Ferreira (1988) e de consulta aos dados do Re flora-Herbário Virtual (Re flora, 2018) and INCT–Herbário Virtual da Flora e Fungos (SpeciesLink, 2018). Realizamos as coletas das populações naturais em cinco localidades: Crateús (CR) e Aiuaba (AU) (Ceará), Cabrobó

(CA) (Pernambuco), Corumbá (CO) e Porto Murtinho (PM) (Mato Grosso do Sul) (Figura 1, Apêndice B). Infelizmente, as coletas nas localidades selecionadas nos estados de Goiás e Minas Gerais não puderam ser realizadas a tempo para a realização desse trabalho.

Em cada localidade amostramos as folhas de no mínimo 20 indivíduos, totalizando 140 amostras. Secamos e armazenamos as folhas devidamente identificadas em sílica gel. Coletamos ramos dos espécimes em cada localidade para confirmação da identificação e confecção de material testemunho, que serão depositados no Herbário do Instituto de Biociências de Botucatu – BOTU. Extraímos o DNA utilizando o protocolo desenvolvido por Doyle (1991) que possui como componente o CTAB, e quantificamos no aparelho Nanodrop.

Conduzimos as análises populacionais com 13 marcadores microssatélites desenvolvidos para *A. pyrifolium* (Capítulo I). Realizamos a caracterização da diversidade genética das populações com estatísticas descritivas: heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e), número médio de alelos (NA), número de alelos privados (AP) e coeficiente de endogamia (F_{is}) estimados no software GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Calculamos a taxa de Cruzamento Aparente (Vencovsky *et al.*, 1994). Testamos o equilíbrio de Hardy-Wendberg (EHW) no pacote “diveRsity” (Keenan *et al.*, 2013), no programa R (R CoreTeam, 2018).

Avaliamos a estrutura populacional com o programa Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) e DAPC (Jombart *et al.*, 2010) através do “adegenet” (Jombart & Ahmed, 2011). Utilizamos para isso também as estatísticas F através do pacote “diveRsity” (Keenan *et al.*, 2013). Realizamos a análise de variância molecular (AMOVA, Michalakis & Excoffier, 1996) com “poppr” (Kamvar *et al.*, 2015). Também estimamos a distância genética de Nei (Nei, 1978) com “heatmap3” (Shilin *et al.*, 2015) e construímos um dendrograma com o método de neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) com o pacote “poppr” (Kamvar *et al.*, 2015), utilizamos 1000 réplicas de bootstrap para estimativa de suporte dos ramos. Realizamos todas as análises no software R (R Core Team, 2015).

Análises Morfométricas

Analizamos materiais herborizados (Apêndice C) depositados nas coleções UEC, EAC, HUEG, COR e CGMS. Escolhemos as características morfológicas utilizadas nas análises com base nos estudos e revisões realizadas para gênero (Candolle, 1844; Duarte,

1970; Marcondes-Ferreira, 1988; Marcondes-Ferreira & Kinoshita, 1996; Müller-Argovensis, 1860; Pichon, 1947; Schumann, 1895; Woodson, 1951). Inicialmente selecionamos 26 características quantitativas e 28 qualitativas, descartamos os indivíduos e caracteres com muitos dados faltantes e as que não possuíam variação, totalizando ao final 68 indivíduos e 24 características quantitativas (Tabela 2). Medimos as estruturas vegetativas com paquímetro digital e as flores fotografamos com o auxílio do estereomicroscópico e medimos com o ImageJ (imagej.nih.gov/ij/).

Realizamos as análises morfométricas a partir dos grupos genéticos apontados nas análises filogenéticas e por meio de Análises de Componentes Principais (PCA), com a função *prcomp* do pacote *vegan* (Pagès, 2004). Imputamos valores nos dados faltantes por meio da função *mice*, com método *pmm* (*Predictive mean matching*), do pacote *mice* (Van Buuren and Groothuis-Oudshoorn, 2011). Todos os pacotes implementados no programa R (R Core Team, 2018).

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).

Caracteres
Altura
Comprimento do catafilo
Comprimento da folha
Largura da folha
Relação comprimento e largura da folha
Comprimento do pecíolo
Número de nervuras
Distância entre as nervuras
Comprimento do pedúnculo
Comprimento pedicelo
Comprimento da inflorescência
Comprimento das sépalas
Comprimento do tubo da corola
Comprimento lobo da corola
Relação comprimento do tubo e lobo da corola
Altura da inserção da antera
Comprimento da antera
Comprimento Estilete

Comprimento da cabeça do estilete
Largura da cabeça do estilete
Relação comprimento e largura cabeça do estilete
Comprimento do ovário
Largura do ovário
Relação comprimento e largura do ovário

Modelagem de Nicho Ecológico

Geramos os modelos de nichos ecológicos a partir dos pontos de ocorrências confirmados, obtidos que foram na base de dados do INCT–Herbário Virtual da Flora e Fungos (SpeciesLink, 2018) e no campo. A análise foi realizada com os grupos recuperados nas análises filogenéticas. Os dados ambientais foram obtidos do Worldclim 2.0 (2017), com resolução de 5 Km².

Utilizamos o pacote *ENM TheMetaLand* (Andrade e Velazco, 2018) implementado no programa R (R Core Team, 2018), para produzir os modelos. Seleccionamos como parâmetros para geração dos modelos as seguintes funções do pacote: mínimo de dez ocorrências únicas; análise de componentes principais (PCA) com os dados climáticos originais, com utilização dos componentes principais que incluíam 95% da variação dos dados como novas variáveis preditoras (Velazco et al., 2017); restrição da área de ocorrência com o *shapefile* de ecorregiões da WWF (Olson *et al.*, 2001); relação entre a presença e a ausência de um; método de seleção de pseudo-ausências foi “const”, que utiliza o modelo *bioclim* para seleccionar as áreas onde serão incluídas as pseudo-ausências; o treino e teste dos modelos foi realizado com o parâmetro “check”, que particiona a área geográfica como um tabuleiro de damas; seleccionados os algoritmos “Maxent Default”, “Support Vector Machine”, “Generalized Linear Model”, “Random Forest”, “Maximum Likelihood” e “Gaussian”; threshold, para transformar previsões de modelo (probabilidades, distâncias ou valores semelhantes) em uma pontuação binária (presença ou ausência), foi determinado pela função “spec_senc”, que utiliza a soma em que a sensibilidade e especificidade é mais alta; restrição espacial dos modelos a posteriori (“post”) com o método “OBR”, que utilizada a distância entre pontos de ocorrência para excluir manchas adequadas muito distantes. O modelo final para cada espécie foi gerado utilizando a função “Ensembles” e parâmetro “Sup” que utiliza a média dos valores de TSS (True Skill Statistic) de todos os modelos, e utiliza apenas aqueles com TSS acima da média para gerar o modelo final (ver detalhe

dos parâmetros em andrefaa / ENM TheMetaLand). A avaliação dos modelos foi realizada através dos valores de TSS e AUC (Receiver Operating Curve) gerados.

A sobreposição de nicho foi calculada com a função *niche.overlap* no pacote *phyloclim* (Heibl & Calenge, 2015), implementada na plataforma R (R Core Team, 2018), seguindo a metodologia proposta por Broennimann *et al.* (2012). Essa função utiliza as estatísticas *D* (Schoener 1970) e *I* que variam de 0 a 1, indicando não sobreposição a nichos idênticos, respectivamente (Warren *et al.*, 2008).

Resultados

Análises Genéticas

- Filogenéticas

Os modelos de evolução selecionados foram HKY para o marcador *rpl32-trnL* e o K80+G para o ITS. As árvores filogenéticas Bayesianas (BI) e de Máxima Verossimilhanças (ML), com marcadores isolados e concatenados, apresentaram o complexo *A. pyrifolium* como um grupo monofilético com alto suporte em todas as análises (Figura 2A e Apêndices C-G). A topologia mostra três clados dentro do complexo, representados como clado 1, clado 2 e clado 3, com alto valor de probabilidade posterior ($pp \geq 0,95$) em BI e ML ($BS > 0,85$) concatenadas e com o ITS isolado (Figura 2A e Apêndices C e D), para BI e ML com *rpl32-trnL*, clado 1 foi recuperado com alto suporte, mas o clado 3 apresentou baixo valor ($pp = 0,53$ e $BS = 0,61$, respectivamente) e o clado 2 não foi recuperado como monofilético. Nas análises que recuperaram clados, as relações entre eles frequentemente aparecem o clado 1 como grupo irmão do clado que contém os clados 2 e 3. As relações internas dos clados 1, 2 e 3, quando apresentaram resolução nas análises, foram com baixos valores de probabilidade posterior.

O mesmo resultado foi obtido na árvore de espécies obtida por coalescência (Figura 2B), que recuperou o complexo como um grupo monofilético ($BS \geq 0,85$). A análise também apresentou grupos com suporte dentro os clados, e especificamente para o clado 2 recuperou as populações/localidades com alto suporte.

Os subclados recuperados dentro do complexo representam conjuntos de indivíduos relacionados à regiões geográficas disjuntas e diferentes vegetações. O clado 1 composto por indivíduos de localidades na Caatinga da região Nordeste, o clado 2 por indivíduos de enclaves de Floresta Estacional da região Centro-Oeste, e o clado 3 por indivíduos de vegetação Chaqueana no Mato Grosso do Sul, Paraguai e Bolívia.

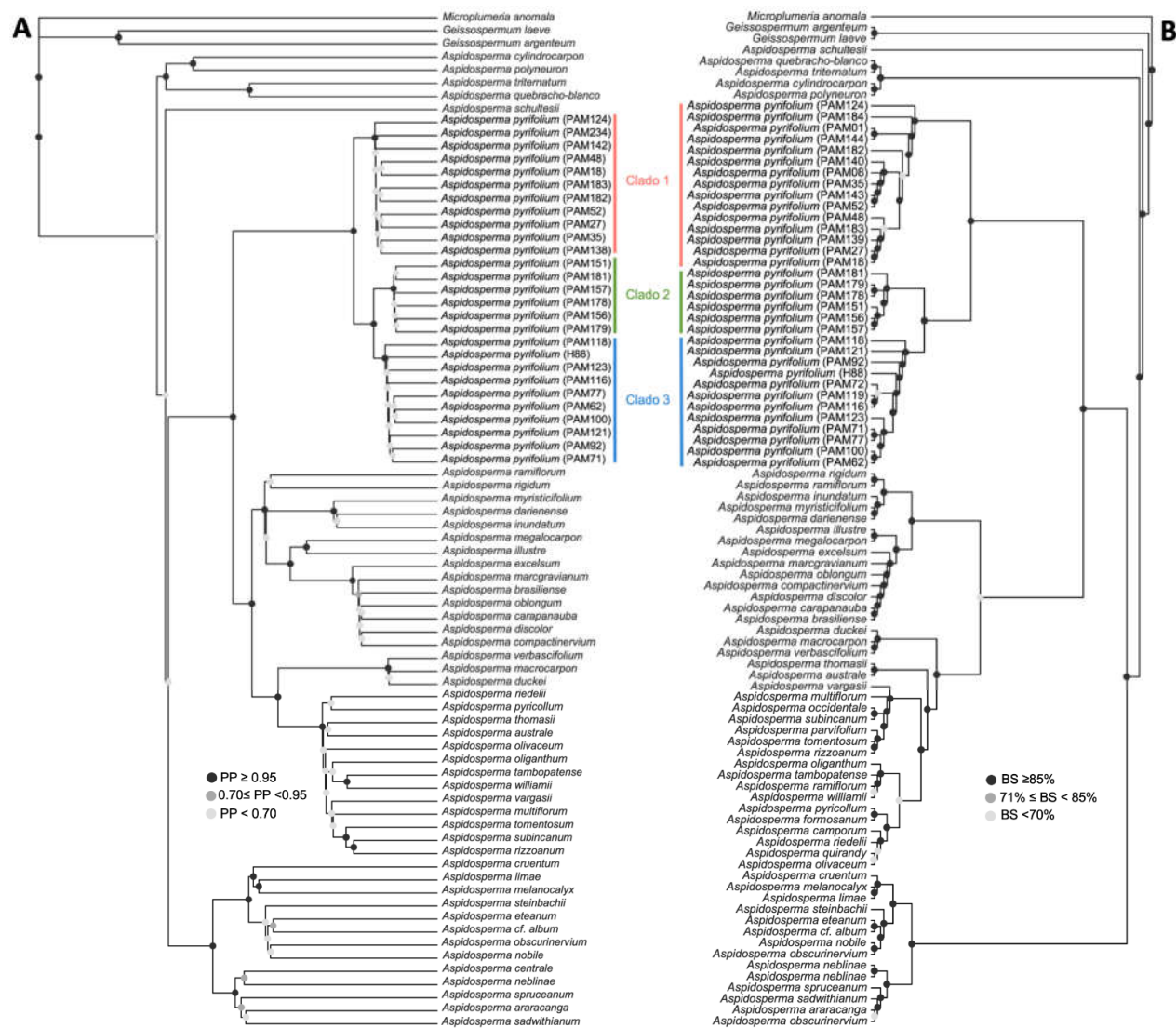


Figura 2. A. Árvore obtida por Análise de Inferência Bayesiana utilizando matriz concatenada, e B. Árvore de Espécies obtida por Análise de Coalescência. Ambas para o Complexo *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. Utilizando os marcadores ITS e rpl32-trnL. Valores de suporte são probabilidades posteriores.

- Populacionais

A caracterização da diversidade genética das populações através das estatísticas descritivas (Tabela 3) mostrou que o número médio de alelos (NA) variou entre 5.38 a 7.53, respectivamente nas populações CO e CA. O número de alelos privados (AP) variou de nove em PM a 17 em CA. A heterozigosidade observada (Ho) foi menor do que a Esperada (He) em todas as populações, com valores entre 0.456 (PM) a 0.584 (CR). A taxa de cruzamento aparente (ta) variou entre 0.71 (CR) a 0.85 (CO), indicando um sistema reprodutivo misto para todas as populações. O coeficiente de endogamia (*Fis*) foi significativo apenas para AU, CR e CA, sugerindo cruzamento entre indivíduos aparentados ou autofecundação nessas três populações. Todas as populações apresentam desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (*P*-valor < 0.05).

Tabela 3 - Estimativas de diversidade genéticas e do coeficiente de endogamia para populações de *Aspidosperma pyrifolium* 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.

Populações	Na	AP	Ho	He	Fis	ta
Aiuaba – CE (N = 30)	7.46	13	0.570*	0.662	0.140**	0.75
Crateús – CE (N = 25)	7.46	13	0.584*	0.668	0.170**	0.71
Corumbá – MS (N = 31)	5.38	10	0.472*	0.494	0.083	0.85
Porto Murтинho – MS (N = 29)	5.23	9	0.456*	0.496	0.092	0.83
Cabrobó – PE (N = 25)	7.53	17	0.572*	0.649	0.166**	0.72

As análises de diversidade genética, PCoA e Distância Genética de Nei, agruparam as populações em dois conjuntos geneticamente distintos. Um agrupamento formado por AU, CR e CA (Nordeste) e outro formado por CO e PM (MS; Figura 3A). Observamos uma menor distância genética de Nei entre as AU e CR (0.12), e uma maior entre CR e CO (0.78) (Figura 3B). A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que a maior parte da variação genética ocorre dentro das populações (75.08%). Entretanto, um valor significativo de divergência pode ser observado entre as populações (24.92%) (Figura 3C).

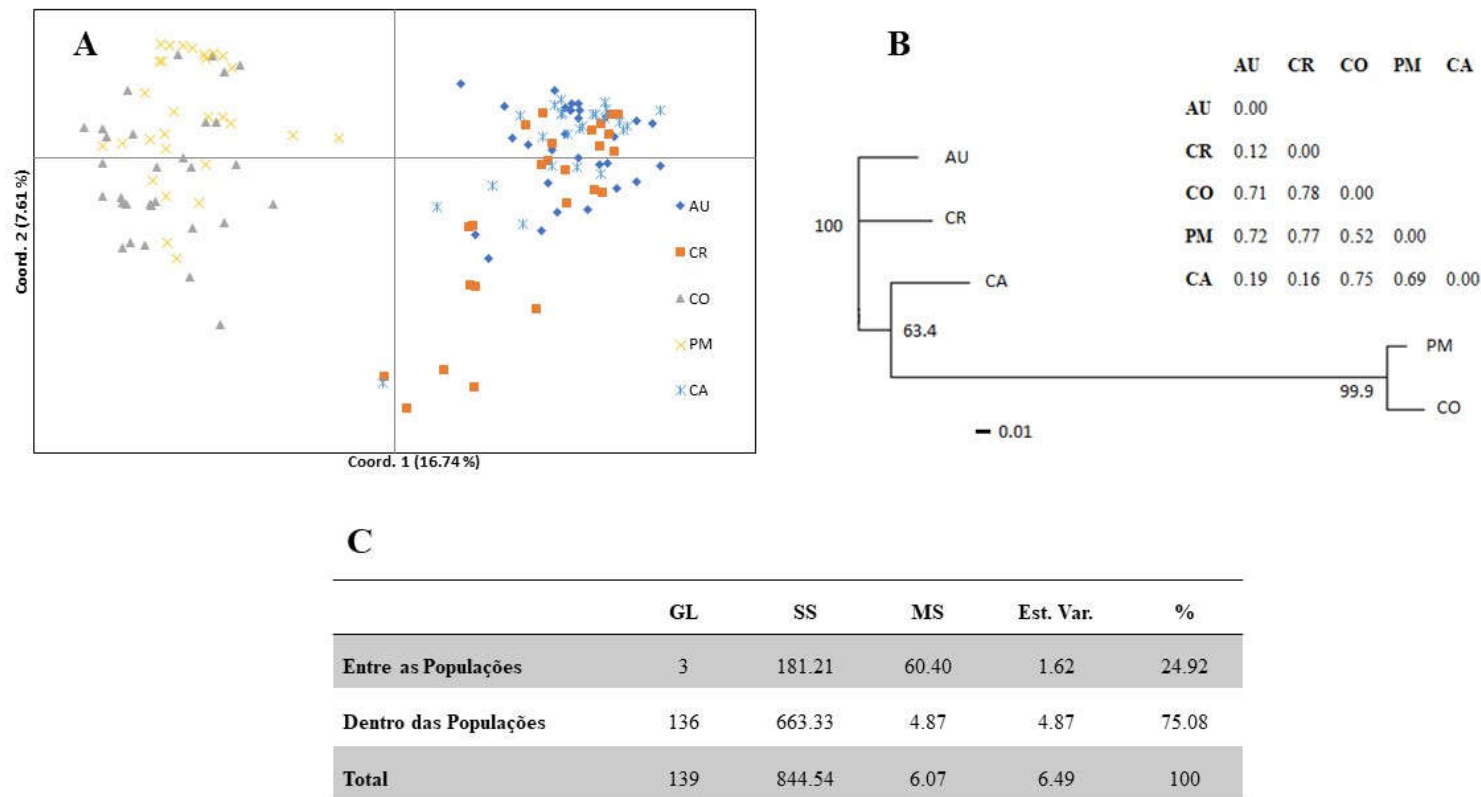


Figura 3 - Análises de Diversidade Genética nas populações do complexo *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. com base em 13 marcadores microssatélites. AU = Aiuaba (CE), CR = Crateús (CE), CO = Corumbá (MS), PM = Porto Murtinho (MS), CA = Cabrobó (PE). **A.** Análise de Coordenadas Principais (PCoA). **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.

