

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

ANA LÚCIA GONÇALVES DA SILVA

O PAPEL DA HIBRIDIZAÇÃO NATURAL NA COMPLEXIDADE SISTEMÁTICA DE
Cenostigma* (Leguminosae): FLUXO GÊNICO ENTRE *C. laxiflorum* e *C. microphyllum
REVELADO POR SSRs E MORFOMETRIA

RECIFE

2024

ANA LÚCIA GONÇALVES DA SILVA

**O PAPEL DA HIBRIDIZAÇÃO NATURAL NA COMPLEXIDADE SISTEMÁTICA DE
Cenostigma (Leguminosae): FLUXO GÊNICO ENTRE *C. laxiflorum* e *C. microphyllum*
REVELADO POR SSRs E MORFOMETRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Área de Concentração Sistemática e Evolução, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andrea Pedrosa-Harand
(Departamento de Botânica, UFPE)

Coorientador: Prof^º. Dr^º. Luiz Gustavo Rodrigues
Souza (Departamento de Botânica, UFPE)

RECIFE

2024

Silva, Ana Lúcia Gonçalves da.

O papel da hibridização natural na complexidade sistemática de *Cenostigma* (Leguminosae): fluxo gênico entre *C. laxiflorum* e *C. microphyllum* revelado por SSRs e morfometria / Ana Lúcia Gonçalves da Silva. - Recife, 2024.

56f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, 2024.

Orientação: Andrea Pedrosa-Harand.

Inclui referências e apêndices.

1. Catingueira; 2. Estruturação genética; 3. Haplótipos. I. Pedrosa-Harand, Andrea. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

ANA LÚCIA GONÇALVES DA SILVA

**O PAPEL DA HIBRIDIZAÇÃO NATURAL NA COMPLEXIDADE SISTEMÁTICA DE
Cenostigma (Leguminosae): FLUXO GÊNICO ENTRE *C. laxiflorum* e *C. microphyllum*
REVELADO POR SSRs E MORFOMETRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Área de Concentração Sistemática e Evolução, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de mestre em Biologia Vegetal.

APROVADA EM: 31/01/2024

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Prof^{ta}. Dr^a. Andrea Pedrosa-Harand - UFPE

Prof^o. Dr^o. Cícero Carlos de Souza Almeida - UFAL

Prof^o. Dr^o. Rodrigo Cesar Gonçalves de Oliveira - UPE

AGRADECIMENTOS

Hoje olhando para trás consigo enxergar várias pessoas que foram cruciais para que eu chegasse até onde estou. Gostaria de agradecer a cada pessoa que me ajudou nesse processo tanto direta ou indiretamente. E não podia começar sem agradecer a mulher mais importante da minha vida, minha mãe. Obrigada por sempre me apoiar e me incentivar a alcançar meus objetivos. Obrigada por ser meu refúgio e porto seguro.

É impossível falar sobre minha vida acadêmica e não lembrar do meu tão querido amigo Paulo Aecyo, que, contribuindo com a execução dessa dissertação ou levantando minha moral, esteve comigo durante todo o árduo processo que foi escrever essa dissertação. Você é a definição de que não precisamos estar geograficamente perto para estar presentes na vida daqueles que amamos. A todos meus companheiros do Laboratório de Citogenética e Evolução vegetal por tornarem esses anos tão leves e suaves. Apesar do cansaço e do desânimo que o dia a dia traz, vocês foram meu estoque de Monster privativo. Meus dias foram mais felizes por poder trabalhar com cada um de vocês. Obrigada pelas risadas, pelas conversas e por todo suporte que vocês me deram ao longo dessa jornada. Vocês com certeza alugaram um triplex vitalício no meu coração.

A minha amiga de longa data, Karolis, obrigada, apesar das divergências de horários, sei que posso contar com você. Obrigada por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditei e por celebrar minhas vitórias como também as derrotas ao meu lado. A meus amigos que o “Debêzinho” trouxe pra mim, meu muito obrigada por celebrar as minhas conquistas junto comigo e por não soltar minha mão nos momentos difíceis (que não foram poucos). Vocês tornam as madrugadas mais alegres.

Um muito obrigada mais do que especial a minha orientadora Andrea Pedrosa-Harand por aceitar me orientar mesmo frente às adversidades você não desistiu de mim, e olha só eu consegui finalizar a minha dissertação. Você foi parte fundamental nesse processo. Obrigada também ao meu co-orientador Luiz Gustavo por se manter positivo, mesmo frente às adversidades e por estar sempre disponível seja para realizar as coletas ou para me auxiliar.

RESUMO

A hibridização pode contribuir para especiação e adaptação de espécies, embora torne complexa sua taxonomia. O gênero *Cenostigma* apresenta baixa resolução filogenética, devido à sua origem recente e/ou à ocorrência de híbridos. A hipótese de hibridização é sustentada pela observação de indivíduos com morfologia intermediária entre espécies simpátricas no Nordeste do Brasil, e corroborada entre *C. microphyllum* e *C. pyramidale* por uma análise molecular. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a abrangência dos eventos de hibridização no gênero, testando a ocorrência de híbridos naturais entre *C. laxiflorum* e *C. microphyllum*. Foram coletados de dois a 14 indivíduos de sete populações em áreas de distribuição natural dessas espécies. Análises morfométricas e moleculares de locos plastidiais (cpSSR) e nucleares (nuSSR) de microssatélites foram realizadas. A análise morfométrica revelou ampla plasticidade nos tamanhos dos folíolos. Os alelos cpSSR definiram nove haplótipos que apresentaram uma estruturação geográfica compatível a das populações analisadas, sugerindo haplótipos espécie-específicos. A análise dos nuSSRs revelou estruturação das populações em dois grupos genéticos relativos às duas espécies. No entanto, a maioria das populações apresentaram indivíduos geneticamente classificados como híbridos, também em populações alopátricas. As análises sugerem a ocorrência de hibridização entre as duas espécies, contribuindo para a baixa diferenciação morfológica entre elas.

Palavras-chave: Catingueira; estruturação genética; haplótipos; híbridos; introgressão; microssatélites

ABSTRACT

Hybridization can contribute to speciation and adaptation of species, although it might lead to taxonomic complexity. The genus *Cenostigma* has low phylogenetic resolution, due to its recent origin and/or the occurrence of hybrids. The hybridization hypothesis is supported by the observation of individuals with intermediate morphology between sympatric species in Northeast Brazil, and corroborated by a molecular analysis between *C. microphyllum* and *C. pyramidale*. Therefore, the aim of this work was to investigate the scope of hybridization events in the genus, testing the occurrence of natural hybrids between *C. laxiflorum* and *C. microphyllum*. Two to 14 individuals were collected from seven populations in areas of natural distribution of these species. Morphometric and molecular analysis of plastid (cpSSR) and nuclear (nuSSR) microsatellite loci were performed. Morphometric analysis revealed broad plasticity in leaflet sizes. The cpSSR alleles defined nine haplotypes that presented a geographic structure compatible with that of the analysed populations, suggesting species-specific haplotypes. The analysis of the nuSSRs revealed the structuring of the populations into two genetic groups relating to the two species. However, most populations had individuals genetically classified as hybrids, also in allopatric populations. Altogether, the analyses suggest the occurrence of hybridization between the two species, contributing to the low morphological differentiation between them.

Keywords: Catingueira; genetic structure; haplotypes; hybrids; introgression; microsatellites

LISTA DE TABELAS, FIGURAS E MATERIAL SUPLEMENTAR

- Tabela 1.** Populações alopátricas e simpátricas de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum* amostradas.....28
- Tabela 2.** Genotipagem de locos plastidiais e nucleares em *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum*. Os locos selecionados para genotipagem de todos os indivíduos coletados após testes de transferibilidade e polimorfismo em subamostra estão indicados em negrito.....33
- Tabela 3.** Diversidade genética por loco nuSSR nas populações amostradas de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum*.....36
- Tabela 4.** Frequência de alelos privados em sete locos nucleares utilizados nas populações amostradas de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum*.....37
- Tabela 5.** Diversidade genética por população com base em sete locos nuSSR para os indivíduos amostrados de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum*.....39
- Tabela 6.** F_{st} nuclear par-a-par inferido entre as populações amostradas de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum*.....41
- Tabela 7.** Análise da variabilidade haplotípica gerada a partir de cinco locos cpSSR em indivíduos de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum*. **N:** número de indivíduos genotipados. **H:** Haplótipos detectados em cada população. **P:** Número de haplótipos privados. **N_e:** Número efetivo de haplótipos. **H_e:** Diversidade genética.....42
- Figura 1.** Distribuição geográfica das espécies *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum* de acordo com dados disponíveis no Gbif.org, assim como as populações coletadas para o presente trabalho em áreas ao norte **(A)** e ao sul **(B)** de sua distribuição.....28

Figura 2. Análise discriminante das espécies analisadas **(A)**. Plasticidade foliar encontrada a partir de valores de centróide obtidos nos indivíduos analisados de *Cenostigma laxiflorum* (MV, CS) e *Cenostigma microphyllum* (PT), assim em populações simpátricas entre as duas espécies (CN) **(B)**. Relação entre o tamanho dos foliólulos e tamanho do centróide em indivíduos de *Cenostigma laxiflorum* (laranja) e *Cenostigma microphyllum* (azul), mostrando ampla variação em ambas as espécies e híbridos **(C)**.....32

Figura 3. Atribuição genética dos 65 indivíduos de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum* amostrados a partir da genotipagem de sete locos nuSSR por meio do STRUCTURE.....40

Figura 4. Haplótipos plastidiais obtidos a partir da genotipagem de cinco locos de cpSSR em populações de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum*. **(A e B)** Frequências e distribuição geográfica dos haplótipos por população; **(C)** Rede de haplótipos. Asteriscos (*) indicam populações de indivíduos com morfologia intermediária entre as duas espécies.....43

Figura Suplementar 1. Agrupamento Bayesiano das populações amostradas realizada no STRUCTURE variando o *K* de 1 a 8.....52

Figura Suplementar 2. Best K de Evanno para as populações amostradas.53

Tabela Suplementar 1. Valores de *q*, morfologia e centróide para as populações analisadas. **(H)**: híbrido **(L)**: *Cenostigma laxiflorum* e **(M)**: *Cenostigma microphyllum*. Indivíduos com (-) não possuem dados para a respectiva categoria.....54

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	10
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1	O GENOMA VEGETAL	12
2.2	IMPACTOS DO PROCESSO DE HIBRIDIZAÇÃO	13
2.3	DETECÇÃO DE HÍBRIDOS	14
2.4	A TRIBO CAESALPINIEAE (Caesalpinioideae, Leguminosae)	16
2.4.1	O gênero <i>Cenostigma</i>	17
2.4.2	<i>Cenostigma laxiflorum</i> E <i>C. microphyllum</i>	18
3	REFERÊNCIAS	19
4	ARTIGO 1 - O papel da hibridização natural na complexidade sistemática de <i>Cenostigma</i> (Leguminosae): fluxo gênico entre <i>C. laxiflorum</i> e <i>C. microphyllum</i> revelado por SSRs e morfometria	24
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
	REFERÊNCIAS	48
	APÊNDICE A - Agrupamento Bayesiano das populações amostradas realizada no STRUCTURE variando o <i>K</i> de 1 a 8.	52
	APÊNDICE B - Best K de Evandro para as populações amostradas.	53
	APÊNDICE C - Valores de <i>q</i>, morfologia e centróide para as populações analisadas. (H): híbrido (L): <i>Cenostigma laxiflorum</i> e (M): <i>Cenostigma microphyllum</i>. Indivíduos com (-) não possuem dados para a respectiva categoria.	54

1 APRESENTAÇÃO

Eventos de hibridização bem como suas consequências têm sido de interesse de longa data entre os biólogos evolucionistas. A princípio, a ideia propagada por muitos biólogos naturalistas era que o fruto do cruzamento entre espécies distintas seriam linhagens estéreis, pois a esterilidade evitaria que as próximas gerações “se confundam” e viessem a cruzar livremente entre si (DARWIN, 1859). Hoje sabemos que a hibridização é um processo evolutivo importante ao longo da árvore da vida (RIESEBERG; CARNEY, 1998; LANGDON *et al.*, 2020). Apesar de algumas linhagens frutos de cruzamentos interespecíficos serem de fato estéreis devido a barreiras reprodutivas (FÁVERO *et al.*, 2006; MUNIZ *et al.*, 2020), alguns indivíduos híbridos conseguem não somente cruzar entre si, mas também com as espécies parentais (LAMICHHANEY *et al.*, 2018; MOTA *et al.*, 2019). Em alguns casos, o cruzamento com indivíduos híbridos pode inclusive ajudar na sobrevivência da espécie, como no caso das azaleias, *Hippeastrum aulicum* (KER GAWL) HERB, descrito por Darwin em 1859.