A análise de discriminantes de componentes principais demonstrou a formação de cinco grupos genéticos para o conjunto de dados (Figura 6). Entretanto, evidenciou também a formação de dois grupos genéticos maiores, sendo um deles formado pelas populações do Nordeste (AU, CR e CA) e outro pelas populações do Mato Grosso do Sul (CO e PM).

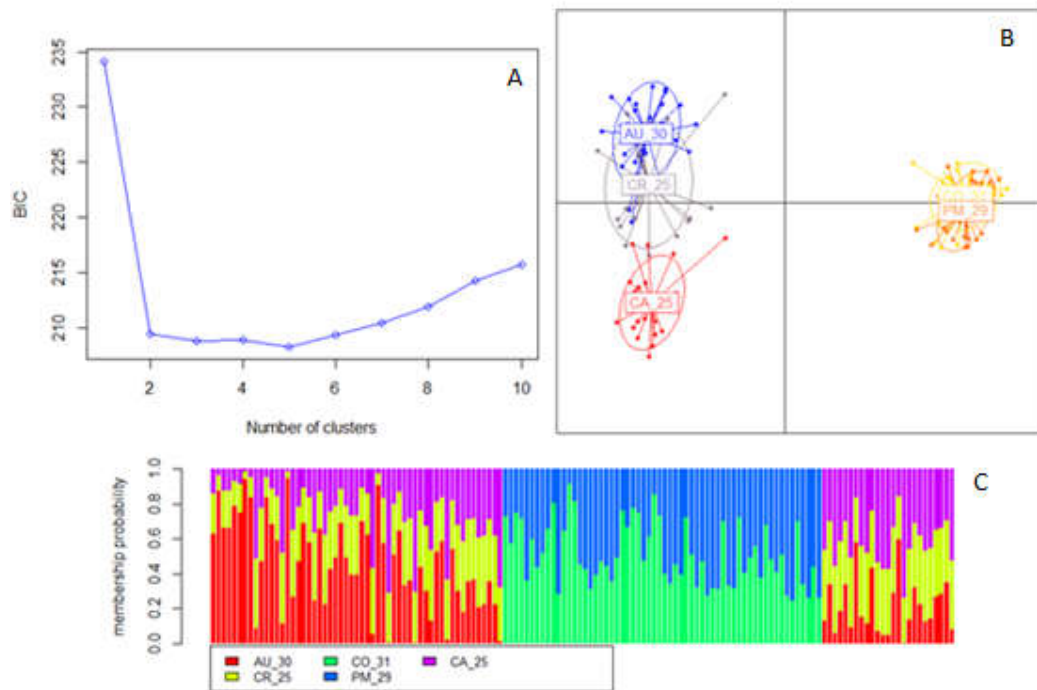


Figura 4 - Análise discriminante de componentes principais para as populações do complexo *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc., com base 13 marcadores microssatélites. A – Número de agrupamentos mais provável indicado pelo menor valor de probabilidade segundo o critério de informação Bayesiana (BIC). 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 Murtinho (MS), CA = Cabrobó (PE).

Os valores de *Fst* indicam moderada (0.05 a 0.15) estruturação genética entre as populações AU-CR, AU-CA, CA-CR e CO-PM, e altíssima (> 0.25) estruturação entre AU-CO, AU-PM, CR-CO, CO-CA e PM-CA (Figura 5D). A análise no programa Structure indicou a existência de dois agrupamentos mais prováveis. Assim, como nas demais análises, houve o agrupamento de um grupo genético formado por populações provenientes do nordeste (AU, CR e CA) e outro com populações do Mato Grosso do Sul (CO e PM), mostrando maior fluxo gênico dentro do que entre estes (Figura 5A-C e Apêndice B).

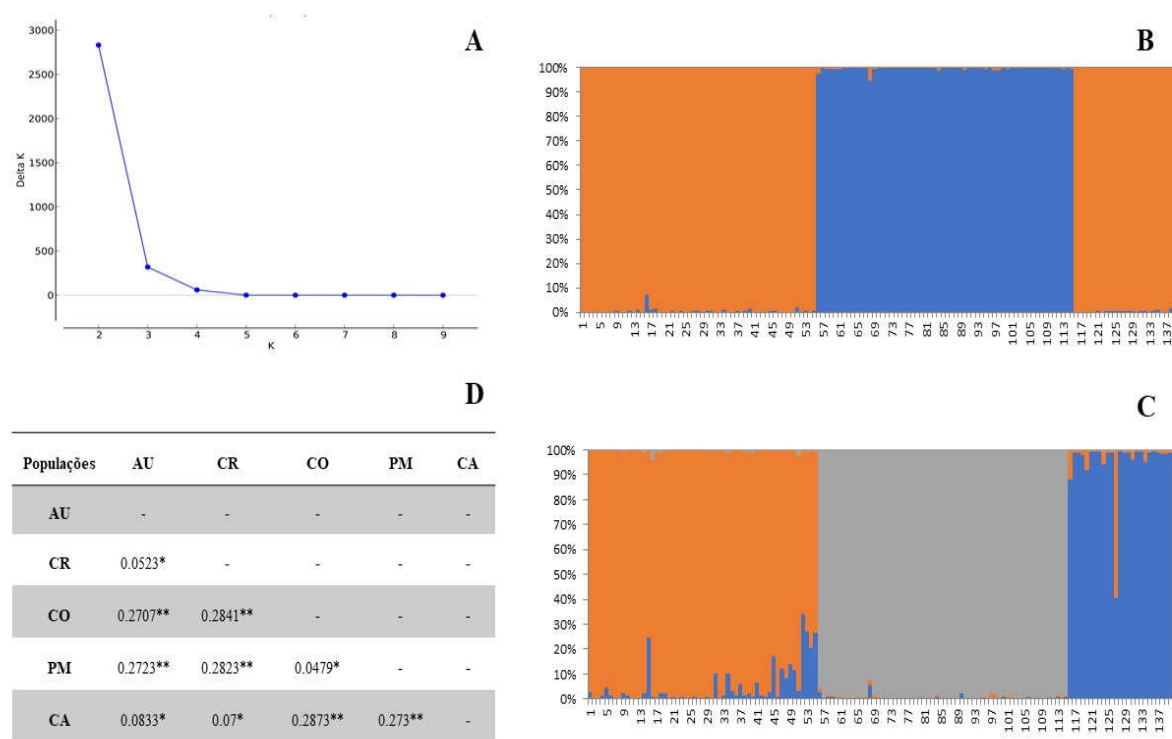


Figura 5 - Análises de Estrutura Populacional para as populações do complexo *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc., com base em 13 marcadores microssatélites. AU = Aiuaba (CE), CR = Crateús (CE), CO = Corumbá (MS), PM = Porto Murinho (MS), CA = Cabrobó (PE). Structure: A – Valores de ΔK (Evanno *et al*, 2005); B – Gráfico de barras construído considerando $K = 2$; C – Gráfico de barras construído considerando $K = 3$ (Apêndice B). D. Valores de F_{st} par a par. * valores com estrutura genética moderada. ** valores com altíssima estruturação genética ($< 0,25$).

Análises Morfométricas

A PCA realizada com os dados selecionados mostrou uma variação de 77.7% para o eixo 1 e 10.6% para o eixo 2 (Figura 6). Apesar da grande variação encontrada nas características quantitativas entre os diferentes clados testados, observamos grande sobreposição, principalmente do clado 3 com os clados 1 e 2. Esse resultado não corroborou aqueles obtidos nas análises filogenéticas.

As variações encontradas nas características vegetativas estão apresentadas nos boxplot (Figuras 7 e 8). Os caracteres vegetativos analisados que apresentaram maior distinção (Figura 7) entre os clados foram: altura do indivíduo, comprimento da folha, largura da folha e comprimento do catafilo. Todos eles apresentaram valores e médias maiores para o clado 2. E as características florais (Figura 8) são: comprimento da inflorescência, comprimento do tubo da corola, comprimento do lobo da corola e comprimento da cabeça do estilete.

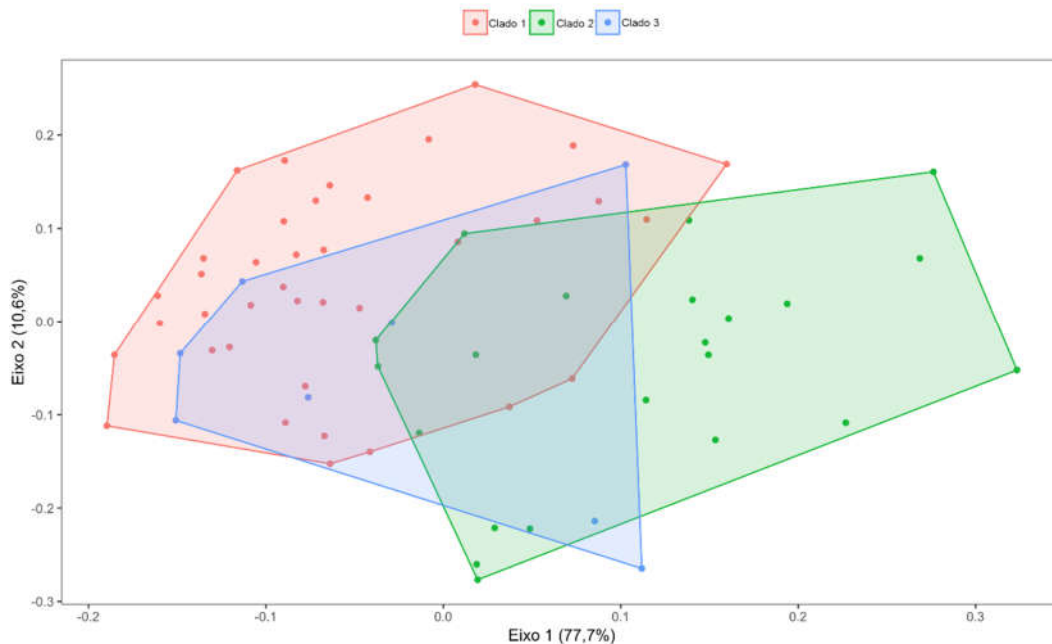


Figura 6. Análise de componentes principais (PCA) a partir dos caracteres quantitativos vegetativos e florais do complexo *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. Eixos 1 e 2 da PCA com seus autovalores variação.

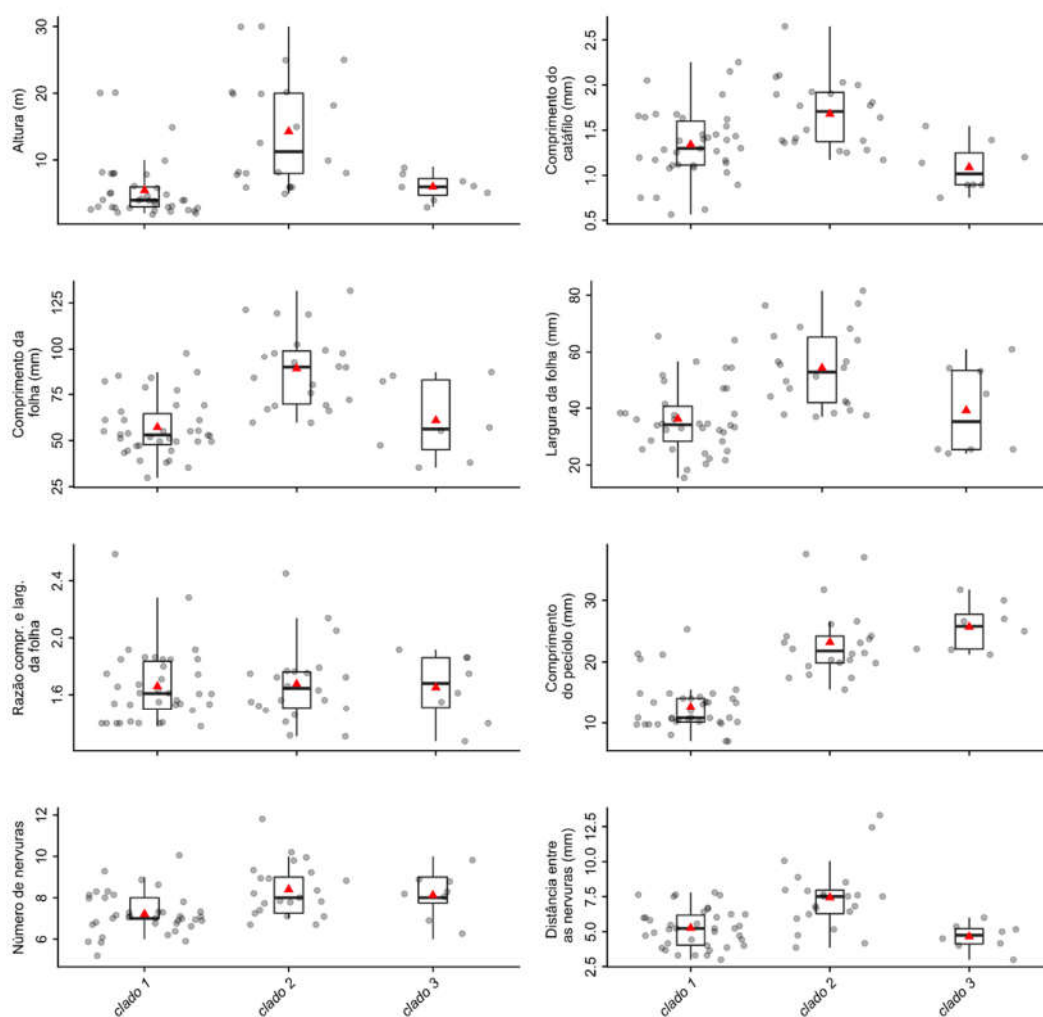


Figura 7 – Boxplots das características vegetativas dos clados do complexo de espécies *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. Valores médios representados pelos triângulos vermelhos; pontos valores originais das características.

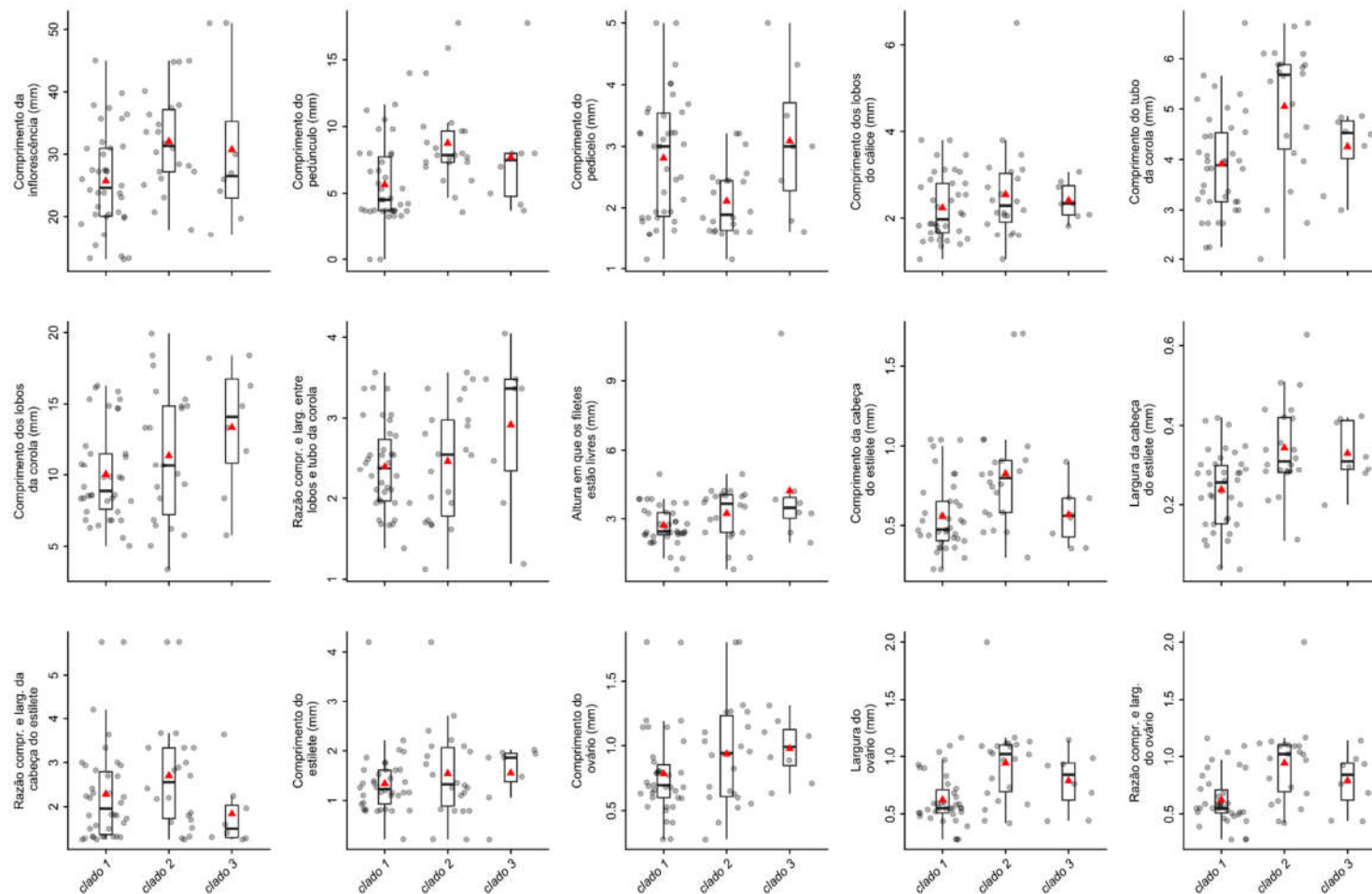


Figura 8 – Boxplots das características florais dos clados do complexo de espécies *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. Valores médios representados pelos triângulos vermelhos e pontos valores originais das características.

Modelagem de Nicho Ecológico

Os modelos de nicho ecológico realizados para o complexo de *Aspidosperma pyrifolium* foram baseados no conjunto de indivíduos agrupados a partir dos resultados da filogenia e da árvore de espécies. Assim, selecionamos 28 registros para clado 1, 25 para o clado 2 e 29 para o clado 3. Apresentamos os “Ensembles” dos algoritmos utilizados (Figura 9). Os valores de TSS indicam capacidade preditiva dos modelos, 0.807, 0.766 e 0.0606, respectivamente para clado 1, clado 2 e clado 3. Assim, como os valores de AUC, clado 1 com 0.892, clado 2 com 0.943 e clado 3 com 1. Os modelos recuperaram os padrões das distribuições conhecidas para os clados.