Vários resultados evolutivos podem surgir através da hibridização, como, por exemplo, a indução ou reversão da especiação, a formação de zonas híbridas, a transferência de pequenas quantidades de material genético através de introgressão e, ocasionalmente, a especiação híbrida (ABBOTT *et al.*, 2013). Apesar do importante papel da hibridização na evolução, alguns mecanismos envolvidos neste processo, assim como o destino desses genomas híbridos, ainda necessitam de elucidação (PEASE *et al.*, 2016; MORAN *et al.*, 2021).

Esses eventos de hibridização podem ser atribuídos como causa da baixa resolução filogenética que alguns grupos podem apresentar devido à formação de híbridos naturais e à transferência horizontal de genes. O grupo Caesalpinia é conhecido dentre as Leguminosae devido à sua heterogeneidade morfológica e à grande quantidade de homoplasias e convergências morfológicas, fatores que dificultam a determinação de caracteres diagnósticos únicos para cada clado (GAGNON *et al.*, 2016; GAGNON *et al.*, 2019). Dentro do grupo Caesalpinia, o gênero *Cenostigma* apresenta as maiores complexidades taxonômicas, com difícil delimitação de algumas espécies e baixa resolução filogenética (GAGNON *et al.*, 2016; AECYO *et al.*, 2021). Essa baixa resolução filogenética e dificuldade taxonômica podem estar relacionadas à formação de híbridos.

Em estudos morfológicos anteriores, Lewis (1995), a partir da observação de exsicatas, percebeu que alguns espécimes apresentavam características intermediárias entre *C. laxiflorum* (Tul.) E. Gagnon & G. P. Lewis e *C. microphyllum* (Mart. ex G. Don) E. Gagnon & G. P. Lewis. Também foi observado indivíduos com características intermediárias entre *C. laxiflorum* e *C. pluviosum* var. *peltophoroides* (Benth.) E. Gagnon & G. P. Lewis, indicando possíveis eventos de hibridização dentro do gênero. Embora Aecyo *et al.*, (2024) tenha confirmado a hibridização entre *C. microphyllum* e *C. pyramidale* (Tul.) E. Gagnon & G. P. Lewis, a existência dos híbridos envolvendo *C. laxiflorum* e demais espécies do gênero não foi investigada. Sendo assim, esta dissertação tem como principal objetivo investigar se há fluxo gênico entre as espécies citadas acima.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O GENOMA VEGETAL

Nas células vegetais podemos encontrar três genomas distintos: mitocondrial, cloroplastidial e nuclear. As mitocôndrias contribuem para produção de energia, metabolismo e homeostase celular, sendo fundamentais tanto no desenvolvimento de plantas quanto no seu *fitness* e na sua reprodução. Assim como em outros organismos, o genoma mitocondrial em plantas codifica uma série de polipeptídeos que formam os complexos da cadeia de fosforilação oxidativa, juntamente com subunidades que são codificadas nuclearmente, o que as torna semi-autônomas (GUALBERTO, 2014). Já os cloroplastos são centros metabólicos ativos responsáveis por sustentar a vida na Terra, através da conversão da energia solar em carboidratos por meio dos processos fotossintéticos. Eles também desempenham papéis vitais em outros aspectos da fisiologia e desenvolvimento das plantas, incluindo: a síntese de aminoácidos, nucleotídeos, ácidos graxos, fitohormônios, vitaminas, uma infinidade de metabólitos e a assimilação de enxofre e nitrogênio (BOBIK; BURCH-SMITH, 2015).

Estes genomas podem ser herdados, geralmente, de maneira uniparental (mitocondrial e cloroplastidial) ou por ambos parentais (nuclear). Seu tamanho pode variar muito de acordo com diferentes linhagens de plantas. Dentre eles, o genoma nuclear é o maior, sendo mensurado em mega ou gigabases. Já o genoma mitocondrial pode variar entre 200 e 2.500 kb. Embora menor que o genoma nuclear, o genoma mitocondrial das plantas ainda é maior do que o encontrado em animais (10-20 kb) (WU *et al.*, 2020). Dentre estes, o genoma cloroplastidial é o menor e mais estável, podendo variar entre 100-200 kb (LIU *et al.*, 2014).

Os genomas dos cloroplastos geralmente compreendem uma única molécula circular com uma estrutura dividida em quatro partes que inclui duas cópias de uma região invertida (IR) que separam grandes e pequenas regiões de cópia única (LSC e SSC). O genoma do cloroplasto possui geralmente entre 120 e 130 genes, participando principalmente da fotossíntese, transcrição e tradução (DANIELL *et al.*, 2006). Os genomas do cloroplasto revelaram considerável variação entre as espécies vegetais, tanto em termos de sequências quanto de estrutura. A variação do DNA plastidial é valiosa para entender as relações filogenéticas entre angiospermas e foi a base para propor um novo sistema de classificação para as plantas (APG II 2003). O melhor entendimento da variação entre os genomas de cloroplasto também permitiu a identificação de exemplos específicos de transferência de genes de cloroplasto para genomas mitocondriais e

nucleares, fato que lançou nova luz sobre a relação entre esses três genomas das plantas (WAMBUGU *et al.*, 2015).

O genoma nuclear vegetal apresenta cromossomos lineares (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011). O DNA nuclear das plantas inclui sequências codificadoras de cópia única, como, íntrons, exons, regiões promotoras, sequências reguladoras etc., assim como sequências repetidas que podem estar agrupadas em tandem ou dispersas ao longo do genoma (RICHARD, 2008). Novas espécies podem surgir a partir do aparecimento de barreiras reprodutivas que podem ser ocasionadas por meio de mutações cromossômicas aleatórias, e que podem se fixar em uma população (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011). Essas espécies distintas podem mais tarde participar de eventos de hibridização e ocupar nichos não favoráveis a nenhuma das espécies parentais (VON RONN; SHAFER; WOLF, 2016). A partir da análise do fluxo gênico e da introgressão causada nos genomas oriundos dos eventos de hibridização ocorridos nessas zonas híbridas, foi possível identificar regiões genômicas envolvidas na especiação (PAYSEUR, 2010).