Todos os valores obtidos nas análises de sobreposição de nicho (Tabela 4) indicam baixa sobreposição (I e $D \leq 0.5$, Prata, 2017), pois quanto mais próximo for o valor de zero menos sobreposição existe (Broemminan, 2005). A Figura 10 A-C também mostra esse mesmo resultado, comparando os reais resultados dos testes de identidades com os valores calculados nas réplicas, quando esses valores reais são menores do que os valores das barras, significa que a sobreposição de nicho observada é menor do que a esperada, indicando nichos mais divergentes (Warren, 2010).

Esses resultados são evidenciados pelas diferenças nas exigências ambientais de cada um dos clados (Figura 10). Analisando os boxplots podemos afirmar que quase todas as variáveis possuem diferença em suas médias, com exceção para isothermalidade entre os clados 1 e 2, máxima temperatura no mês mais quente entre os clados 2 e 3, e sazonalidade da precipitação entre os clados 1 e 2. Destacamos entre as principais diferenças observadas nos boxplots a baixa isothermalidade e a alta sazonalidade de temperatura para clado 3, refletindo em valores extremos nas demais variáveis relacionadas a temperatura. Notamos maiores valores de disponibilidade água para o clado 2 e menores para clado 1. E com relação a sazonalidade de precipitação, os valores são maiores para clado 2 e menores para clado 1.

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).

	Clado 1	Clado 2	Clado 3
Clado 1		0.249	0.074
Clado 2	0.522		0.064
Clado 3	0.226	0.223	

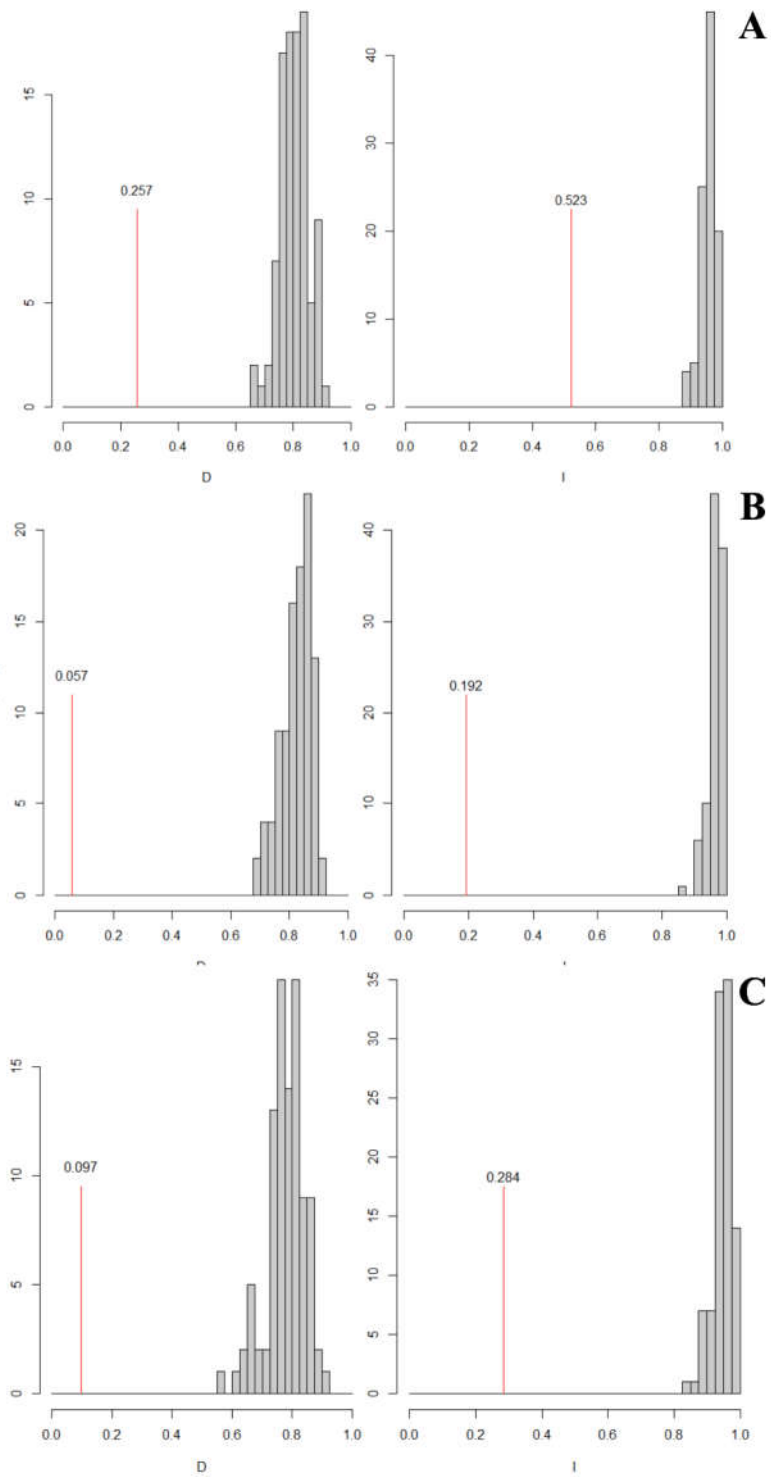


Figura 9. A-C. Teste de identidade de nicho dos clados de *Aspidosperma pyrifolium* Mart & Zucc. A. clado 1 e clado 2; B. clado 1 e clado 3; C. clado 2 e clado 3. As linhas vermelhas indicam os verdadeiros resultados de sobreposição de nicho calculados. As colunas representam os valores de sobreposição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

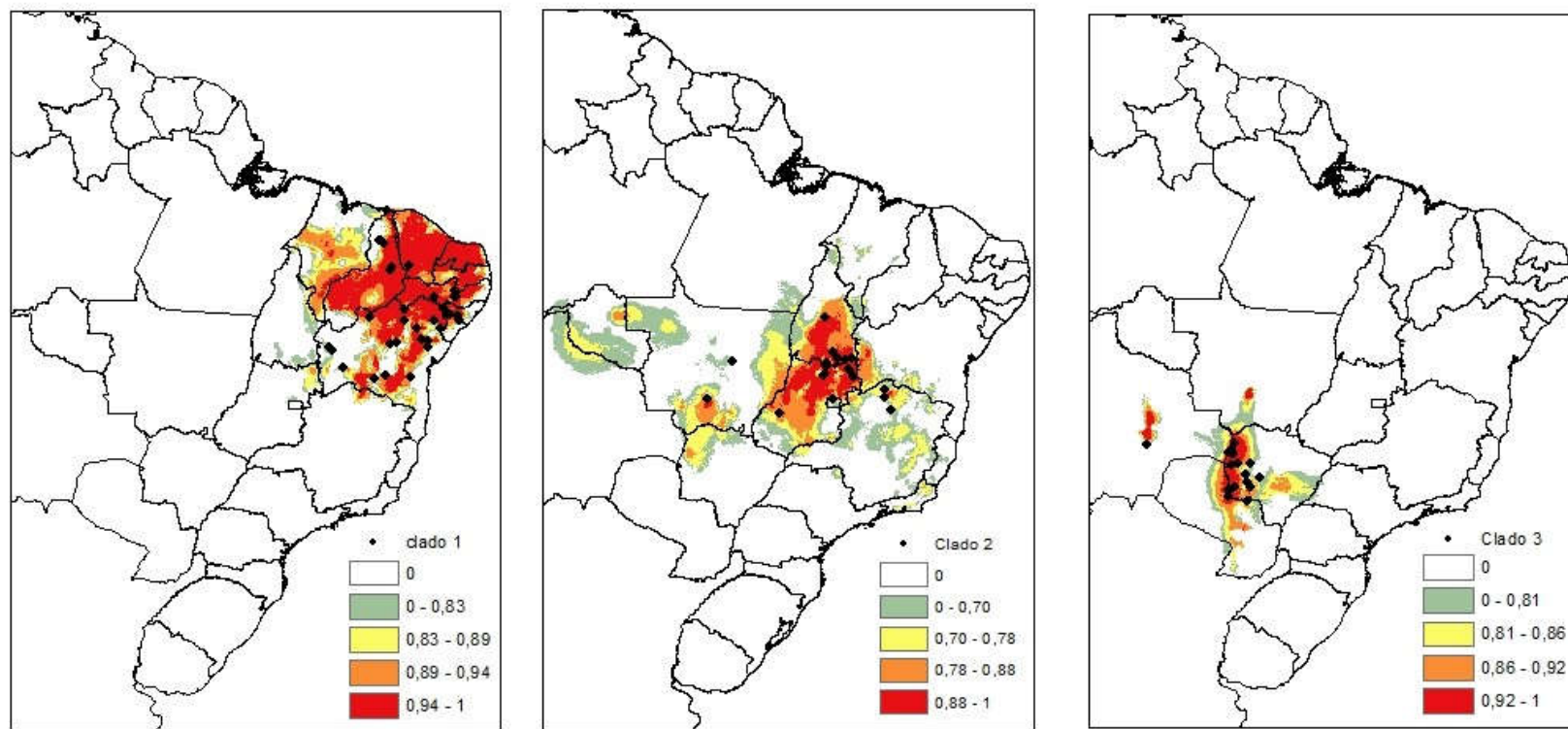


Figura 103 – Áreas de adequabilidade para a ocorrência dos diferentes clados genéticos encontrados no complexo *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc., obtidas a partir da modelagem de nicho ecológico.

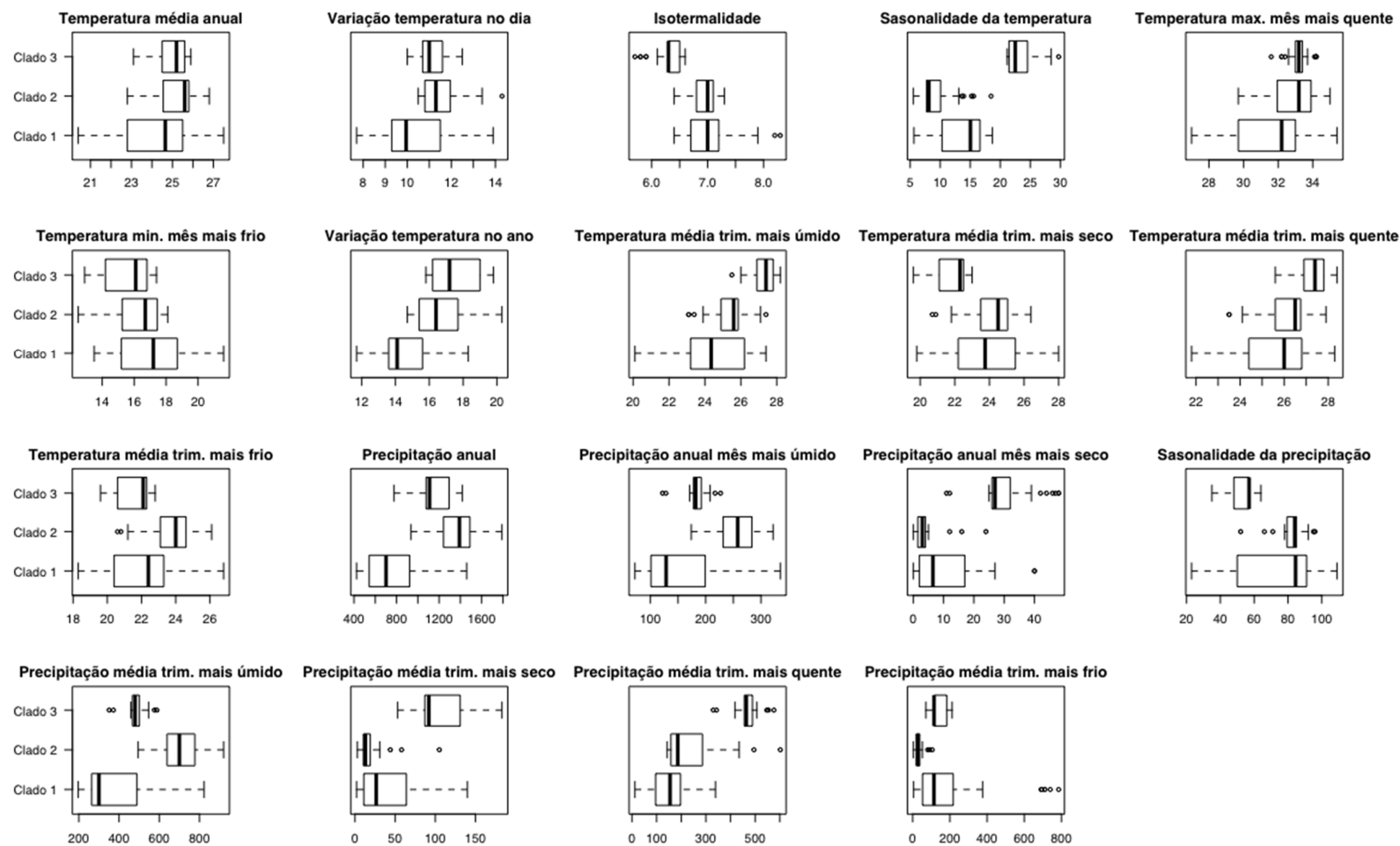


Figura 11 – Boxpots das variáveis climáticas utilizadas nos modelos de nichos ecológicos para os clados do complexo de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc.

Discussão

Análises genéticas

As análises filogenéticas, baseadas nos diferentes métodos e com utilização de matrizes independentes e concatenadas, além da análise de coalescência, geraram topologias congruentes com relação ao monofiletismo do complexo *A. pyrifolium*. Os clados internos recuperados dentro do complexo representam conjuntos de indivíduos relacionados à regiões geográficas disjuntas e diferentes vegetações. O clado 1 composto por indivíduos de localidades na Caatinga da região Nordeste, o clado 2 por indivíduos de enclaves de Floresta Estacional da região Centro-Oeste, Minas Gerais e Tocantins, e o clado 3 por indivíduos de vegetação Chaquiana no Mato Grosso do Sul, Paraguai e Bolívia. A árvore recuperada com o rpl32-trnL não apresentou a mesma resolução que as demais (ITS e concatenadas), possivelmente devido a maior conservação das sequências plastidiais e sua herança exclusivamente materna (Petit & Excoffier, 2009).

As relações dentro dos clados quando resolvidas, não recuperaram grupos formados por indivíduos das mesmas localidades, com exceção das localidades no clado 2 que foram recuperadas. A árvore de coalescência apresentou resoluções com maiores suportes nas relações internas nos clados devido ao seu desempenho mais robusto que os métodos de concatenação, por isso são sugeridas em casos de árvores gênicas conflitantes ou linhagens incompletas (Edwards *et al.*, 2016; Prata, 2017). Podemos afirmar com esses resultados que as amostras representativas de diferentes localidades formam grupos heterogêneos para os clados 1 e 3, indicando fluxo gênico entre as localidades das mesmas regiões. O oposto podemos afirmar do clado 2, que formou grupos homogêneos, indicando pouco fluxo gênico entre as localidades amostradas, que pode ser resultado de uma distribuição em manchas disjuntas de Floresta Estacional dentro do Cerrado do Centro-Oeste e Minas Gerais.

O monofiletismo encontrado para os três clados, com alto suporte nas diferentes análises filogenéticas, para muitos evolucionistas, pode indicar um processo completo especiação, uma vez que as linhagens estão isoladas de forma reprodutiva por algum mecanismo, impossibilitando ou diminuindo o fluxo gênico, e dessa forma facilita a manutenção das diferentes espécies (De Queiroz, 2007; Pinheiro *et al.*, 2018).

As estatísticas descritivas populacionais realizadas com os marcadores microssatélites indicam a presença de diversidade genética nas populações de todas as áreas devido os valores

maiores encontrados para H_o com relação a H_e , alto número de alelos privados encontrados, indicação de sistema reprodutivo misto e ausência de endogamia para as populações do sudoeste do Brasil. A AMOVA também indica a alta variabilidade genética dentro das populações. Esses resultados são esperados para plantas perenes (Hamrick *et al.*, 1991; Rodrigues, 2015) como as do complexo *A. pyrifolium* e por possuírem também ciclo de vida longo, distribuição geográfica ampla e possível reprodução cruzada.

Quanto as análises de estrutura de populações, todas corroboram a filogenia. As cinco populações amostradas formam dois grupos genéticos estruturados, com diferentes pools gênicos e indicativos de ausência de fluxo genético entre os grupos. Um grupo na região Nordeste formado pelas populações AU, CR e CA, e o outro no estado do Mato Grosso do Sul, com PM e CO. A explicação para esses resultados está nos mecanismos evolutivos, deriva genética, seleção natural e mutação, que levam a diferenciação populações isoladas (Gentry & Dodson, 1987; Rodrigues, 2015). Esses mesmos grupos são os subclados da filogenia, clado 1 da região Nordeste, e clado 3 na região do Mato Grosso do Sul. Entretanto devido à ausência de amostragem na região do Centro-Oeste, não podemos afirmar a formação do clado 2 nas análises populacionais e também devemos indicar que os resultados de estruturação podem estar influenciados pela falta dessas amostras.

Essa estreita relação dos clados com áreas geográficas específicas reforça o quanto a distribuição é importante para o reconhecimento das espécies, que quase sempre apresentam variação. A informação geográfica é essencial para a distinção das linhagens já que possui uma forte associação no isolamento por distância, logo forte influência no processo de especiação (De Queiroz, 2007).

Análises Morfométricas

A morfometria testada com os três grupos de indivíduos recuperados na filogenia não corroborou os resultados dos estudos genéticos. As análises mostram grande sobreposição das características morfológicas quantitativas, apesar da grande variação linear encontrada. Observa-se uma tendência das estruturas apresentarem maiores proporções no clado 2. Apesar da morfometria não ter sido um critério discriminante de espécies dentro do complexo avaliado, o método é descrito como uma ferramenta eficiente para diferenciar grupos intraespecíficos

(Kaplan & Marhold 2012) e encontrar os limites de forma mais objetiva (Simo-Droissart *et al.*, 2016; Souza, Funch & De Queiroz, 2014).

Esse resultado caracteriza o complexo *A. pyrifolium* como espécies crípticas, definidas como duas ou mais espécies que são classificadas com um único nome devido a morfologia indistinguível ou com pouca diferença (Bickford *et al.*, 2006; Vigalondo *et al.*, 2015). Portanto, o critério morfológico não tem valor para suportar os limites entre essas espécies (Yang & Ranala, 2010). Com o avanço das técnicas moleculares, as espécies crípticas frequentemente têm sido descobertas com dados de sequências de DNA (posteriormente corroboradas com outros critérios) incorporando obrigatoriamente as análises genéticas nas pesquisas taxonômicas (Bickford *et al.*, 2006).

Análises de Nicho Ecológico

Os modelos de nicho ecológico estimados para os indivíduos dos clados 1, 2 e 3 indicam padrões relacionados às áreas geográficas já destacadas nas análises filogenéticas e de coalescência, ou seja, os modelos recuperaram nichos climáticos bem similares às áreas de distribuição conhecida para os grupos de indivíduos de cada clado. Esse resultado reforça a utilidade da modelagem de nicho para ampliar a compreensão sobre as especificidades ecológicas de diferentes linhagens para a delimitação de espécies (Florio, 2016; Carstens *et al.*, 2013). Reafirmamos esse resultado com os testes que avaliaram a sobreposição dos nichos entre os indivíduos dos três clados, que apresentaram valores baixos, indicando pouco conservação de nicho entre as possíveis espécies irmãs do complexo *A. pyrifolium*.

É muito provável que o tipo de especiação que ocorreu no complexo de estudo foi a alopátrica. Modo comum de especiação que inicia com o surgimento de barreiras naturais ou limitações físicas que dividem a distribuição geográfica de uma espécie, e consequentemente resulta em isolamento geográfico, que frequentemente cessa ou diminui o fluxo gênico (Yousefkhani *et al.*, 2016). Esse isolamento quando ocorre em condições ambientais minimamente distintas reforçam o processo de especiação, evidenciando o importante papel da divergência de nicho na diversificação das linhagens (Prata, 2017), como podemos supor que ocorreu no grupo estudado.

Diante dos resultados obtidos sugerimos a reavaliação da circunscrição taxonômica de *Aspidosperma pyrifolium*, elevando ao nível de espécies os clados monofiléticos suportados por nichos ecológicos, áreas de distribuição geográfica e vegetações relacionadas distintas. Isso porque é evidente que ocorreu um processo de divergência, dado o número de diferenças adquiridas entre as linhagens, tornando a delimitação do complexo mais robusto devido as diferentes provas de separação. Contudo, espécies precisam apenas estar evoluindo separadamente de outras linhagens, assim uma única evidência que comprove esse isolamento, já é suficiente para sua existência, afirmando que as linhagens podem carecer de um ou mais critérios usados para delimitar, pois a ausência não significa evidência contra a divergência (De Queiroz, 2007).

Os clados possuem nomes válidos que estão sinonimizados em *Aspidosperma pyrifolium*. Assim, o clado 1 seria *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. strito senso, clado 2 *Aspidosperma martii* Silva Manso descrita para Mato Grosso e o Clado 3 *Aspidosperma guaraniticum* Malme descrita para Paraguai.

Considerações Finais

Nossos resultados recuperaram o complexo *Aspidosperma pyrifolium* como um grupo monofilético. E dos critérios operacionais selecionados para realizar a delimitação de suas espécies, somente a morfologia apresentou resultado divergente dos demais. Apesar disso, esses resultados corroboram nossa hipótese inicial de que existem linhagens evolutivas significativas no complexo. Houve a formação de três grupos monofiléticos com nichos divergentes em áreas de distribuição geográficas e vegetações específicas, o que indica e suporta futura separação taxonômica desses clados. A grande sobreposição morfológica confirma a ancestralidade comum do complexo, não permitindo a delimitação dos clados por meio dos caracteres utilizados nas análises morfométricas. Assim, são necessários estudos adicionais para verificar se existem outros caracteres morfológicos que podem ser utilizadas para reconhecer esses clados.

Algumas ressalvas devem ser consideradas diante desse resultado. Reconhecemos para as análises morfométricas um grande número de dados faltantes e uma baixa amostragem para

o clado 3 que pode ter influenciado nas análises. Assim como, a não amostragem de populações naturais do clado 2 que impediu testes de estruturação para esse grupo, não permitiu a afirmação dessa linhagem nas análises populacionais.

O estudo revela a importância da investigação intraespecífica em grupos taxonomicamente complexos, principalmente para o melhor entendimento dos processos evolutivos e conservação da biodiversidade existente. Possibilitando com os resultados, novas indagações sobre a evolução dessas espécies irmãs, como: Quando ocorreu a separação das linhagens? Quais eventos ou processos são responsáveis por formar essas linhagens? Qual linhagem é mais ancestral? Onde surgiu essas linhagens? Qual é a história de ocupação geográfica dessas espécies? Quais as relações com as demais espécies do gênero morfologicamente próximas?

Referências Bibliográficas

- Andrade, A.F.A. and Velazco, S.J.E. (2018) ENM TheMetaLand. Available at: https://github.com/andrefaa/ENM_TheMetaland
- André, T. *et al.* (2015) Evolution of species diversity in the genus *Chamaecostus* (Costaceae): molecular phylogenetics and morphometric approaches. *Phytotaxa*, 204:265–276.
- Blattner, F.R. and Dunn, I.S. (1987) Charons 36 to 40: multi enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Res*, 15:2677–2698.
- Bickford, D. *et al.* (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22: 148–155.
- Bouckaert, R. *et al.* (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput Biol*, 10(4), e1003537.
- Broennimann, O. *et al.* (2012) Measuring ecological niche overlap from occurrence and spatial environmental data. *Global Ecology and Biogeography*, 21, 481–497.
- Cadena, C.D. and Cuervo, A.M. (2010) Molecules, ecology, morphology, and songs in concert: How many species is *Arremon torquatus* (Aves: Emberizidae). *Biol J Linn Soc*, 99:152–176.
- Carstens, B.C. *et al.* (2013) How to fail at species delimitation. *Mol Ecol*, 22:4369–4383.
- 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.
- De Candolle, A.L.P.P. (1844) Apocynaceae. Prodomus Syst Nat regni Veg, 317–489.
- De Queiroz, K. (2007) Species concepts and species delimitation. Syst Biol, 56:879–886.
- Doyle, J. (1991) DNA Protocols for Plants. In: Hewitt. G.M.; Johnston, A.W.B.; Young, J.P.W. (eds) Molecular Techniques in Taxonomy. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), vol 57.
- Duarte, A.P. (1970) Contribuição para uma revisão do gênero *Aspidosperma*. An Acad Bras Cienc 42:289–327.
- Edwards, S.V. *et al.* (2016) Implementing and testing the multispecies coalescent model: A valuable paradigm for phylogenomics. Molecular Phylogenetics and Evolution, 94:447–462.
- Excoffier, L.; Foll, M.; Petit, R.J. (2009) Genetic Consequences of Range Expansions. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., 40:481–501.
- Florio, A.M. (2016) Detecting cryptic speciation in the widespread and morphologically conservative carpet chameleon (*Furcifer lateralis*) of Madagascar. Journal of Evolutionary Biology, 25(7): 1399-1414.
- Gentry, A.H. and Dodson, C.H. (1987) Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. Annals of the Missouri Botanical Garden, Washington, 74: 205-233.
- Hamrick, J.L. *et al.* (1991) Correlations between species and allozyme diversity: in implications for conservation biology. In: Falk DA and Holsinger KE (Eds.) genetic and conservation of rare plants. New York: Oxford University Press, p.75-86.
- Hosseini Yousefkhani, S.S.; Rastegar-Pouyani, E. and Aliabadian, M. (2016) Ecological niche differentiation and taxonomic distinction between *Eremias strauchi* and *Eremias strauchi kopetdaghica* (Squamata: Lacertidae) on the Iranian Plateau based on ecological niche modeling, Italian Journal of Zoology, 83:3, 408-416.
- Huelsenbeck, J. and Rannala, B. (2004) Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. Syst Biol, 53(6):904-13.
- Jombart, T. and Ahmed, I. (2011) adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. Bioinformatics, 27(21):3070-1.
- Jombart, T.; Devillard, S. and Balloux, F. (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. BMC

- Genet, 11:94.
- Jørgensen, P.M.; Nee, M.H. and Beck, S.G. (2014) Cat. Pl. Vasc. Bolivia. Bot. Missouri Bot. Gard.
- Kamvar, Z.N.; Brooks, J.C. and Grünwald, N.J. (2015) Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Front Genet*, 6:208.
- Kaplan, Z. and Marhold, K. (2012) Multivariate morphometric analysis of the *Potamogeton compressus* group (Potamogetonaceae). *Bot J Linn Soc*, 170:112–130.
- Katoh, K. and Standley, D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*, 30(4) 772-780.
- Kearse, M. *et al.* (2012) Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649.
- Keenan, K. *et al.* (2013) diveRsity: An R package for the estimation of population genetics parameters and their associated errors. *Methods Ecol Evol*, 4(8):782-788.
- Killeen, T.J.; García, E. and Beck, S.G. (1993) Guía Árb. Bolivia. Herbario Nacional de Bolivia & Missouri Botanical Garden, La Paz.
- Knowles, L.L. and Carstens, B.C. (2007) Delimiting species without monophyletic sene trees. *Syst Biol* 56:887–895.
- Kress, W.J.; Prince, L.M. and Williams, K.J. (2002) The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. *American Journal of Botany*, 89: 1682–1696.
- Lanfear, R. *et al.* (2016) PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol Biol Evol.*, 34:772–773.
- Leaché, A.D. *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.
- Machate, D. J.; Alves, F. M.; Farinaccio, M. A. (2016) *Aspidosperma* (Apocynaceae) no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rodriguésia*, 67(4):1011-1024.
- Marcondes-Ferreira, W. (1988) *Aspidosperma* Mar., nom. cons. (Apocynaceae): estudos taxonômicos. Tese (doutorado) Universidade Estadual de Campinas, SP-Campinas.
- Marcondes-Ferreira, W. and Kinoshita, L. (1996) Uma nova divisão infragenérica para

- Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae). *Rev Bras Botânica*, 19:203–204.
- Marhold, K. (2011) Multivariate morphometrics and its application to monography at specific and infraspecific levels. *Monogr plant Syst Fundam Assess plant Biodivers*, 73–99.
- Mayden, R.L. (1997) A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In: Claridge, M.F. and HAD, M.R.W. (ed) *Species: The units of diversity*. Chapman and Hall, London, pp 381–423.
- Mayr, E. (2010) What is a Species, and What is Not Philosophy? *Dialogue on Science, Ethics, and Religion*, 1–7.
- Michalakis, Y. and Excoffier, L. (1996) A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, 142:1061–1064.
- Miers, J. *et al.* (1878) *The Apocynaceae of South America*. Williams and Norgate, London, 291.
- Miller, M.A.; Pfeiffer, W. and Schwartz, T. (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Disponível em: <http://www.phylo.org/sub_sections/portal/sc2010_paper.pdf>.
- Mirarab, S. and Warnow, T. (2015) “ASTRAL-II: Coalescent-Based Species Tree Estimation with Many Hundreds of Taxa and Thousands of Genes.” *Bioinformatics (ISMB special issue)*, 31 (12) i44–i52.
- Müller-Argovensis, J. (1860) *Apocynaceae*. In: Martius CFP (ed) *Flora brasiliensis enumeratio plantarum in Brasilia hactenus delectarum ques suis aliorumque botanicorum studiis descriptas et methodo naturae digestas partim icone illustratas*, 6th edn. p.1–195.
- Muellner, N.A. *et al.* (2008) The origin and evolution of Indomalayan, Australasian and Pacific island biotas: insights from Aglaieae (Meliaceae, Sapindales). *Journal of Biogeography*, 35(10):1769-1789.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89:583–590.
- Oksanen, J. *et al.* (2018) *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-3. Disponível: <<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>>.
- Olson, D.M. *et al.* (2001) Terrestrial ecoregions of the world: a new map of life on Earth. *Bioscience*, 51(11):933-938.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. (2012) *GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic*

- software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28:2537–2539.
- Peterson, A.T. *et al.* (2011) *Ecological Niches and Geographic Distributions*. Princeton University Press, Princeton.
- Pichon, M. (1947) Classification des Apocynacées: VII, genre *Aspidosperma*. *Bull du Muséum d'Histoire Nat*, 19:362–369.
- Pinheiro, F.; Dantas-Queiroz, M.V. and Palma-Silva, C. (2018) Plant Species Complexes as Models to Understand Speciation and Evolution: A Review of South American Studies. *Critical Reviews in Plant Sciences*.
- Poudel, R.C. *et al.* (2012) Using Morphological, Molecular and Climatic Data to Delimitate Yews along the Hindu Kush-Himalaya and Adjacent Regions. *PLoS One*, 7(10):e46873.
- Pritchard, J.K.; Stephens, M. and Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945–959.
- Vencovsky, R. (1994) Variance of an estimate of the outcrossing rate. *Rev Bras Genética*, 17:349–351.
- Reflora (2018) *Herbário Virtual Reflora*. In: *Jard. Botânico do Rio Janeiro*. disponível: <<http://www.herbariovirtualreflora.jbrj.gov.br/>>. Accessed 20 Aug 2012
- Ronquist, F. *et al.* (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3):539–542.
- Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9):1312–1313.
- Schoener, T.W. (1968) The *Anolis* lizards of Bimini: resource partitioning in a complex fauna. *Ecology*, 49:704–726.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4):406–25.
- Schumann, K. (1895) Apocynaceae. In: Engler, A. and Prantl, K. (eds) *Die natürlichen pflanzenfamilien*. W. Engelmann, Leipzig, pp 109–189.
- Shaw, J. *et al.* (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The Tortoise and the hare III. *Am J Bot* 94:275–288.
- Shilin, Z. *et al.* (2015) heatmap3: An Improved Heatmap Package. disponível: <<https://CRAN.R-project.org/package=heatmap3>>.
- Simo-Droissart, M. *et al.* (2016) Morphometrics and molecular phylogenetics of *Angraecum*

- section *Dolabrifolia* (Orchidaceae, Angraecinae). *Plant Syst Evol*, 302:1027–1045.
- Simões, A.O. *et al.* (2016) Systematics and character evolution of *Vinceae* (Apocynaceae). *Taxon*, 65:99–122.
- Simões, A.O. *et al.* (2007) Phylogeny and Systematics of the *Rauvolfioideae* (Apocynaceae) Based on Molecular and Morphological Evidence. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 94(2):268–297.
- Sites, J.W. and Marshall, J.C. (2003) Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol Evol*, 18:462–470.
- Souza, I.; Funch, L. and De Queiroz, L.P. (2014) Morphological analyses suggest a new taxonomic circumscription for *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *PhytoKeys*, 38:101–118.
- SpeciesLink (2018) Sistema de informação distribuído para coleções biológicas: a integração do Species Analyst e do SinBiota (FAPESP). In: Cent. Ref. em Informação Ambient. (CRIA). Disponível: <<http://splink.cria.org.br/>>
- R Core Team (2018) R: A Language and Environmental for Statistical Comput. Disponível: <<https://www.r-project.org/>>.
- Tel-Zur, N. *et al.* (1999) Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of genera *Hylocereus* and *Slenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology Reporter*, 17:249-254.
- Tocchio, L.J. *et al.* (2015) Niche similarities among white-eared opossums (mammalia, didelphidae): Is ecological niche modelling relevant to setting species limits? *Zool Scr*, 44:1–10.
- Van Buuren, S. and Groothuis-Oudshoorn, K. (2011) mice: Multivariate Imputation by Chained Equations in R. *Journal of Statistical Software*, 45(3):1-67.
- Velazco, S.J.E. *et al.* (2017) Using worldwide edaphic data to model plant species niches: An assessment at a continental extent. *Plos One*, oct (19).
- 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.

- Warren, D.L.; Glor, R.E. and Turelli, M. (2010) ENMTools: a toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography*, 33:607-611.
- Wiens, J.J. and Donoghue, M.J. (2004) Historical biogeography, ecology and species richness. *Trends Ecol Evol*, 19:639–644.
- Woodson, R.E. (1951) *Aspidosperma*. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 38:119–206.
- Yang, and Rannala, B. (2010) Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20):9264–9269.

Apêndices

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

Espécie	Amostra	Voucher	Município	Estado
Aspidosperma araracanga	Asp_arar	Pereira 98	-	-
Aspidosperma australe	Asp_aust_AC69	Castello <i>et al.</i> 69	Campinas	SP
Aspidosperma brasiliense	Asp_bras_AP45	Pereira & Scudeler 103	Goiânia	GO
Aspidosperma camporum	Asp_camp_AC103	VIC 10927	Itu	SP
Aspidosperma carapanauba	Asp_cara_AP23	MG Silva & Rosário 4847	-	MT
Aspidosperma centrale	Asp_cent_AP89	Pereira <i>et al.</i> 119	Manaus	AM
Aspidosperma album	Asp_cf_albu_AP70	MG Boom <i>et al.</i> 8105	-	Guiana
Aspidosperma camporum	Asp_comp_AP133	Scudeler <i>et al.</i> 267	Sooretama	ES
Aspidosperma cruentum	Asp_crue_AP76	IAN Yentle 2800	Stann Creek District	Belize
Aspidosperma cylindrocarpon	Asp_cyli_AP119	Oliveira 636	Licínio de Almeida	BA
Aspidosperma darienense	Asp_dari_AP75	MG Silva 5273	Almeirim	PA
Aspidosperma obscurinervium	Asp_obsc_AP85	Pereira <i>et al.</i> 129	Manaus	AM
Aspidosperma discolor	Asp_disc_AP281	Lombardi <i>et al.</i> 9406	Palmeiras	BA
Aspidosperma duckei	Asp_duck_AP41	Larocca 3	Alta Floresta	MT
Aspidosperma eteanum	Asp_etea_AP214	Trindade s.n.	Melgaço	PA
Aspidosperma excelsum	Asp_exce_AP183	UEC Mattos 28	Coari	AM
Aspidosperma formosanum	Asp_form_H66	-	Formosa	GO
Aspidosperma illustre	Asp_illu_AP277	Schindler & Costa IFN-AL3F-1-7-40	Joaquim Gomes	AL
Aspidosperma inundatum	Asp_inun_AP219	MG Oliveira 6530	Macapá	AP
Aspidosperma limae	Asp_lima_AP272	ESA Machado 498	Coruripe	AL