2.2 IMPACTOS DO PROCESSO DE HIBRIDIZAÇÃO

A espécie é uma das unidades fundamentais da biologia, sendo comparada em nível de importância aos genes e células (QUEIROZ, 2005). No entanto, o conceito de espécie é um dos mais complexos, havendo uma grande variação de definições e uma dificuldade em aplicá-las e validá-las (QUEIROZ, 2007). O conceito mais amplamente utilizado é o conceito biológico de espécie, teorizado por Ernst Mayr (1942). Ele afirma que espécies são grupos de populações intercruzantes e que são isoladas reprodutivamente de outros grupos. No entanto, muitas têm sido as críticas a este conceito, desde suas premissas básicas (como o isolamento genômico total necessário para distinguir as espécies), à sua aplicação prática, como por exemplo a inviabilidade de pôr em prova este conceito entre populações alopátricas, ou à presença de híbridos férteis entre linhagens distintas (QUEIROZ, 2005).

Híbridos são organismos que surgem a partir de processos reprodutivos entre duas linhagens diferentes, podendo ser férteis e cruzarem entre si ou com os parentais (LAMICHHANEY *et al.*, 2018; MOTA *et al.*, 2019) ou estéreis (MUNIZ *et al.*, 2020; FÁVERO *et al.*, 2006). Apesar de ser vista, por muito tempo, como resultado de eventos de antropização (ABOTT, 2017), podendo provocar a perda de diversidade genética e extinção de uma espécie

por assimilação genética (MALLET, 2005), a hibridização tem uma importância como fator evolutivo e de especiação em linhagens de plantas (RIESEBERG; ELLSTRAND, 1993).

A hibridização natural é um fenômeno frequente entre as plantas vasculares, e pode levar a um crescimento da diversidade genética intraespecífica das populações envolvidas e à criação de novas espécies (LAMICHHANEY *et al.*, 2018). Devido à importância da hibridização de plantas na evolução, é necessário identificar com precisão os indivíduos híbridos (LÓPEZ-CAAMAL; TOVAR-SÁNCHEZ, 2014). Com os avanços na tecnologia de sequenciamento, hoje é possível detectar mais facilmente processos de hibridização antigos que anteriormente não era possível devido às limitações dos marcadores utilizados (TAYLOR; LARSON, 2019). Recentemente, Vonholdt *et al.* (2016) utilizaram dados do genoma completo para identificar eventos de hibridização e introgressão antigas em canídeos norte-americanos. Seus dados sugeriram que os genomas do lobo oriental e do lobo vermelho (*Canis lupus lycaon* e *Canis lupus rufus*, respectivamente) contêm contribuições significativas do genoma de lobos cinzentos (*Canis lupus*) e coiotes (*Canis latrans*), indicando que sua ancestralidade pode ser de origem híbrida. Da mesma forma, Svardal *et al.* (2017) forneceram evidências de mistura antiga em macacos vervet (*Chlorocebus pygerythrus*).

2.3 DETECÇÃO DE HÍBRIDOS

A hibridização de plantas tem sido de grande importância para os humanos desde o Neolítico, quando se iniciou a domesticação de plantas e animais (ZIRKLE, 1935). Entretanto, o estudo da hibridização em plantas foi dificultado em virtude da falta de conhecimento sobre seus sistemas reprodutivos. Embora a hibridização entre algumas espécies certamente tenha ocorrido durante a domesticação, esses eventos passaram despercebidos, devido à falta de conhecimento da função do pólen (LÓPEZ-CAAMAL; TOVAR-SÁNCHEZ, 2014).

No século passado, a maioria das metodologias utilizadas na identificação de híbridos era baseada na comparação dos caracteres morfológicos dos indivíduos híbridos com os parentais que os originaram, pois era esperado a conservação dos caracteres morfológicos parentais nos híbridos (LÓPEZ-CAAMAL; TOVAR-SÁNCHEZ, 2014). Arnold (2006), no entanto, argumentou que a análise morfológica é um indicativo pobre de ancestralidade híbrida, devido à limitação de caracteres morfológicos relacionados, visto que a expressão fenotípica é altamente dependente das condições ambientais, ou seja, um mesmo genótipo pode originar uma enorme

variedade de morfologias (intermediárias ou não), dependendo do ambiente em que se encontre. Além disso, espécies estreitamente relacionadas podem exibir caracteres morfológicos intermediários por apresentarem estados de carácter plesiomórficos (ARNOLD, 2006). Porém, apesar de possuir limitações, a morfologia ainda é o primeiro indicativo de hibridização entre linhagens (LEWIS, 1995; AECYO *et al.*, 2024). Aecyo *et al.*, 2024 em seu estudo com duas espécies do gênero *Cenostigma* (*C. microphyllum* e *C. pyramidale*) afirmou que o fenótipo dos indivíduos híbridos pode se apresentar igual a um dos parentais, intermediário ou ser um fenótipo novo.

Durante o início do século XX, no entanto, a biologia sofreu a transição de um campo descritivo para uma ciência quantitativa, e a análise morfológica viu uma revolução semelhante (BOOKSTEIN, 1998). Morfometria é o estudo da variação da forma e sua covariação com outras variáveis (BOOKSTEIN, 1992; DRYDEN; MARDIA, 1998). Tradicionalmente, a morfometria aplica análises estatísticas multivariadas a conjuntos de variáveis quantitativas, como comprimento, largura e altura dos organismos, já a morfometria geométrica visa identificar as diferenças numa forma, mesmo quando suas medidas possam ser semelhantes (FORNEL, 2016). A morfometria também pode ser aplicada na correlação de dados morfológicos quantitativos a outros parâmetros ambientais ou genéticos. Santos, Pezzuti e Garcia (2021) utilizaram a morfometria como ferramenta para distinguir espécies de pererecas do gênero *Pithecopus* a partir de suas formas larvais. Cunha *et al.* (2012) também utilizaram dados morfométricos para analisar o acúmulo de biomassa em palma forrageira (*Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck, atualmente conhecida como *Opuntia cochenillifera* (L.) Mill.) sob doses de nitrogênio.