Aspidosperma macrocarpon	Asp_macr_AP114	Castello s.n.	Brasília	DF
Aspidosperma marcgravianum	Asp_marc	Pereira & Barbosa 97	Belém	PA
Aspidosperma megalocarpon	Asp_mega_H99	MBM 246050	-	México
Aspidosperma melanocalyx	Asp_mela_AP132	Scudeler <i>et al.</i> 264	Sooretama	ES
Aspidosperma multiflorum	Asp_mult_AP110	Castello 214	Piripiri	PI
Aspidosperma myristicifolium	Asp_myri_AP278	UEC Daly 13243	Sena Madureira	AC
Aspidosperma neblinae	Asp_nebl_AP77	IAN Maguire 42125	Amazonas	Venezuela
Aspidosperma nobile	Asp_nobi_AP173	Scudeler <i>et al.</i> 507	Chapadão do Céu	GO
Aspidosperma oblongum	Asp_oblo_AP72	Pereira <i>et al.</i> 96	Melgaço	PA
Aspidosperma occidentale	Asp_occi_AP178	Scudeler <i>et al.</i> 525	Corumbá	MS
Aspidosperma oliganthum	Asp_olig_AP118	Oliveira 629	Licínio de Almeida	BA
Aspidosperma olivaceum	Asp_oliv_AC6	Castello <i>et al.</i> 75	Campinas	SP
Aspidosperma parvifolium	Asp_parv_AP197	ESA Lopes 911	Caratinga	MG
Aspidosperma polyneuron	Asp_poly_AC18	Kataoka 162	-	-
Aspidosperma pyricollum	Asp_pyrc_AP112	Scudeler <i>et al.</i> 245	Regência	ES
Aspidosperma pyrifolium H88	Asp_pyrif_H88	MBM 170490	-	Argentina
Aspidosperma pyrifolium PAM01	Asp_pyrif_PAM01	Messias s.n.	Aiuaba	CE
Aspidosperma pyrifolium PAM08	Asp_pyrif_PAM08	Messias s.n.	Aiuaba	CE
Aspidosperma pyrifolium PAM100	Asp_pyrif_PAM100	Messias s.n.	Porto Murtinho	MS
Aspidosperma pyrifolium PAM116	Asp_pyrif_PAM116	Messias s.n.	Porto Murtinho	MS
Aspidosperma pyrifolium PAM118	Asp_pyrif_PAM118	UEC 167221	Santa Cruz	Bolívia
Aspidosperma pyrifolium PAM119	Asp_pyrif_PAM119	UEC 133103	Santa Cruz	Bolívia
Aspidosperma pyrifolium PAM 121	Asp_pyrif_PAM121	MBM 099566	Fuorte Olimpo	Paraguai
Aspidosperma pyrifolium PAM123	Asp_pyrif_PAM123	MBM 278055	-	Paraguai
Aspidosperma pyrifolium PAM124	Asp_pyrif_PAM124	Messias s.n.	Cabrobó	PE
Aspidosperma pyrifolium PAM139	Asp_pyrif_PAM139	Messias s.n.	Cabrobó	PE

Aspidosperma pyrifolium PAM140	Asp_pyrif_PAM140	Messias s.n.	Cabrobó	PE
Aspidosperma pyrifolium PAM142	Asp_pyrif_PAM142	Messias s.n.	Cabrobó	PE
Aspidosperma pyrifolium PAM143	Asp_pyrif_PAM143	Messias s.n.	Cabrobó	PE
Aspidosperma pyrifolium PAM151	Asp_pyrif_PAM151	UEC 169249	São Domingos	GO
Aspidosperma pyrifolium PAM156	Asp_pyrif_PAM156	UEC 155532	Posse	GO
Aspidosperma pyrifolium PAM157	Asp_pyrif_PAM157	UEC 99885	Posse	GO
Aspidosperma pyrifolium PAM178	Asp_pyrif_PAM178	UEC 174797	Januária	MG
Aspidosperma pyrifolium PAM179	Asp_pyrif_PAM179	UEC 101586	Januária	MG
Aspidosperma pyrifolium PAM18	Asp_pyrif_PAM18	Messias s.n.	Aiuaba	CE
Aspidosperma pyrifolium PAM181	Asp_pyrif_PAM181	UEC 60418	Campos Belos	TO
Aspidosperma pyrifolium PAM182	Asp_pyrif_PAM182	Messias s.n.	Ipiranga	PI
Aspidosperma pyrifolium PAM183	Asp_pyrif_PAM183	Messias s.n.	Campo Maior	PI
Aspidosperma pyrifolium PAM234	Asp_pyrif_PAM234	UEC 152732	Jurucutu	RN
Aspidosperma pyrifolium PAM27	Asp_pyrif_PAM27	Messias s.n.	Aiuaba	CE
Aspidosperma pyrifolium PAM35	Asp_pyrif_PAM35	Messias s.n.	Crateús	CE
Aspidosperma pyrifolium PAM48	Asp_pyrif_PAM48	Messias s.n.	Crateús	CE
Aspidosperma pyrifolium PAM52	Asp_pyrif_PAM52	Messias s.n.	Crateús	CE
Aspidosperma pyrifolium PAM62	Asp_pyrif_PAM62	Messias s.n.	Corumbá	MS
Aspidosperma pyrifolium PAM 71	Asp_pyrif_PAM71	Messias s.n.	Corumbá	MS
Aspidosperma pyrifolium PAM72	Asp_pyrif_PAM72	Messias s.n.	Corumbá	MS
Aspidosperma pyrifolium PAM77	Asp_pyrif_PAM77	Messias s.n.	Corumbá	MS
Aspidosperma pyrifolium PAM92	Asp_pyrif_PAM92	Messias s.n.	Porto Murtinho	MS
Aspidosperma pyrifolium PAM175	Asp_queb_AP175	Scudeler <i>et al.</i> 527	Porto Murtinho	MS
Aspidosperma quirandy	Asp_quir_AP176	Scudeler <i>et al.</i> 526	Porto Murtinho	MS
Aspidosperma sp.	Asp_rami_AP177	Castello <i>et al.</i> 245	Jundiá	SP
Aspidosperma ramiflorum	Asp_rami_AP275	s.col.	São Carlos	SP

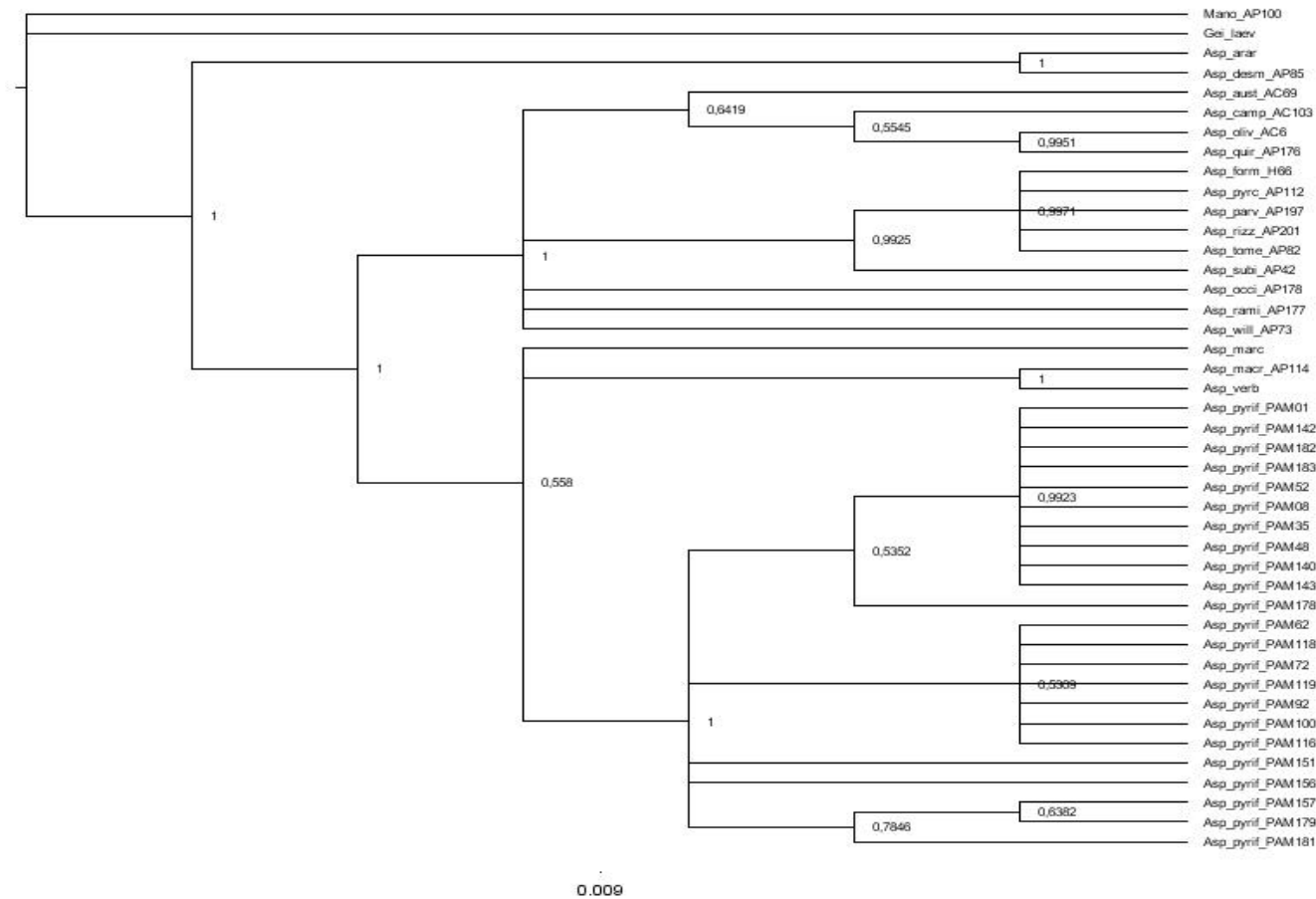
Aspidosperma riedelii	Asp_ried_AC21	Castello <i>et al.</i> 168	Botucatu	SP
Aspidosperma rigidum	Asp_rigi_AP250	UEC Ticona 24	La Paz	Bolívia
Aspidosperma rizzoanum	Asp_rizz_AP201	UB Pinto & Lenza 345	Alto Paraíso de Goiás	GO
Aspidosperma sandwithianum	Asp_sand_AP210	Pereira & Barbosa 101	Belém	PA
Aspidosperma schultesii	Asp_schu_AP211	Pereira <i>et al.</i> 117	Manaus	AM
Aspidosperma spruceanum	Asp_spru_AP251	UEC Amaral 2604	Santa Isabel do Rio Negro	AM
Aspidosperma steinbachii	Asp_stei_AP44	Ribeiro 238	Nova Bandeirantes	MT
Aspidosperma subincanum	Asp_subi_AP42	Pereira & Scudeler 112	Mossâmedes	GO
Aspidosperma tambopatense	Asp_tamb_H80	RB Daly 13179	Sena Madureira	Acre
Aspidosperma thomasii	Asp_thom_AP21	Simões s.n.	-	BA
Aspidosperma tomentosum	Asp_tome_AP82	Pereira & Scudeler 113	Mossâmedes	GO
Aspidosperma tritenartum	Asp_trit_AP187	UEC Machate 107	Porto Murtinho	MS
Aspidosperma Vargasii	Asp_varg_H106	UEC NEE 48714	Santa Cruz	Bolívia
Aspidosperma verbascifolium	Asp_verb	Pereira & Scudeler 111	Mossâmedes	GO
Aspidosperma williamii	Asp_will_AP73	INPA Sothers 1057	Manaus	Amazonas
Geissospermum argenteum	Gei_arge_AP92	Pereira <i>et al.</i> 122	Manaus	AM
Geissospermum laeve	Gei_laev	Scudeler <i>et al.</i> 265	Sooretama	ES
Microplumeria anomala	Mic_anom_AP100	UEC D'Apolito-Jr. 7	Manaus	AM

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

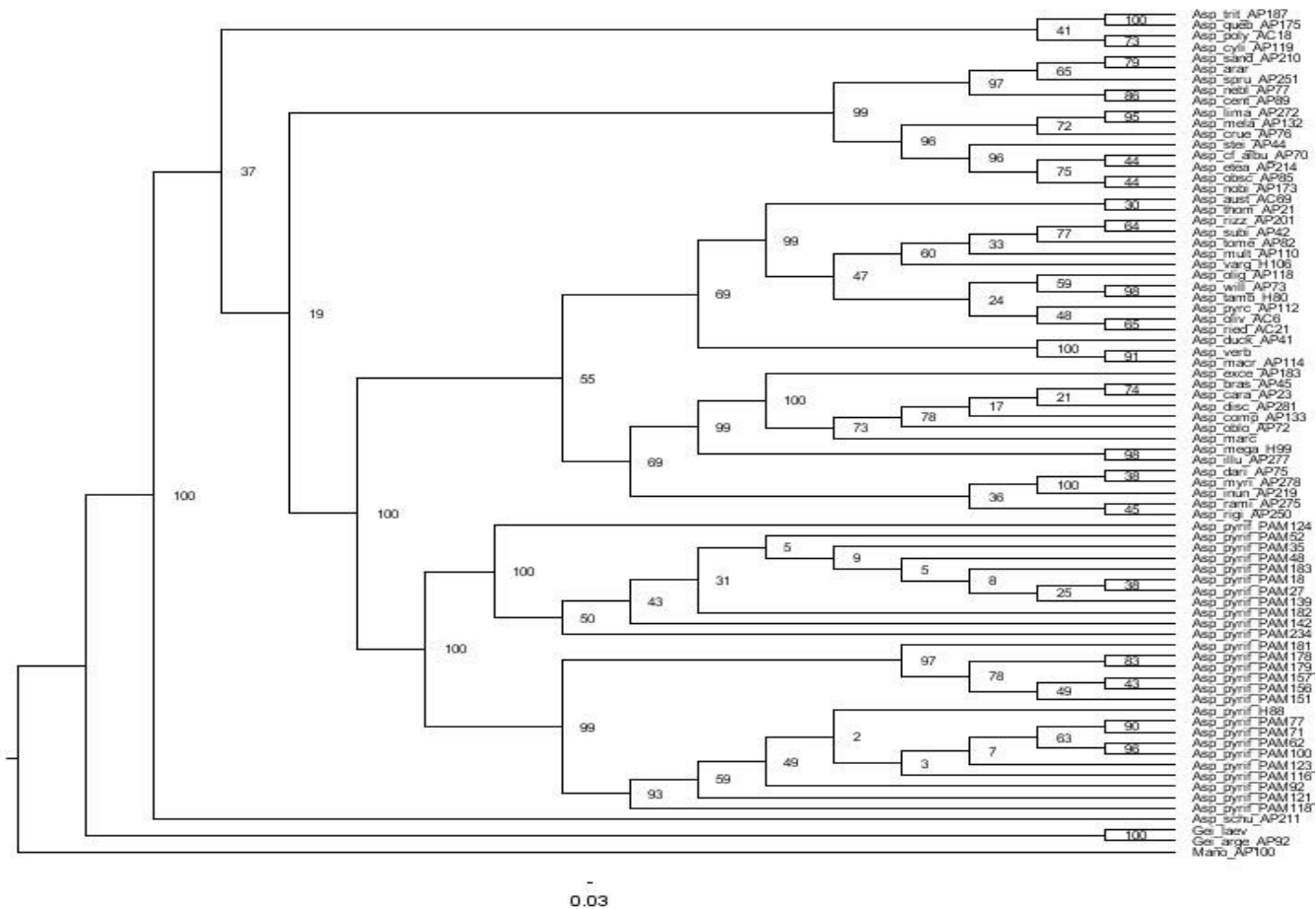
Indivíduo	clados	Voucher	Estado	Município	long	lat
2	clado1	UEC 88077	PE	Inajá	-38.570833	-8.6
3	clado1	UEC 164738	BA	Correntina	-44.6367	-13.3433
4	clado1	UEC 150124	BA	Morro do Chapéu	-41.432778	-11.012778
5	clado1	UEC 92927	PE	Buíque	-37.166667	-8.616667
6	clado1	UEC 11929	PE	Petrolina	-40.5008	-9.39861
7	clado1	UEC 118707	BA	Dom Basílio	-41.75	-13.783333
8	clado1	UEC 152732	RN	Jucurutu	-37.0203	-6.03389
21	clado1	UEC 163698	BA	Canudos	-39.15	-10.016667
24	clado1	UEC 123478	PI	São José do Piauí	-41.4753	-6.87167
25	clado1	UEC 118704	BA	Jeremoabo	-38.4725	-10.068611
26	clado1	UEC 126042	PI	Campo Maior	-42.059611	-4.866667
27	clado1	UEC 123477	PI	Campo Maior	-42.066333	-4.860278
28	clado1	UEC 145203	BA	Itatim	-39.783333	-12.733333
31	clado1	UEC 123474	PI	Campo Maior	-42.1686	-4.82778
33	clado1	UEC 123473	PI	Campo Maior	-42.1667	-4.8167
36	clado1	UEC 123475	PI	Campo Maior	-41.8833	-5.1
42	clado1	UEC 28369	BA		-44.97703	-12.087449
43	clado1	UEC 053346	BA	Formosa do Rio Preto	-45.333333	-11.15
44	clado1	UEC 118709	BA	Valente	-38.95	-11.933333
45	clado1	UEC 118705	BA	Jeremoabo	-39.0825	-9.160278
46	clado1	UEC 118711	BA	Valente	-39.433333	-11.383333
47	clado1	UEC 118710	BA	Cansanção	-39.663611	-10.669722
48	clado1	UEC 147821	BA	Glória	-38.433333	-9.1928722

50	clado1	UEC 126041	PI	Campo Maior	-42.052972	-4.865417
51	clado1	UEC 11928	BA		-39	-11.5
52	clado1	UEC 185952	BA	Jequié	-41.058333	-13.944722
54	clado1	UEC 106753	CE	Aiuaba	-40.133333	-6.616667
55	clado1	UEC 33034	PE	Sertânia	-37.312192	-8.1338278
56	clado1	UEC 92928	PE	Buíque	-37.154167	-8.625
57	clado1	UEC 88068	PE	Inajá	-37.8239	-8.9019
59	clado1	UEC 148042	PI	Luiz Correia	-41.6669	-2.87917
61	clado1	UEC 185953	BA	Caetité	-42.475	-14.0694
62	clado1	UEC 168721	BA	Itatinga	-38.8833	-13.1167
63	clado1	UEC 28368	BA			
64	clado1	UEC 118295	PI	Campo Maior	-42.135513	-4.813247
102	clado1	COR 16362	AL	Piranhas	-37.756667	-9.623889
103	clado1	COR 16298	SE	Poço redondo	-37.684167	-9.805278
104	clado1	COR 16280	SE	Poço Verde	-38.183333	-10.708333
1	clado2	EAC 101586	MG	Januária	-44.3617	-15.4881
9	clado2	UEC 150147	GO	Campinaçu	-48.4	-13.983333
10	clado2	UEC 117685	DF	Sobradinho	-47.858333	-15.538611
11	clado2	UEC 174797	MG	Januária	-44.3983	-15.4444
12	clado2	UEC 121057	GO	São Domingos	-46.675556	-13.688611
13	clado2	UEC 117688	DF	Sobradinho	-47.825833	-15.528889
14	clado2	UEC 117691	DF	Sobradinho	-47.5546	-15.4647
15	clado2	UEC 117686	DF	Sobradinho	-47.9097	-15.5714
16	clado2	UEC 117684	DF	Sobradinho	-47.8878	-15.5458
17	clado2	UEC 169246	GO	São Domingos	-46.75944	-13.60194
18	clado2	UEC 169249	GO	São Domingos	-46.760555	-13.637777
20	clado2	UEC 169248	GO	Guarani de Goiás	-46.697778	13.824444
22	clado2	UEC 99885	GO	Iaciara	-46.5	-14.166667
29	clado2	UEC 150998	GO	Ivolândia	-51.327778	-16.481389