Comparada às análises morfológicas, as técnicas moleculares são mais confiáveis e eficazes para a identificação de híbridos. As principais vantagens dos marcadores moleculares de DNA são a neutralidade e o número quase ilimitado em que podem ser encontrados dentro dos genomas (LÓPEZ-CAAMAL; TOVAR-SÁNCHEZ, 2014). Os microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) são motivos repetidos em tandem de 1 - 6 pb, ocorrendo tanto no genoma dos procariontos como de eucariotos (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002). Os SSRs ganharam importância na genética de plantas devido à sua alta variabilidade, natureza multialélica, herança codominante, reprodutibilidade, abundância relativa e uma ampla cobertura genômica (incluindo genomas organelares). Apresentam ainda capacidade de automação e genotipagem de alto rendimento (PARIDA *et al.*, 2008).

Os SSRs também podem ser utilizados para a identificação de híbridos através da identificação do fluxo gênico entre populações e da estruturação genética esperada em cada espécie. Associado a análises estatísticas específicas, também podem identificar a capacidade reprodutiva do híbrido através da identificação dos híbridos de primeira ou segunda geração, bem como o processo de introgressão com as linhagens parentais (MOTA *et al.*, 2019).

Tarnowski *et al.* (2021) utilizou um marcador morfológico baseado em características foliares, perfis proteicos por UTLIEF e o marcador molecular microssatélite CMBR22 para estimar sementes híbridas a partir do cruzamento de duas espécies de cucurbitáceas (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*). Marcadores SSR também foram utilizados para determinar a pureza genética e diversidade de 19 linhagens parentais e híbridas de milho (FERNANDEZ *et al.*, 2023). Outros estudos como o realizado por Zhenshan *et al.* (2022) através de um conjunto de cinco marcadores SSR identificaram 1.081 de 1.122 indivíduos de três populações F1 cruzadas de cerejeira chinesa (*Cerasus pseudocerasus* (Lindl.) G.Don).

2.4 A TRIBO CAESALPINIEAE (Caesalpinioideae, Leguminosae)

A família Leguminosae apresenta aproximadamente 770 gêneros e 19.500 espécies, sendo a terceira maior família de angiospermas em número de espécies, atrás apenas das famílias Asteraceae e Orchidaceae, e a segunda maior família de importância econômica, atrás apenas da família Poaceae (LPWG, 2017). Na Caatinga, as leguminosas são a família com o maior número de espécies endêmicas (80 espécies), seguida por Cactaceae (41 espécies) (QUEIROZ, 2002). Dentre as subfamílias de Leguminosae, Caesalpinioideae é a segunda maior em número de espécies, apresentando uma grande variação morfológica e ecológica (LPWG, 2017).

A tribo Caesalpinieae (Bruneau *et al.*, 2024) é conhecida dentro desta subfamília devido à sua heterogeneidade morfológica vinculada a uma conservação de nicho (GAGNON *et al.*, 2019). Apresentando hábito arbóreo, arbustivo, herbáceo ou lianas, o grupo Caesalpinia possui uma grande quantidade de homoplasias e convergências morfológicas, fatores que dificultam a determinação de caracteres diagnósticos únicos para cada clado (GAGNON *et al.*, 2016; GAGNON *et al.*, 2019). Atualmente o grupo é composto por 27 gêneros monofiléticos e cerca de 225 espécies, sendo amplamente distribuídos no mundo. Embora não se tenham claras sinapomorfias morfológicas para alguns clados, ele pode ser reconhecido através de uma combinação de características, como a presença de folhas bipinadas, tricomas glandulares,

espinhos ou acúleos, flores zigomorfas com uma sépala inferior um tanto modificada, androceu dialistêmone envolvendo o pistilo e hipanto presente. As flores variam muito (simetria, cor, tipo de inflorescência, podendo ser unissexuais ou bissexuais) e podem ser fortemente modificadas, dependendo do sistema de polinização. Os frutos são extremamente diversos, refletindo uma impressionante variação nas adaptações de dispersão de sementes (GAGNON *et al.*, 2016). Quatro gêneros ocorrem de forma natural no Nordeste do Brasil: *Erythrostemon* (1 sp.), *Cenostigma* (7 spp.), *Libidibia* (1 sp.) e *Paubrasilia* (1 sp.) (VAN-LUME, 2019).

Apesar da variação morfológica, o grupo é caracterizado por possuir um cariótipo numericamente estável com $2n = 24$ (VAN-LUME, 2019). Ao longo do tempo, o grupo vem sendo alvo de diversos estudos a fim de caracterizar os eventos envolvidos na evolução do genoma a partir de um viés filogenético, bem como sua interação com o ambiente (SOUZA *et al.*, 2019; VAN-LUME *et al.*, 2019; MATA-SUCRE *et al.*, 2020; CASTRO *et al.*, 2023).

2.4.1 O gênero *Cenostigma*

Cenostigma se caracteriza principalmente pelo seu legume lenhoso com uma margem conspícua e grossa, folha pinada ou bipinada, ritidoma cinza; flores com pedicelo articulado, monoclina, zigomorfa, hipanto presente, androceu dialistêmone, estames homodínamos e anteras rimosas (QUEIROZ, 2014). Além disso, essas espécies têm cavidades secretoras internas no folíolo, bem como um indumento estrelado nas hastes, folhas e/ou inflorescências, considerados caracteres diagnósticos do gênero (GAGNON *et al.*, 2016). Possuindo 20 taxa em 14 espécies, apresenta uma distribuição neotropical, ocupando, no Brasil, diferentes domínios, como o Cerrado, a Mata Atlântica, a Floresta Amazônica e a Caatinga. No Nordeste brasileiro é altamente diverso, com várias espécies ocorrendo em simpatria (GAGNON *et al.*, 2016).

Através da utilização de cinco regiões plastidiais (*rps16*, *trnD-trnT*, *ycf6-psbM*, *matK-3'-trnK intron*, e *trnL-trnF*) e uma região ribossomal espaçadora (ITS1-5.8S-ITS2), Gagnon *et al.* (2016) observaram que espécies de *Cenostigma* e várias espécies de *Poincianella* (clado B) formavam um único clado. Essas espécies também compartilhavam características antes observadas apenas no gênero *Cenostigma* (folhas pinadas em *Caesalpinia marginata* e *Caesalpinia pinnata*). Além disso, outras espécies pertencentes ao clado B de *Poincianella* possuem cavidades secretoras nos foliólulos e inflorescências, bem como indumento estrelado nos caules, folhas e/ou inflorescências, ambos considerados caracteres diagnósticos de *Cenostigma*. Tais características

foliares estão ausentes no grupo *Poincianella-Erythrostemon*. Adicionalmente, as espécies de *Cenostigma* e *Poincianella* B possuem frutos robustos com margens espessadas, característica essa que não foi observada nas outras espécies do grupo *Poincianella-Erythrostemon*, o que forneceu uma sinapomorfia diagnóstica para o grupo *Cenostigma-Poincianella* B, com as espécies reclassificadas como *Cenostigma*. Apesar da reclassificação recente, as relações entre as espécies ainda não estão esclarecidas, apresentando baixos suportes e diversas incongruências, com a possibilidade de alguns nomes corresponderem a grupos não monofiléticos (GAGNON *et al.*, 2016). Mais recentemente, Castro *et al.* (2023) em suas análises, revelou *Cenostigma* como um grupo monofilético, tal qual foi teorizado por Gagnon *et al.* (2016). As espécies analisadas, dentre elas *C. laxiflorum*, *C. microphyllum* e *C. pyramidale*, foram subdivididas em três subclados principais e embora algumas espécies sejam filogeneticamente distantes, como é o caso das espécies citadas acima, todas apresentaram similaridade cariotípica (CASTRO *et al.*, 2023).

Em estudos morfológicos anteriores, Lewis (1995), a partir da observação de exsicatas, percebeu que alguns espécimes apresentavam características intermediárias entre *C. laxiflorum* e *C. microphyllum*. Embora mais morfológicamente similares a *C. laxiflorum*, estes indivíduos apresentavam folhas pequenas com um número maior de pinas (quatro pares mais um terminal) e uma maior quantidade de foliólulos (até 15 por pina) similar ao que pode ser observado em indivíduos de *C. microphyllum*. Também foi observado indivíduos com características intermediárias entre *C. laxiflorum* e *C. pluviosum* var. *peltophoroides*, neste caso, os foliólulos eram menores do que habitualmente encontrado em *C. laxiflorum*, porém maiores do que é esperado para *C. pluviosum* var. *peltophoroides*. Ambos os casos ocorreram em locais onde as espécies citadas ocorrem em simpatria, indicando possíveis eventos de hibridização dentro do gênero. Embora Aecyo *et al.*, (2024) tenha confirmado a hibridização entre *C. microphyllum* e *C. pyramidale*, a existência dos híbridos envolvendo *C. laxiflorum* não foi investigada e o grau de permeabilidade nas barreiras reprodutivas das espécies desse gênero não foi testada.

2.4.2 *Cenostigma laxiflorum* e *C. microphyllum*

Sendo endêmica da região Nordeste, *Cenostigma laxiflorum* tem ocorrência nos estados da Bahia e de Pernambuco (GAEM, 2023), podendo ser encontrada em áreas abertas de Caatinga como também em regiões antropizadas. Seu período de floração ocorre durante praticamente o ano todo, podendo encontrar frutos nos meses de fevereiro, abril, junho e setembro (OLIVEIRA

et al., 2023). *Cenostigma laxiflorum* é conhecida como “catinga-de-rato”, se caracteriza por apresentar tronco cilíndrico na cor cinza, filotaxia alterna dística, folha composta, bipinada com 3-5 folíolos opostos e 5-6 foliólulos alternos, flor amarela, zigomorfa, androceu dialistêmone com 10 estames, fruto legume deiscente com semente oboval, plana e testa lisa (QUEIROZ, 2018). Essa espécie foi inicialmente classificada como *Poincianella laxiflora* (Tul.) L. P. Queiroz (GAGNON, 2016).

A espécie é caracterizada por ser um arbusto de hábito perene cujo caule principal possui uma espessura de 2-12 cm de diâmetro, hastes glabras ou pubescentes, folhas bipinadas com idioblastos subepidêrmicos. Sua inflorescência do tipo racemo pode possuir entre 20-35 flores, apresentando uma corola na cor amarela e a pétala estandarte na cor laranja.

Cenostigma microphyllum também é endêmica do Nordeste, mas tem uma abrangência muito maior, podendo ser encontrada nos estados de Alagoas, Bahia, Maranhão, Pernambuco, Piauí e Sergipe; na Bahia, ocorre principalmente na região do Baixo-Médio São Francisco. Sua floração ocorre de junho a fevereiro, podendo ser encontrada frutos durante a maior parte do ano (GAEM, 2023). É facilmente reconhecida pela combinação de folhas bipinadas com foliólulos numerosos (13-24), pequenos e assimétricos, além da presença de tricomas glandulares nas folhas e inflorescências, dando aspecto pegajoso às plantas (QUEIROZ, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2023).

Apesar de não haver estudos mais detalhados sobre a biologia reprodutiva das espécies citadas acima, já foi observada a presença de pólen de *Cenostigma microphyllum* em abelhas do gênero *Apis* (Apidae), da mesma família de *Xylocopa* (NOVAIS *et al.*, 2010) a qual foi identificada como polinizadora de *C. pyramidale* (LEITE; MACHADO, 2023).

3 REFERÊNCIAS

- AECYO, P. *et al.* Integrative evidence on the hybridization between *Cenostigma microphyllum* and *C. pyramidale* (Leguminosae) in the Caatinga dry forest. **Plant Biology**, [S.L.], 2024.
- ABBOTT, R. *et al.* Hybridization and speciation. **Journal Of Evolutionary Biology**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 229-246, 2013.
- ABBOTT, Richard J. Plant speciation across environmental gradients and the occurrence and nature of hybrid zones. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 55, n. 4, p. 238-258, 2017.