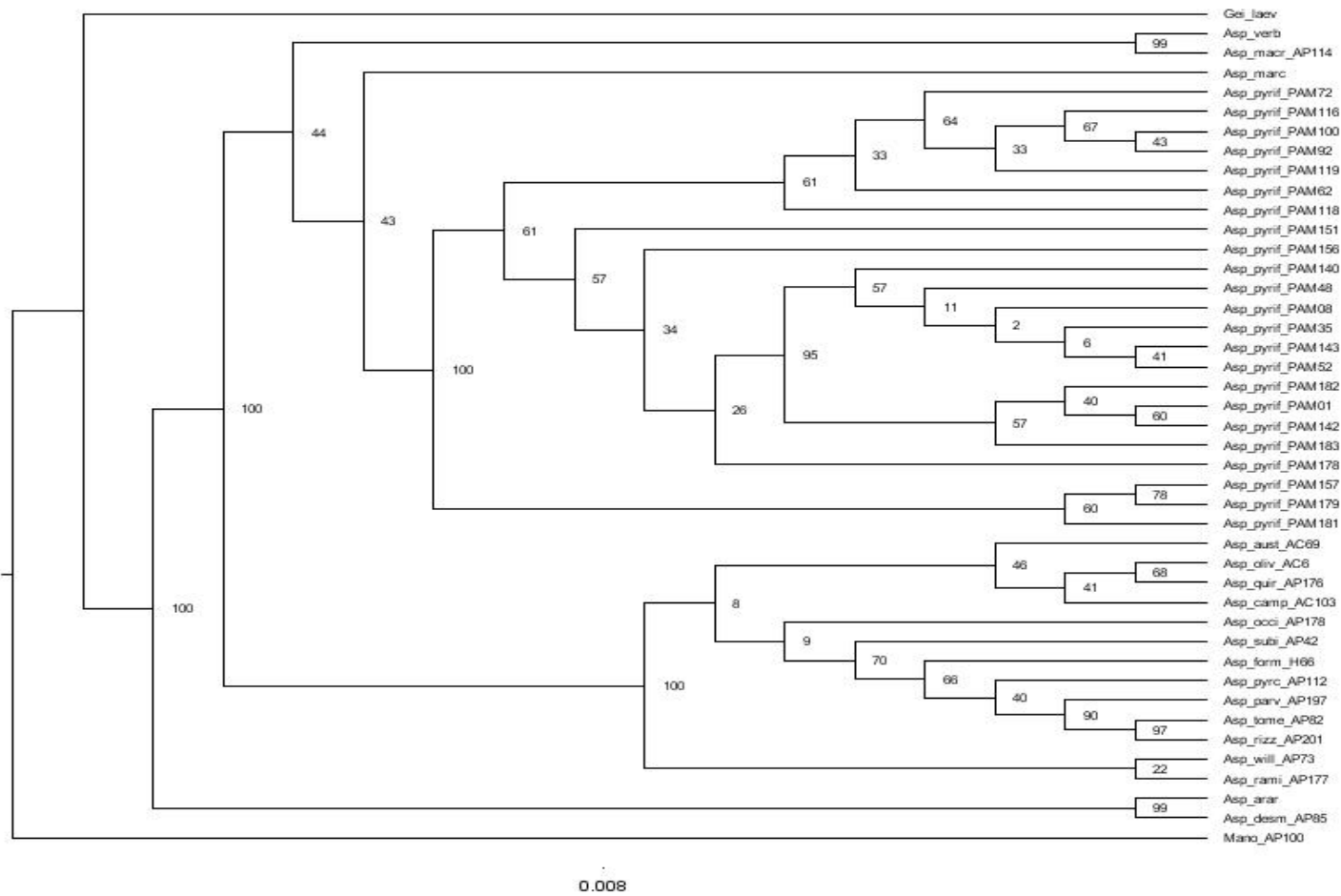
30	clado2	UEC 155532	GO	Posse	-46.498333	-14.130278
32	clado2	UEC 168724	GO	Campinaçu	-48.193056	-13.440278
34	clado2	UEC 105214	DF	Brasília	-47.9294	-15.7797
37	clado2	UEC 33031	MG	Montes Claros	-43.943333	-16.323889
39	clado2	UEC 060418	TO		-46.548056	-12.906389
96	clado2	UEC 6651	DF	Lago do Sul	-47.9297	-15.7797
19	clado3	UEC 133103	Santa Cruz	Prov. Cordileira	-63.439444	-18.923333
23	clado2	UEC 146251	MS	Corumbá	-57.580528	-18.883139
35	clado3	UEC 75572	MS	Corumbá	-57.633333	-20
38	clado3	UEC 33032	MS	Corumbá	-57.633333	-20
97	clado3	COR 15006	MS	Corumbá	-57.625847	-19.076119
99	clado3	COR 2098	MS	Corumbá	-57.6533	-19.0092
100	clado3	COR 9383	MS	Corumbá	-57.345	-18.5259
101	clado3	COR 15598	MS	Ladário	-57.561972	-19.09325
108	clado3	CGMS não incorporado	MS	Bodoquena	-56.688278	-20.549639



Apêndice E. Árvore obtida por Análise de Inferência Bayesiana utilizando o marcador rpl32-trnL. Valores de suporte são probabilidades posteriores.



Apêndice F. Árvore obtida por Análise de Máxima Verossimilhança utilizando o marcador ITS. Valores de suporte são botstrap.



Apêndice G. Árvore obtida por Análise de Máxima Verossimilhança utilizando o marcador rpl32-trnL. Valores de suporte são bootstrap.

CAPÍTULO III - MONOGRAPH OF THE PYRIFOLIA GROUP: *ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM* MART. & ZUCC. (APOCYNACEAE) AND ASSOCIATED SPECIES

Patrícia Aparecida Messias; Ana Carolina Devides Castello; Ingrid Koch

Abstract

In this study we summarize all recent changes in the classification and circumscription of *Aspidosperma pyrifolium* and its related species. The Pyrifolia group (*Aspidosperma*: Apocynaceae) includes *Aspidosperma guaraniticum* and *Aspidosperma martii* that were segregate from *Aspidosperma pyrifolium*, *Aspidosperma refractum* and *Aspidosperma resonans*. We provide a monography of the Pyrifolia group, including an identification key, plates, information about habitat and distribution, phenology, diagnostic characters, and conservation status.

Keywords: Species delimitation, Aspidospermateae, Dry forests, Taxonomy, Species complex

Introduction

Aspidosperma Mart. & Zucc. belongs to the tribe Aspidospermateae Miers (Endress *et al.*, 2014), included in the Rauvolfioide grade of Apocynaceae. The genus is one of the most representative genera of the Apocynaceae (order Gentianales), with more than 70 species (Castello *et al.*, 2019). Its species are distributed in Neotropical region and occur in several forest environments, from Mexico to Argentina (Woodson, 1951). *Aspidosperma* species are easily recognized by having generally alternate leaves, small and light-colored flowers, anthers free of the styled-heads, woody follicles and winged seeds. They are popularly known as *perobas*, *piquiás* and *guatambús*, and some species have medicinal and economic value (Marcondes-Ferreira, 1988; Pereira *et al.*, 2007).

The genus has complex taxonomic delimitation among its species, due to the great overlapping of morphological characteristics, and unpublished synonymy. The phylogeny of *Aspidosperma* (Pereira *et al.* in press) evaluated the monophyly of the subgenus and the nine sections (Marcondes-Ferreira & Kinoshita, 1996). The study

recovered the subgenus and almost all the sections as paraphyletic, and proposed their extinction. *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. were included in the section *Aspidosperma* by Marcondes-Ferreira & Kinoshita (1996), and in the phylogeny of *Aspidosperma* (Pereira *et al.* in press) emerged as a lineage segregate from the remaining species of the section.

Messias *et al.* (Chapter II) studied the delimitation of *Aspidosperma pyrifolium* species and found structured and monophyletic groups related to different ecological niches and geographic distributions. These data support the reestablishment of two species previously treated as synonyms of *A. pyrifolium*, *Aspidosperma martii* Silva Manso and *A. guaraniticum* Malme. In this study we are formalizing the reestablishment of these species and gathering the information for the recognition of all the morphologically associated species, here named as Pyrifolia group. Therefore, the aim of this study is to provide a monography of the new circumscription of *Aspidosperma pyrifolium* and its segregated species (*A. martii* and *A. guaraniticum*), and the associated species *A. resonans* H. J. Will. & Goyder from Bolivia and *A. refractum* Mart. & Zucc. We provide descriptions, identification key and information about habitat, distribution and phenology, besides maps, plates, and information about conservation status.

Materiais e Métodos

We analyzed mainly herbaria specimens [UEC, EAC, HUEG, COR e CGMS, acronyms according with Thiers (constantly updated)], imagens from Re flora-Virtual Herbarium (Re flora 2018) and INCT-Virtual Herbarium of Flora and Fungi (SpeciesLink 2018). The species were identified through the protologues, images of type available in JSTOR Global Plants (2018) and taxonomic literature of the genus (Castello, 2018; De Candolle, 1844; Marcondes-Ferreira, 1988; Müller-Argovensis, 1860; Woodson, 1951).

The vegetative structures, fruits and seeds were measured with the digital pachymeter, the flowers were photographed in stereomicroscopic with scale and measured in ImageJ (Abràmoff *et al.*, 2004). The terminology used follows Woodson (1951), Castello (2018) and Messias (Chapter II of this work). Distribution information, habitat and phenology were obtained on the labels of the analyzed materials.

The distribution maps were made in ArcGis 10.3.1 (ESRI 2015). The descriptions, list of examined material and list of collectors were elaborated using the monographaR package (Reginato 2016) implemented in platform R (R Core Team, 2018). The

conservation status was obtained using the GeoCAT (Bachman et al., 2011) tool that follow the IUCN Red List guidelines (IUCN, 2016), estimating the extent of occurrence (EOO) and area of occupancy (AOO). The coordinates was to obtained from INCT–Virtual Herbarium of Flora and Fungi (SpeciesLink 2018). We used the “geoLoc” tool to get the geographic coordinates from the occurrence points when the localities were not georeferenced. When we do not have information enough from the locality to get the exact occurrence point we had to use the municipality coordinates.

Taxonomic treatment

Aspidosperma Mart. & Zucc., Flora 7(1): 135. 1824. *Nom. Cons.* Type species: *Aspidosperma tomentosum* Mart. & Zucc.

Shrubs or trees. Trunk straight. Branches cylindrical, not suberous, sparsely lenticellate, tomentose to glabrous, brown, black, reddish brown or grey, cataphylls present; latex white. Leaves simple, alternate, congested at the apex of the branches, colleters absent; petioles cylindrical, slightly canaliculate or not on the adaxial surface, not wing, tomentose to glabrous; blades membranaceous or chartaceous, flattened, elliptic, ovate or obovate, apex acute, acuminate or cuspidate, base obtuse, attenuate, rare obtuse, base and margin flattened, concolor, slightly discolorous or discolorous, venation eucamptodromous, without marginal veins, adaxial surface lustrous or dull, olive green or brown, tomentose, pubescent or glabrous, primary vein immersed, slightly prominulus, prominulus or proeminent, secondary veins inconspicuous, immersed, flattened or prominulus, tertiary veins conspicuous or inconspicuous, abaxial surface dull, light green, green, brown, grey or withish, tomentose, pubescent or glabrous, primary vein prominulus or proeminent, secondary veins prominulus, tertiary veins conspicuous or inconspicuous. Inflorescences subterminal or terminal, corymbiform cymes, tomentose, pubescent or glabrescent. Flower buds with corolla lobes twisted, aestivation sinistorse. Flowers with pedicels tomentose or glabrous. Calyx campanulate, green, greenish, yellow or brown, colleters absent; tube tomentose or pubescent externally, tomentose, pubescent, pubescent at the apex, glabrescent or glabrous internally; lobes 5, equal or unequal, triangular, narrowly triangular or filiform, apex acute or cuspidate, tomentose, pubescent or glabrescent externally, glabrous, glabrescent, pubescent or pubescent at the apex internally. Corolla salverform, white; tube wall thickened at the mouth, tomentose, pubescent or glabrous externally, tomentose, pubescent or glabrous internally; lobes 5,

oblong, triangular or filiform, apex acute or rounded, tomentose, glabrescent or glabrous externally, tomentose, tomentose at the mouth, glabrescent or glabrous internally. Stamens 5, included; filaments adnate to the corolla tube; anthers free from each other and from the style-head, positioned above the style-head, ovate, apex acute, base cordate. Carpels 2, ovary superior, hemisyncarpous, ovoid or globoid, glabrous, tomentose or sometimes forming a trichome arch; style-head with or without 2 apical appendages, tomentose, pubescent or glabrescent. Follicles 2 or 1 by abortion, flattened, dolabriform or suborbicular, smooth, stipitate, not mucronate, slightly mucronate or mucronate, midrib conspicuous or inconspicuous, lenticels sparsely or densely lenticellate, yellow, yellow-green or brown, glabrescent or glabrous. Seeds winged, elliptic, ovate, orbicular or suborbicular, yellow, glabrous, seminal nucleus central without radial lines.

Comments: The species of the *Pyrifolia* group has distributions restricted to the Seasonally Dry Tropical Forests, and can be recognized by its orange wood, branches with cataphylls and lenticellate, leaves congested at the apex of the branches, latex white, venation eucamptodromous, flowers with white corolla and lobes larger than the tube, follicles wood and dolabriform shape (excepted for *Aspidosperma martii*), with inconspicuous midrib (except for *A. refractum*).

Key to species of the *Pyrifolia* group

1. Leaves with attenuate base, petioles up to 1.2 cm in length; follicles with conspicuous midrib (see Fig. 1-H).....4. *A. refractum*
- 1'. Leaves with obtuse or rounded base, petioles larger than 1.5 cm in length; follicles with inconspicuous midrib 2
2. Abaxial surface of the leaves with trichomes covering only the blade, never the veins (see Fig. 1-A), petioles slightly canaliculate on the adaxial surface 1. *A. guaraniticum*
- 2'. Abaxial surface of the leaves with trichomes covering the blade and veins (see Fig. 1-B,C), petioles not canaliculate on the adaxial surface 3
3. Follicles suborbicular (see Fig. 2-I); seeds larger than 5 cm in length2. *A. martii*
- 3'. Follicles dolabriform (see Fig. 2-H,N e Fig.3-D,I); seeds up to 4 cm in length 4

4. Leaves with acute apex (see Fig. 2-N); flowers with calyx lobes up to 5 cm in length; follicle densely lenticellate, not mucronate..... 3. *A. pyrifolium*
 4'. Leaves with cuspidate apex (see Fig. 3-B); flowers with calyx lobes larger than 6.5 cm in length; follicle slightly lenticellate, mucronate..... 5. *A. resonans*

1. *Aspidosperma guaraniticum* Malme, Bih. Kongl. Svenska Vetensk.-Akad. Handl., 24(10): 7. 1899. Type: PARAGUAY. Colonia Risso pr. Rio Apa: 28.IX.1893, *Malme 1006* (F [digital image!]) Figure 2. A-H

Tree up to 18 m. Branches tomentose to glabrous, brown to grey, cataphylls present. Leaves with petioles cylindrical, slightly canaliculate on the adaxial surface, 1.9–3 cm long, tomentose to glabrous; blades 2.5–6.1 × 4.3–8.7 cm, blades membranaceous, ovate or obovate, apex acute or acuminate, base obtuse, concolor, adaxial surface dull, olive green, glabrous to tomentose, mostly in the primary vein, primary vein prominulus, secondary veins flattened to prominulus, tertiary veins inconspicuous, abaxial surface dull, light green or grey, tomentose to glabrous, primary vein prominulus, secondary veins prominulus, in 5–10 pairs, tertiary veins inconspicuous. Inflorescences 1.9–5.1 cm long, subterminal or terminal, tomentose to glabrescent. Flowers 21 mm long; pedicels 1.8–5 mm long, tomentose. Calyx 2.1–3.1 mm long, green or yellow; tube ca. 0.2 mm long, tomentose externally, glabrous to glabrescent internally; lobes 5, 2–3 mm long, equal or unequal, triangular to filiform, apex cuspidate, tomentose externally, glabrous to glabrescent internally. Corolla 9.9–23 mm long; tube 4.2–4.8 mm long, wall thickened at the mouth, tomentose externally, tomentose internally; lobes 5, 5.7–18.2 mm, triangular to filiforme, apex acute, glabrescent externally, glabrous internally. Stamens 5, 1.1–4.1 mm long; anthers 0.9–4.1 mm long; Carpels 1.7–3.1 mm long; ovary 0.6–1.1 × 0.6–1.2 mm, ovoid, glabrous; style 1.1–2 mm long; style-head 0.3–0.4 × 0.5–0.6 mm long, main body oblong, without 2 apical appendages, 0.3–0.4 mm long, tomentose. Follicles 2.9–4.0 × 3.4–6.4 cm, dolabriliform, 3.7–15 mm long, slightly mucronate, midrib inconspicuous, sparsely lenticellate, brown, glabrous. Seeds 1.5–3.6 × 1.1–3.8 cm, ovate.

Comments: This species is easily recognized by the leaves with abaxial surface with trichomes covering only the blade, never the veins. *Aspidosperma guaraniticum* can be distinguished of *A. pyrifolium* by the petioles slightly canaliculate on the adaxial surface

(vs. not canaliculate), flowers with calyx lobes with acuminate or filiform apex (vs. acute). And follicles sparsely lenticellated and dark brown (vs. densely lenticellated and yellow). With respect to *Aspidosperma resonans*, it differs by the smaller size of the calyx lobes (2-3 mm vs. 7-10), usually with half the size corolla tube (calyx lobes and corolla tube with the same size in *A. resonans*).

Distribution and Habitat: *Aspidosperma guaraniticum* occurs in Brazil (only in Mato Grosso do Sul), Paraguay and Bolivia. It is distributed throughout dry forests in the Chacos, mostly in altitudes up to 1000m. (Fig. 5).

Phenology: Flowers from September to November and fruits from February to October.

Conservation status: *A. guaraniticum* has an AOO of 104 km² and EOO of 176 thousand km², considered as endangered (EN) and least concern (LC), respectively, according to IUCN (2016) guidelines. The small portion of the Chaco biome located in Brazilian territory (the majority is in Paraguay and Bolivia) is not protected by any Conservation Units, and its original coverage had been destroyed, mainly by extensive cattle raising (Alves, 2014).

Examined specimens: Bolivia. Santa Cruz: Prov. Cordileira, Carvalho, JF 42 (UEC). Brazil. Mato Grosso do Sul: Bodoquena, Pott, A 15796 (CGMS); Corumbá, Árboz, GF 859 (UEC), Bueno, NR 57 (COR), Damasceno Junior, GA 2897 (COR), Nee, M 49081 (UEC), Oliveira, PP 155 (COR), Paschoal 23 (UEC), Takahasi, A 721 (COR).

2. *Aspidosperma martii* Silva Manso ex Mart., Herb. Fl. Bras., 163. 1838. Type: BRAZIL. Mato Grosso: 01.I. 1839, *Martius 485* (Syntype G [digital image!])

Figure 2. I-M

Tree up to 30 m. Branches tomentose to glabrous, brown or reddish brown, cataphylls present. Leaves with petioles cylindrical, not canaliculate on the adaxial surface, 1.5–3.7 cm long, tomentose to glabrescent; blades 3.7–8.1 × 6.0–13.1 cm, blades chartaceous, elliptic, ovate or obovate, apex acute, base obtuse, usually concolor, adaxial surface lustrous, brown, tomentose or glabrous, primary vein prominulus, secondary veins immersed or prominulus, tertiary veins inconspicuous, abaxial surface dull, light green, tomentose, primary vein prominulus, secondary veins prominulus, in 5–12 pairs, tertiary veins inconspicuous. Inflorescences 1.7–4.5 cm long, subterminal or terminal, tomentose.

Flowers 6.3–20.4 mm long; pedicels 1.6–3.2 mm long, tomentose. Calyx 1.6–6.5 mm long, green or yellow; tube ca. 0.2 mm long, tomentose externally, pubescent at the apex internally; lobes 5, 1.6–6.5 mm long, equal or unequal, triangular, apex cuspidate, tomentose externally, pubescent at the apex internally. Corolla 5.4–26.7 mm long; tube 2–6.7 mm long, wall thickened at the mouth, tomentose externally, glabrous or tomentose internally; lobes 5, 3.4–20 mm, triangular, apex acute, tomentose or glabrescent externally, tomentose or glabrescent internally. Stamens 5, 0.8–4.9 mm long; anthers 0.6–1.2 mm long; Carpels 2–6 mm long; ovary 0.7–1.8 × 0.6–2 mm, ovoid, tomentose; style 1.3–4.2 mm long; style-head 0.6–1.7 mm long, main body oblong, with 2 apical appendages, 0.6–1.7 mm long, glabrescent. Follicles 4.1–6.1 × 4.4–6.0 cm, suborbicular, 11.3–25.4 mm long, not mucronate, midrib inconspicuous, sparsely lenticellate, brown, glabrous. Seeds 5.3 × 4.3 cm, orbicular.

Comments: *Aspidosperma martii* differs from *A. pyrifolium* by its larger leaves (3.7–8.1 × 6.0–13.1 vs 1.4–6.7 × 2.4–9.8 cm), and by the follicles suborbicular (vs. dolabriform), and sparsely lenticellate (vs. densely lenticellate in *A. pyrifolium*).

Distribution and Habitat: *Aspidosperma martii* occurs only in Brazil, in Mato Grosso, Goiás, Tocantins and Minas Gerais states. It is distributed throughout seasonal forest patches that occur in the *Cerrado* domain in the Center-West of Brazil and Minas Gerais state (Fig. 5).

Phenology: Flowers from September to November and fruits from March to October.

Conservation status: *A. martii* has an AOO of 104 km² and EOO of 764 thousand km², considered endangered (EN) and least concern (LC), respectively, according to IUCN (2016) guidelines. The environments that the species occurs are fragments of seasonal forest within the *Cerrado*, a biome greatly suppressed by extensive agriculture and cattle raising.

Examined specimens: Brazil. Distrito Federal: Brasília, Cavalcanti, TB 2637 (UEC); Lago do Sul, Pereira, BAS 1715 (UEC); Sobradinho, Gomes, APS 201 (UEC), Gomes, SM 207 (UEC), Gomes, SM 209 (UEC), Gomes, SM 210 (UEC), Gomes, SM 214 (UEC). Goiás: Campinaçu, Pereira, BAS 3607 (UEC), Walter, BMT 2629 (UEC); Guarani de Goiás, Santos, AA 2248 (UEC); Iaciara, Pereira, BAS 2910 (UEC); Ivolândia, Damasceno Junior, GA 2893 (UEC); Posse, Souza Silva, S 351 (UEC); São Domingos, Fonseca, ML

2337 (UEC), Servilha, AC 1860 (UEC), Servilha, AC 1961 (UEC). Minas Gerais: Januária, Lombardi, JA 2076 (EAC), UEC 174797 (UEC); Montes Claros, Nascimento, EA 127 (UEC). Tocantins: Unknown municipality, Farias, E 115 (UEC).

3. *Aspidosperma pyriforme* Mart. & Zucc., Flora 7(1): 136. 1824. Type: BRAZIL.

Piauí: s.d., *Martius* s.n. (Syntype M [digital image!]). Figure 2. M-U

Tree up to 15 m. Branches tomentose to glabrous, brown or black, cataphylls present. Leaves with petioles cylindrical, not canaliculate on the adaxial surface, 0.6–2.5 cm long, tomentose to glabrous; blades 1.4–6.7 × 2.4–9.8 cm, blades chartaceous, elliptic, ovate or obovate, apex acute, base obtuse, discolorous or concolor, adaxial surface lustrous or dull, dark brown or olive green, tomentose to glabrous, primary vein immersed to slightly prominulus, secondary veins flattened to prominulus, tertiary veins inconspicuous, abaxial surface dull, light brown or light green, tomentose to glabrous, primary vein prominulus, secondary veins prominulus to no prominulus, in 5–9 pairs, tertiary veins inconspicuous. Inflorescences 1.3–4.0 cm long, subterminal or terminal, tomentose to glabrescent. Flowers 9.1–24.5 mm long; pedicels 1.1–4.1 mm long, tomentose to glabrous. Calyx 1.1–3 mm long, brown or yellow; tube ca. 0.2 mm long, tomentose externally, tomentose internally; lobes 5, 1–3.1 mm long, equal or unequal, triangular or deltoid, apex cuspidate, tomentose to glabrescent externally, glabrous internally. Corolla 7–5–21.5 mm long; tube 2.5–5.5 mm long, wall thickened at the mouth, tomentose to glabrous externally, tomentose internally; lobes 5, 5.5–16 mm, oblong, filiform or triangular, apex acute, tomentose to glabrous externally, glabrous internally. Stamens 5, 1.2–3.8 mm long; anthers 1.5–4 mm long; Carpels 0.7–2 mm long; ovary 0.5–0.9 × 0.5 mm, ovoid or globoid, glabrous to tomentose, sometimes forming a trichome arch; style 0.2–1.1 mm long; style-head 0.22–0.4 mm long, main body oblong, with 2 apical appendages, 0.2–0.4 mm long, tomentose. Follicles 2.1–5.1 × 3.4–6.2 cm, dolabriform, 7.0–34 mm long, not mucronate, midrib inconspicuous, densely lenticellate, brown or yellow, glabrous. Seeds 2.8–3.5 × 3.3–4.1 cm, ovate or suborbicular.

Comments: *Aspidosperma pyriforme* is easily recognized by its leaves with acute apex, abaxial surface of the leaves when tomentose is throughout blade, petioles not canaliculate, calyx lobes half size of the corolla tube, with acute apex, and follicles dolabriform, not mucronate, densely lenticellated and yellow

Distribution and Habitat: *Aspidosperma pyrifolium* occurs only in the Northeast of Brazil (Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte and Sergipe states). It is widely distributed in the *Caatinga*, in the *depressão nordestina* region, and considered as an indicator species of this type of vegetation (Fig. 5).

Phenology: Flowers from October to January and fruits in May.

Conservation status: *Aspidosperma pyrifolium* has an AOO of 152 km² and EOO of 779 thousand km², considered endangered (EN) and least concern (LC), respectively, according to IUCN (2016) guidelines. The *Caatinga* had mostly of its area deforested due to agriculture and illegal logging, and only a portion of what remained is currently under the protection in protected areas (Brasil, 2018).

Examined specimens: Brazil. Alagoas: Piranhas, COR 16362 (COR). Bahia: Caetité, UEC 185953 (UEC); Cansano, Queiros, LP 1163 (UEC); Canudos, Silva, FHM 517 (UEC); Correntina, Martins, MV 254 (UEC); Dom Basilio, Queiros, LP 3697 (UEC); Formosa do Rio Preto, Nogueira, PE 99 (UEC); Glória, Oliveira, M 2370 (UEC); Itatim, Melo, E 3738 (UEC); Itatinga, Cavalcanti, TB 3189 (UEC); Jequié, Macedo, GEL 1652 (UEC); Jeremoabo, Queiros, LP 4645 (UEC), Queiros, LP 4647 (UEC); Morro do Chapéu, Melo, E 3119 (UEC); Unknown municipality, Duarte, AP 9524 (UEC), Duarte, AP 9549 (UEC), Ratter, TA 2705 (UEC); Valente, Queiros, LP 1121 (UEC), Queiros, LP 3020 (UEC). Ceará: Aiuaba, Andrade, IM 265 (UEC). Pernambuco: Buíque, Andrade, K 85 (UEC), Figueiredo, L 242 (UEC); Inaj, Gomes, APS 211 (UEC), Laurênio, A 261 (UEC); Petrolina, Leitão-Filho, HF 8910 (UEC); Sertânia, Fonseca, WN 7 (UEC). Piauí: Campo Maior, Farias, RR 361 (UEC), Farias, RR 378 (UEC), Farias, RR 404 (UEC), Farias, RR 412 (UEC), Farias, RR 64 (UEC), Lopes, CG 10 (UEC), Lopes, CG 45 (UEC); Luiz Correia, Santos Filho, FS 479 (UEC); São José do Piauí, Mendes, MRA 460 (UEC). Rio Grande do Norte: Jucurutu, Roque, A 353 (UEC). Sergipe: Poço redondo, Matos, GMA 58 (COR); Poço Verde, Oliveira, EVS 485 (COR).

4. *Aspidosperma refractum* Mart. & Zucc., Flora 7(1): 136. 1824. Type: BRAZIL. Bahia: In sylvis Catingas dictis inter oppidum Caitet et praedium Maracás in interioribus, s.d., *Martius s.n.* (Syntype: M [digital image!]) Figure 3. E-I

Tree up to 10 m. Branches tomentose to glabrous, brown, cataphylls present. Leaves with petioles cylindrical, not canaliculate on the adaxial surface, 0.4–0.8 cm long, tomentose; blades $2.3\text{--}3.5 \times 1\text{--}1.9$ cm, blades chartaceous, elliptic to obovate, apex acute, base attenuate, discolorous, adaxial surface dull, dark green, tomentose to glabrous, primary vein prominent, secondary veins inconspicuous to flattened, tertiary veins inconspicuous, abaxial surface dull, light green to withish, tomentose, primary vein prominent, secondary veins prominulus to prominent, in 8–12 pairs, tertiary veins inconspicuous. Inflorescences ca. 2.5 cm long, subterminal, tomentose. Flowers 15–20 mm long; pedicels $1.6\text{--}4 \times 0.4$ mm long, tomentose. Calyx $3.5\text{--}5 \times 1.5\text{--}3$ mm long, greenish; tube ca. 0.3 mm long, tomentose externally, glabrous internally; lobes 5, 2–3 mm long, equal, narrowly triangular, apex acute, tomentose externally, pubescent at the apex internally. Corolla 13.4–16 mm long; tube 3.5–4 mm long, wall thickened at the mouth, tomentose externally, glabrescent internally; lobes 5, $9\text{--}11 \times 2\text{--}3$ mm, oblong, apex rounded, glabrescent externally, tomentose at the mouth internally. Stamens 5, 2.8 mm long; anthers 0.8 mm long; Carpels 2.6 mm long; ovary 0.5×0.6 mm, ovoid, tomentose; style 1.4 mm long; style-head 0.6 mm long, main body oblong, without 2 apical appendages, ca. 0.6 mm long, pubescent. Follicles $2.7\text{--}3.4 \times 1.7\text{--}2.4$ cm, dolabriform, 0.7–1 mm long, not mucronate, midrib conspicuous, lenticels sparse lenticels, brown, glabrescent. Seeds 2.3×1.1 cm, elliptic.

Comments: *Aspidosperma refractum* is easily recognized by the follicles with conspicuous midrib (the only species of the *Pyrifolia* group with this feature). This species possess leaves and flowers smaller ($2.3\text{--}3.5 \times 1\text{--}1.9$ cm) than *Aspidosperma pyrifolium* ($1.4\text{--}6.7 \times 2.4\text{--}9.8$ cm).

Distribution and Habitat: *Aspidosperma refractum* occurs only in Brazil, in the Bahia and Minas Gerais states. It is distributed in seasonal forests and *Caatinga*. (Fig. 5).

Phenology: Flowers from June to January and fruits in January to September.

Conservation status: *Aspidosperma refractum* has an AOO of 32 km² and EOO of 240 thousand km², considered endangered (EN) and least concern (LC), respectively, according to IUCN (2016) guidelines. This species occurs in two environments strongly threatened by human suppression (*Caatinga* and *Cerrado*), and we must also emphasize that its populations have low abundance of individuals.

Examined specimens: BRAZIL. Bahia: Itumirim, RB 6850 (RB); Riacho Santana, Bondar, G 9 (RB); Sebastião Laranjeiras, Bochado, AL 224 (IBGE). Minas Gerais: Januária, Magalhães, M 4615 (RB).

5. *Aspidosperma resonans* H.J. Will. & Goyde. Kew Bulletin 60: 313. 2005. Type: BOLIVIA. Depto. Chuquisaca: Prov. Oropeza, descent to Rio Cachimayo valley above Chacoma, 2500 m, 13.IX.1994, *Wood 8771* (Holotype K [digital image!])

Figure 3. A-D

Shrubs or trees, up to 13 m. Branches tomentose to glabrous, brown, cataphylls present. Leaves with petioles cylindrical, not canaliculate on the adaxial surface, 2–3.5 cm long, glabrous; blades 4–13 × 2–6 cm, blades chartaceous, ovate, apex cuspidate, base rounded, rare obtuse, slightly discoloured, adaxial surface lustrous or dull, olive green, pubescent to glabrous, primary vein immersed, secondary veins flattened, tertiary veins conspicuous, abaxial surface dull, green, pubescent to glabrous, primary vein prominent, secondary veins prominulous, in 8–15 pairs, tertiary veins conspicuous. Inflorescences 2–4.5 cm long, terminal, pubescent. Flowers 22.4–30–35 mm long; pedicels 1–3.5 × 1.2 mm long, pubescent. Calyx 6.9–10 × 1–1.4 mm long, greenish; tube ca. 0.2 mm long, pubescent externally, pubescent internally; lobes 5, 3–8 mm long, equal, narrowly triangular to filiform, apex acute, pubescent externally, pubescent internally. Corolla 15.5–20(–25) mm long; tube 5–8 mm long, wall thickened at the mouth, pubescent externally, pubescent internally; lobes 5, 9.5–17 × 2.25–2.5 mm, oblong, apex acute, pubescent externally, glabrescent internally. Stamens 5, ca. 5 mm long; anthers 1–1.5 mm long; Carpels 5 mm long; ovary 1–1.5 mm, ovoid, glabrous; style 4 mm long; style-head 1 mm long, main body oblong, without 2 apical appendages, ca. 0.5 mm long, pubescent. Follicles 3.5–4 × 2.5–2.5 cm, dolabriform, ca. 6.5 mm long, mucronate, midrib inconspicuous, lenticels sparsely lenticellate, yellow–green, glabrescent. Seeds 3 × 2.5 cm, suborbicular.

Comments: We could not examine material from *Aspidosperma resonans* then we describe it based on the original description of the species (Goyder et al., 2005). This species is easily recognized by its | leaves usually glabrous, with apex cuspidate, long calyx lobes (3–8 mm) and flowering without losing the mature leaves (the only species of the *Pyrifolia* group with this feature).

Distribution and Habitat: *Aspidosperma resonans* occurs only in high altitudes (2200 - 2700 m) of Bolivia, in the central valley Andean of the Rio Grande. It occurs in dry forest and in more open habitats. (Fig. 5).

Phenology: Flowers from October, prior to the rainy season.

Conservation status: *Aspidosperma resonans* has an AOO of 20 km² and EOO of 10 thousand km², considered endangered (EN) and vulnerable (VU), respectively, according to IUCN (2016) guidelines. According with (Goyder et al., 2005), this is specie assessed as near Threatened (NT), because consider not appropriate the criterions (AOO and EOO) of IUCN.