- BOBIK, Krzysztof; BURCH-SMITH, Tessa Maureen. Chloroplast signaling within, between and beyond cells. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 6, p.1-26, 2015.
- BOOKSTEIN, FL. **Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology**. Cambridge University Press; 1992.
- Bruneau *et al.* Advances in Legume Systematics 14. Classification of Caesalpinioideae. Part 2: Higher-level classification. **Phytokeys**, [S.L.], 2024.
- CASTRO, Natália *et al.* Genomic stability in *Cenostigma Tul.*, (Caesalpinioideae, Fabaceae): causes and consequences. **Botanical Journal Of The Linnean Society**. [S.L.], p. 1-15, 2023.
- CUNHA, Daniel de Noronha Figueiredo Vieira da *et al.* Morphometric and biomass accumulation in small forage cactus grow under nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 13, n. 4, p. 1157-1165, 2012.
- DANIELL, Henry *et al.* Complete chloroplast genome sequences of *Solanum bulbocastanum*, *Solanum lycopersicum* and comparative analyses with other Solanaceae genomes. **Theoretical And Applied Genetics**, [S.L.], v. 112, n. 8, p.1503-1518, 2006.
- DRYDEN, I.; MARDIA, K.V. **Statistical Shape Analysis**. John Wiley Sons, 1998.
- FERNANDEZ, E.C.J. *et al.* GENETIC PURITY AND DIVERSITY ASSESSMENT OF PARENTAL CORN INBRED LINES USING SSR MARKERS FOR PHILIPPINE HYBRID BREEDING. **Sabrao Journal Of Breeding And Genetics**, [S.L.], v. 55, n. 3, p. 598-608, 2023. Society for the Advancement of Breeding Research in Asia and Oceania.
- GAEM, P.H. **Cenostigma**. Flora do Brasil. 2023. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/consulta/ficha.html?idDadosListaBrasil=78635>. Acesso em: 07 jan. 2023.
- GAGNON, Edeline *et al.* A new generic system for the pantropical Caesalpinia group (Leguminosae). **Phytokeys**, [S.L.], v. 71, p. 1-160, 2016.
- GAGNON, Edeline *et al.* Global Succulent Biome phylogenetic conservatism across the pantropical Caesalpinia Group (Leguminosae). **New Phytologist**, [S.L.], v. 222, n. 4, p. 1994-2008, 2019.
- GOMPERT, Zachariah; MANDEVILLE, Elizabeth G.; BUERKLE, C. Alex. Analysis of Population Genomic Data from Hybrid Zones. **Annual Review Of Ecology, Evolution, And Systematics**, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 207-229, 2017.
- GUALBERTO, José M. *et al.* The plant mitochondrial genome: Dynamics and maintenance. **Biochimie**, [S.L.], v. 100, p.107-120, 2014.

- HESLOP-HARRISON, J. S. (Pat); SCHWARZACHER, Trude. Organisation of the plant genome in chromosomes. **The Plant Journal**, [S.L.], v. 66, n. 1, p. 18-33, 2011.
- LANGDON, Quinn K. *et al.* Postglacial migration shaped the genomic diversity and global distribution of the wild ancestor of lager-brewing hybrids. **Plos Genetics**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 1-14, 2020.
- LAMICHHANEY, Sangeet *et al.* Rapid hybrid speciation in Darwin's finches. **Science**, [S.L.], v. 359, n. 6372, p. 224-228, 2018.
- LEITE, Ana Virgínia, MACHADO, Isabel Cristina. Biologia reprodutiva da "catingueira" (*Caesalpinia pyramidalis* Tul., Leguminosae-Caesalpinioideae), uma espécie endêmica da Caatinga. **Revista Brasileira Botânica**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 79-88, 2009.
- LEWIS, Gwilym Peter. SYSTEMATIC STUDIES IN NEOTROPICAL 'CAESALPINA L.' (LEGUMINOSAE: caesalpinioideae), including a revision of the 'poinchianella-erythrostemon' group. 1995. 354 f. Tese (Doutorado) - Faculty of Science, University Of St Andrews, [S.L.], 1995.
- LIU, Yang *et al.* 350 My of Mitochondrial Genome Stasis in Mosses, an Early Land Plant Lineage. **Molecular Biology And Evolution**, [S.L.], v. 31, n. 10, p. 2586-2591, 2014.
- LIU, Zhenshan *et al.* Development and Cross-Species Transferability of Novel Genomic-SSR Markers and Their Utility in Hybrid Identification and Trait Association Analysis in Chinese Cherry. **Horticulturae**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 222, 2022.
- LÓPEZ-CAAMAL, Alfredo; TOVAR-SÁNCHEZ, Efraín. Genetic, morphological, and chemical patterns of plant hybridization. **Revista Chilena de História Natural**, [S.L.], v. 87, n. 16, p. 1-14, 2014.
- MALLET, James. Hybridization as an invasion of the genome. **Trends In Ecology & Evolution**, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 229-237, 2005.
- MATA-SUCRE, Yennifer *et al.* Revisiting the cytomolecular evolution of the *Caesalpinia* group (Leguminosae): a broad sampling reveals new correlations between cytogenetic and environmental variables. **Plant Systematics And Evolution**, [S.L.], v. 306, n. 2, p. 1-13, 2020.
- MAYR, Ernst. **Systematics and the Origin of Species**. New York: Columbia Univ. Press, 1942.
- MORAN, Benjamin M. *et al.* The genomic consequences of hybridization. **Elife**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-33, 2021.

- MOTA, M. R. *et al.* The role of hybridization and introgression in maintaining species integrity and cohesion in naturally isolated inselberg bromeliad populations. **Plant Biology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 122-132, 2019.
- MUNIZ, André Carneiro *et al.* The protected tree *Dimorphandra wilsonii* (Fabaceae) is a population of inter-specific hybrids: recommendations for conservation in the brazilian cerrado/atlantic forest ecotone. **Annals of Botany**, [S.L.], v. 126, n. 1, p. 191-203, 2020.
- NOVAIS, Jailson Santos de *et al.* Bee pollen loads and their use in indicating flowering in the Caatinga region of Brazil. **Journal Of Arid Environments**, [S.L.], v. 74, n. 10, p. 1355-1358, 2010.
- PARIDA, Swarup K. *et al.* Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. **Theoretical And Applied Genetics**, [S.L.], v. 118, n. 2, p.327-338, 2008.
- PEASE, James B. *et al.* Molecular mechanisms of postmating prezygotic reproductive isolation uncovered by transcriptome analysis. **Molecular Ecology**, [S.L.], v. 25, n. 11, p. 2592-2608, 2016.
- QUEIROZ, Kevin de. Ernst Mayr and the modern concept of species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 102, n. 1, p. 6600-6607, 2005.
- QUEIROZ, Rubens Teixeira de. **Plantas do Brasil**. 2018. Disponível em: <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com/search?q=cenostigma+laxiflorum>. Acesso em: 03 ago. 2022.
- RIESEBERG, L. H. *et al.* What Can Molecular and Morphological Markers Tell Us About Plant Hybridization? **Critical Reviews In Plant Sciences**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 213-241,1993.
- SANTOS, Daniela Fonseca dos; PEZZUTI, Tiago; GARCIA, Paulo Christiano de Anchieta Garcia. A morfometria geométrica como ferramenta para distinguir espécies de *Pithecopus* através das formas larvais. In: ANAIS DO I SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MORFOLOGIA COMPARADA DE VERTEBRADOS, 2021, Brasília. Anais eletrônicos. Campinas, Galoá, 2021. Disponível em:<<https://proceedings.science/simorf-2021/trabalhos/a-morfometria-geometrica-como-ferramenta-para-distinguir-especies-de-pithecopus?lang=pt-br>> Acesso em: 09 jan. 2024.
- SOUZA, Gustavo *et al.* Do tropical plants have smaller genomes? Correlation between genome size and climatic variables in the Caesalpinia Group (Caesalpinioideae, Leguminosae). **Perspectives In Plant Ecology, Evolution And Systematics**, [S.L.], v. 38, p. 13-23, 2019.