Examined specimens: see Goyderi et al. (2005)

List of all specimens by collector

1. *Aspidosperma guaraniticum*
2. *Aspidosperma martii*
3. *Aspidosperma pyriform*
4. *Aspidosperma refractum*

Andrade, IM 265 (3) Andrade, K 85 (3) Árboz, GF 859 (1) Bochado, AL 224 (4) Bondar, G 9 (4) Bueno, NR 57 (1) Carvalho, JF 42 (2) Cavalcanti, TB 2637 (2); 3189 (3) Damasceno Junior, GA 2893 (2), 2897 (1) Duarte, AP 9524 (3); 9549 (3) Farias, E 115 (2); Farias, RR 64 (3); 361 (3); 378 (3); 404 (3); 412 (3) Figueiredo, L 242 (3) Fonseca, ML 2337 (2) Fonseca, WN 7 (3) Gomes, APS 201 (2); 211 (3) Gomes, SM 207 (2); 209 (2); 210 (2); 214 (2) Laurênio, A 261 (3) Leitão Filho, HF 8910 (3) Lombardi, JA 2076 (2) Lopes, CG 10 (3); 45 (3) Macedo, GEL 1652 (3) Magalhães, M 4615 (4) Martins, MV 254 (3) Matos, GMA 58 (3) Melo, E 3119 (3); 3738 (3) Mendes, MRA 460 (3) Nascimento, EA 127 (2) Nee, M 49081 (1) Nogueira, PE 99 (3) Oliveira, EVS 485 (3) Oliveira, M 2370 (3) Oliveira, PP 155 (1) Paschoal 23 (1) Pereira, BAS 1715 (2); 2910 (2); 3607 (2) Pott, A 15796 (1) Queiros, LP 1121 (3); 1163 (3); 3020 (3); 3697 (3); 4645 (3); 4647 (3) Ratter, TA 2705 (3) Roque, A 353 (3) Santos Filho, FS 479 (3) Santos, AA 2248 (2) Servilha, AC 1860 (2); 1961 (2) Silva, FHM 517 (3) Souza Silva, S 351 (2) Takahasi, A 721 (1) Walter, BMT 2629 (2)

Unknown collector and/or collector number: COR 16362 (3) RB 6850 (4) UEC 174797
(2); 185953 (3)

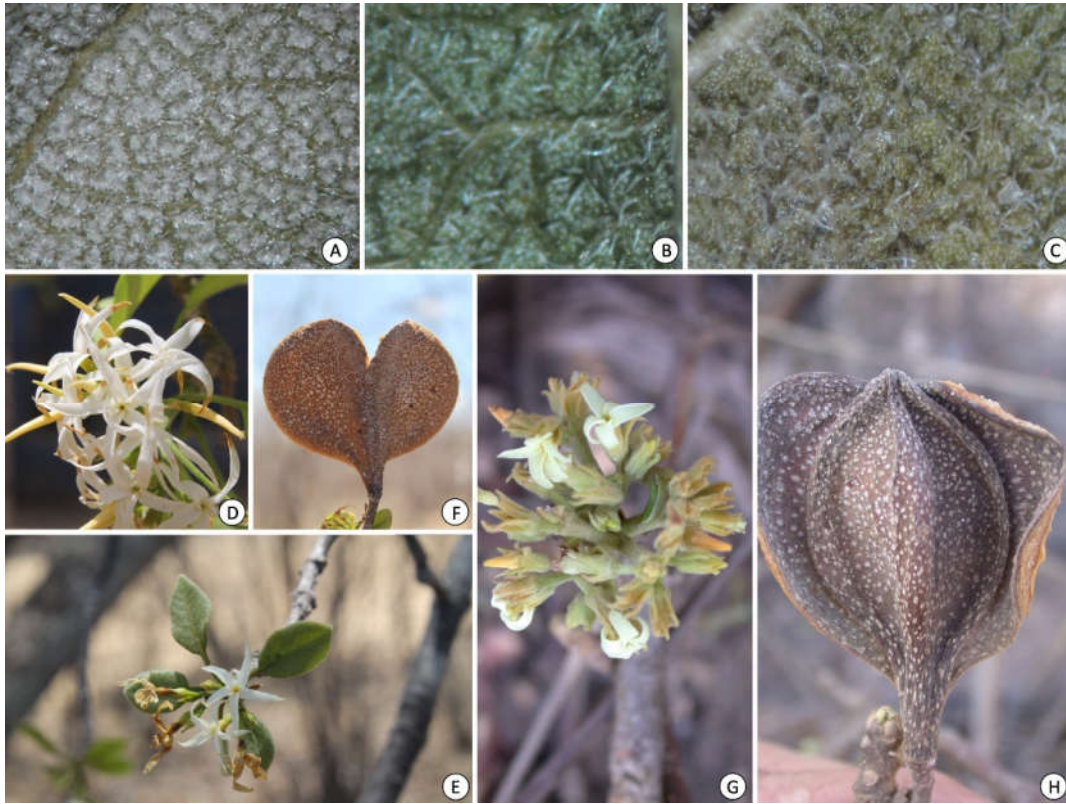


Figure 1. Characteristics of the species of the Pyrifolia group. A. *Aspidosperma guaraniticum*; B. *A. martii*; C-E. *A. pyrifolium*; G-H. *A. refractum*. A-C. Leaf abaxial surface; D-E. Reproductive branches; F. Follicle; G. Reproductive branches; H. Follicle. [Vouchers: A. M. Nee 51416 (UEC); B. T.B.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



Figure 2. Characteristics of the species of the *Pyrifolia* group. A-H. *Aspidosperma guaraniticum*; H-M. *A. martii*; N-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).

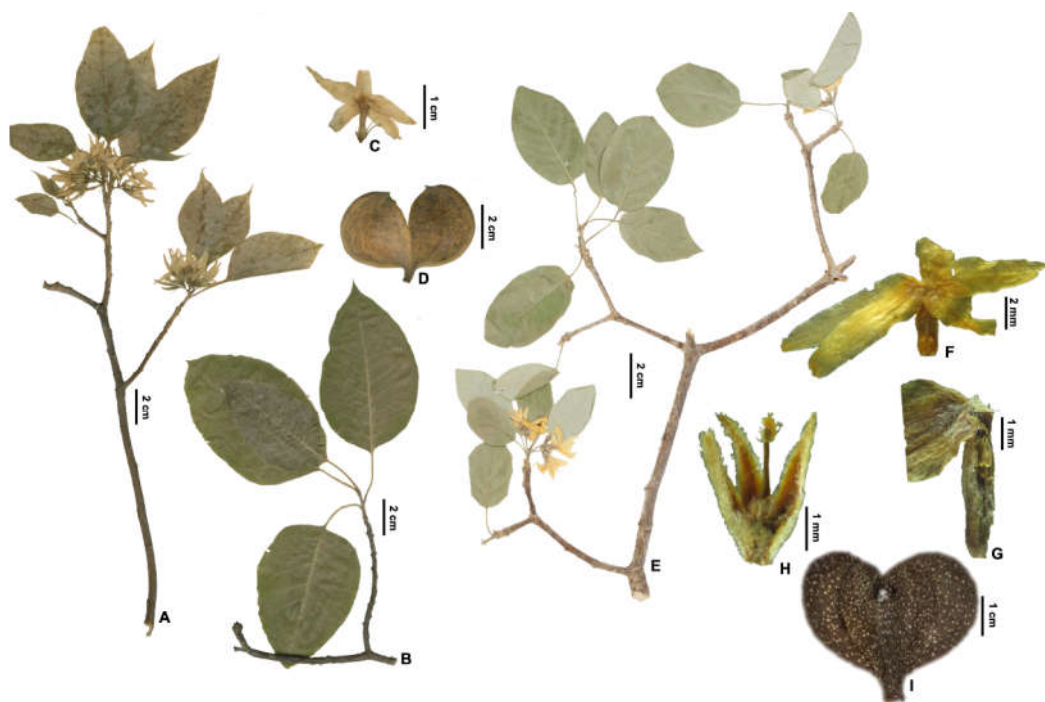


Figure 3. Characteristics of the species of the Pyrifolia group. A-D. *Aspidosperma resonans*; E-I. *Aspidosperma refractum*. A. Reproductive branches, B. Detail of the leaves; C. Flower; D. Follicle; E. Reproductive branches; F. Corolla externally; G. Corolla internally; H. Calyx and pistil; I. Follicle. [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).

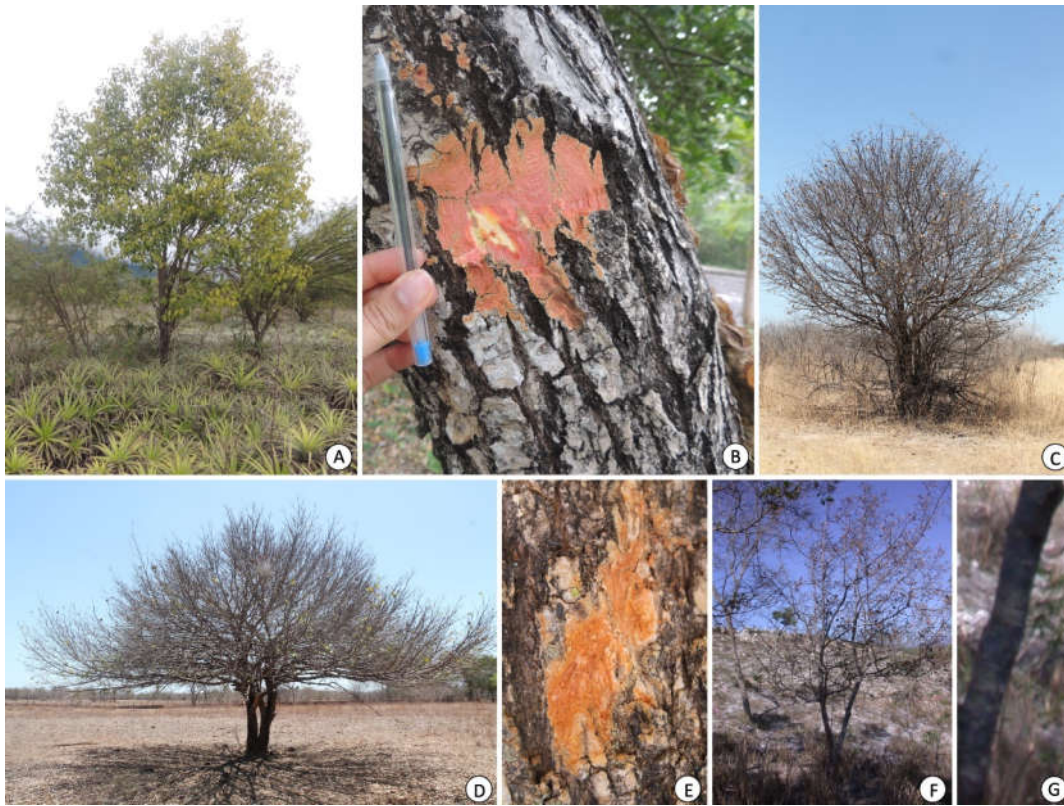


Figure 4. Characteristics of the species of the Pyrifolia group. A-B. *Aspidosperma guaraniticum*; C-E. *A. pyrifolium*; F-G. *Aspidosperma refractum*. [Fotos: A-B. A.L. Scudeler; C-E. A.C.D. Castello; F-G. A.O. Simões]

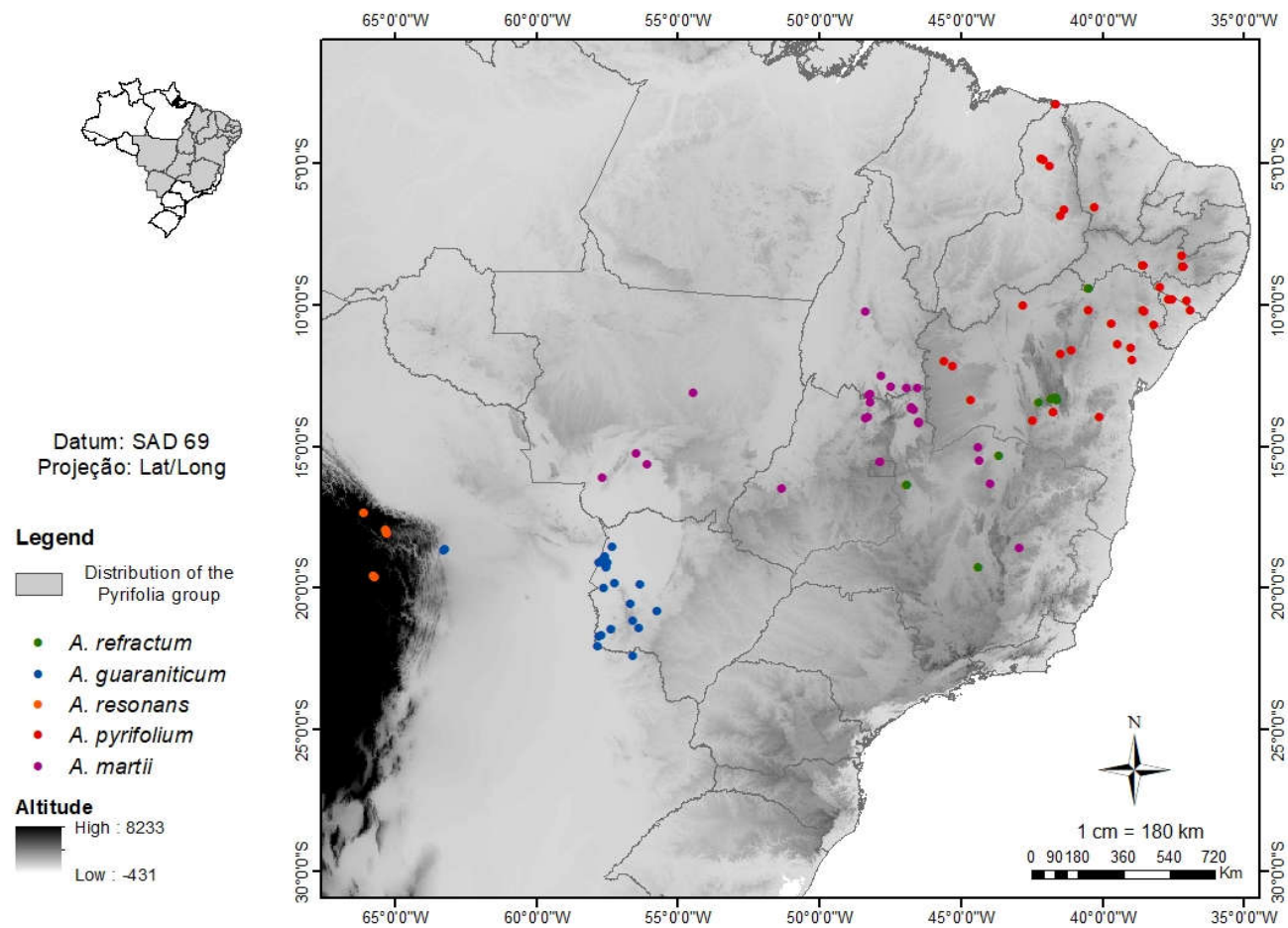


Figure 5. Occurrence of pyrifolia group in South America.

Literature cited

- Abramoff, M. D., Magalhães, P. J. and Ram, S. J. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int*, 11:36–42.
- Alves, F.M. *et al.* (2014). Characterization of microsatellite markers developed from *Prosopis rubriflora* and *Prosopis ruscifolia* (Leguminosae - Mimosoideae), legume species that are used as models for genetic diversity studies in Chaquénian areas under anthropization in South America. *BMC Res Notes*, 7:1–6.
- Bachman, S. *et al.* (2011) Supporting Red List threat assessments with GeoCAT: geospatial conservation assessment tool. *Zookeys*, 150:117–126.
- Brasil. (2018). Caatinga. In: Ministério do Meio Ambient. <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga> (accessed 2018 Febr 16).
- Castello, A.C.D. (2018) Sistemática de *Aspidosperma* Mart. & Zucc. (Apocynaceae) com ênfase na seção típica. Tese (doutorado) UNESP, SP-Botucatu.
- De Candolle A. (1844) Apocynaceae. *Prodomus Syst Nat Regni Veg Parisiis*, Fortin, Masson sociorum, 8:317–489
- Endress, M.E., Liede-Schumann, S. and Meve, U. 2014. An updated classification for Apocynaceae. *Phytotaxa*, 159(3):175–194,
- ESRI. (2015) ArcGis Desktop 10.3.1. <http://desktop.arcgis.com/en/arcmap/10.3/get-started/quick-start-guides/arcgis-desktop-quick-start-guide.htm>
- Goyderl, D.J., Wood, J.R.I. and Williamson, H.J. (2014) a new resonans (Apocynaceae : Rauvolfioideae), *Aspidosperma* species from the inter-Andean dry valleys of Bolivia. 60:313–317.
- IUCN - International Union for Conservation of Nature. (2016) Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria, version 12. <http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines>
- JSTOR Global Plants. Available from: <http://plants.jstor.org/> (last accessed september 2018).
- Marcondes-Ferreira, W. (1988) *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae): estudos taxonômicos. Tese (doutorado) Universidade Estadual de Campinas, SP-Campinas.
- Müller-Argovensis, J. (1860) Apocynaceae. In: Martius CFP (ed) *Flora brasiliensis enumeratio plantarum in Brasilia hactenus delectarum ques suis aliorumque botanicorum studiis descriptas et methodo naturai digestas partim icone illustratas*,

6th edn. p 1–195

- Pereira, A.S.S. *et al.* (2017). *Aspidosperma brasiliense* (Apocynaceae), a new and widely distributed species. *Phytotaxa*, 326: 235–244.
- Reflora. (2018) Herbário Virtual Reflora. In: Jard. Botânico do Rio Janeiro. <http://www.herbariovirtualreflora.jbrj.gov.br/> . Accessed 20 Aug 2012
- Reginato, M. (2016) MonographaR: an R package to facilitate the production of plant taxonomic monographs. *Brittonia*, 68.
- Marcondes-Ferreira, W. and Kinoshita, L. S. (1996). Uma nova divisão infragenérica para *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 19: 203–214.
- Simoes, A.O. *et al.* (2007) Phylogeny and Systematics of the Rauvolfioideae (Apocynaceae) Based on Molecular and Morphological Evidence. *Ann Missouri Bot Gard*, 94:268–297.
- SpeciesLink. (2018) Sistema de informação distribuído para coleções biológicas: a integração do Species Analyst e do SinBiota (FAPESP). In: Cent. Ref. em Informação Ambient. (CRIA). <http://splink.cria.org.br/>
- R Core Team. (2018) R: A Language and Environmental for Statistical Comput. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>.
- Woodson, R.E. (1951) Woodson *Aspidosperma*. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 38:119–206.

Considerações Finais

Nesse estudo demonstrei, por uma de uma abordagem integrativa, que o complexo *Aspidosperma pyrifolium* Mart. & Zucc. (Apocynaceae) é monofilético, formado por 3 clados bem suportados, que são geneticamente distintos, ocupam nichos diferentes, porém possuem grande sobreposição morfológica. Esses clados possuem distribuição geográfica relacionadas a determinadas regiões e vegetações, clado 1 região Nordeste na Caatinga, clado 2 região Centro-Oeste em manchas de Floresta Estacional, e clado 3 no estado do Mato Grosso do Sul, Bolívia e Paraguai em áreas com vegetação de Chaco.

A partir dos resultados obtidos, propus uma nova circunscrição para o complexo *Aspidosperma pyrifolium*, aqui denominado Grupo Pyrifolia, que inclui além de *A. pyrifolium*, *A. martii* (região do Centro-Oeste) e *A. guaraniticum* (região do Chaco), táxons segregados de *A. pyrifolium*, e também espécies morfológicamente similares, *A. resonans* espécie descrita em 2005 para região andina da Bolívia e *A. refractum*, recentemente reestabelecida (que também era considerada sinônimo de *A. pyrifolium*).

Também desenvolvi uma biblioteca de microssatélites com 20 marcadores para *Aspidosperma pyrifolium*, com 16 polimórficos e 4 monomórficos. Os testes de transferibilidade evidenciaram o sucesso de amplificação dos marcadores para outras espécies do gênero. Assim, os SSRs desenvolvidos mostraram-se de fato uma importante ferramenta para avaliar a diversidade genética e estrutura das populações devido o alto grau de polimorfismo encontrado.

Os resultados aqui obtidos evidenciam a importância da delimitação de espécies para uma real caracterização da biodiversidade e sua efetiva conservação. A partir da nova circunscrição proposta, novas perguntas podem ser levantadas sobre o processo de evolução, história demográfica e de ocupação geográfica nesses ambientes secos por esses clados irmãos. Sugerindo como perspectiva futura um trabalho filogeográfico para responder tais questões.