- SVARDAL, Hannes *et al.* Ancient hybridization and strong adaptation to viruses across African vervet monkey populations. **Nature Genetics**, [S.L.], v. 49, n. 12, p. 1705-1713, 2017.
- TARNOWSKI C.G. *et al.* Use of morphological, biochemical and molecular markers for early identification of an interspecific cucurbit hybrid (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*). **Horticultura Argentina**, [s. l.], v. 104, n. 41, p. 84-94, 2021.
- TAYLOR, Scott A. *et al.* Insights from genomes into the evolutionary importance and prevalence of hybridization in nature. **Nature Ecology & Evolution**. [S.L.], p. 170-177. 2019.
- THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, [S.L.], v. 141, p.399-436, 2003.
- THE LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP. A New Subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **TAXON**, [s.l.], v.66, n.1, p.44-77, 2017.
- VAN-LUME, Brena *et al.* Evolutionary convergence or homology? Comparative cytogenomics of Caesalpinia group species (Leguminosae) reveals diversification in the pericentromeric heterochromatic composition. **Planta**, [S.L.], v. 250, n. 6, p. 2173-2186, 2019.
- VON RONN, Jan A.C. *et al.* Disruptive selection without genome-wide evolution across a migratory divide. **Molecular Ecology**, [S.L.], v. 25, p. 2529-2541, nov. 2016.
- VONHOLDT, Bridgett M. *et al.* Whole-genome sequence analysis shows that two endemic species of North American wolf are admixtures of the coyote and gray wolf. **Science Advances**, [S.L.], v. 2, n. 7, p. 1-13, 2016.
- WALTERS, James L. Distribution of Structural Hybrids in *Paeonia californica*. **American Journal Of Botany**. [S.L.], p. 270-275. 1942.
- WAMBUGU, Peterson W. *et al.* Relationships of wild and domesticated rices (*Oryza* AA genome species) based upon whole chloroplast genome sequences. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 13957, p.01-09, 2015.
- WU, Zhi-Qiang *et al.* Genomic architectural variation of plant mitochondria: a review of multichromosomal structuring. **Journal of Systematics and Evolution**. [S.L.], p. 160-1168. 2020.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. MICROSATELLITE ISOLATION: A REVIEW Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, [S.L.], v. 11, p.1-16, 2002.

CAPÍTULO I

Artigo a ser submetido à revista *PLANTA*.

O papel da hibridização natural na complexidade sistemática de *Cenostigma* (Leguminosae): fluxo gênico entre *C. laxiflorum* e *C. microphyllum* revelado por SSRs e morfometria

Ana Silva^a, Uedson Pereira Jacobina^b, Paulo Aecyo^c, Gustavo Souza^a, Andrea Pedrosa-Harand^{a*}

^a Laboratório de Citogenética e Evolução vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

^b Laboratório de Sistemática Integrativa Molecular, Campus-Penedo/ Universidade Federal de Alagoas, Avenida Beira Rio s/n, Penedo CEP 57200-000, Alagoas, Brasil

^c Laboratório de Ecologia Evolutiva e Genômica de Plantas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente: Laboratório de Citogenética e Evolução vegetal, Departamento de Botânica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brasil. Informações de contato: andrea.harand@ufpe.br; telefone +55 81 2126 8846

RESUMO

Embora espécies geralmente representem linhagens distintas que não cruzam entre si, eventos de hibridização podem contribuir para a especiação e adaptação de espécies, embora torne complexa sua taxonomia. O gênero *Cenostigma* apresenta baixa resolução filogenética provavelmente devido à sua origem recente e ocorrência de híbridos. Em estudos anteriores, foram reportados indivíduos com morfologia intermediária entre *C. laxiflorum* e *C. microphyllum*, sugerindo a ocorrência de fluxo gênico interespecífico. O objetivo deste trabalho foi investigar a abrangência dos eventos de hibridização no gênero, testando a ocorrência de híbridos naturais entre *C. laxiflorum* e *C. microphyllum*. Foram coletados de dois a 14 indivíduos de sete populações em áreas de distribuição natural dessas espécies. Análises morfométricas e moleculares de locos plastidiais (cpSSR) e nucleares (nuSSR) de microssatélites foram realizadas. A análise morfométrica revelou ampla plasticidade nos tamanhos dos folíolos dentro e entre espécies. A

análise dos locos cpSSR definiram nove haplótipos que apresentaram uma estruturação geográfica compatível a das populações analisadas, sugerindo haplótipos espécie-específicos. Os locos nuSSR revelaram estruturação das populações em dois grupos genéticos, relativos às duas espécies. No entanto, indivíduos geneticamente híbridos foram observados em populações simpátricas e alopátricas. Isso sugere que os eventos de hibridização podem ser mais frequentes do que se estimava no gênero *Cenostigma*, contribuindo para a sua complexidade morfológica e filogenética.

Palavras-chave: Catingueira, estruturação genética, haplótipos, híbridos, introgressão, microssatélites

INTRODUÇÃO

Híbridos são organismos que surgem a partir do cruzamento de duas linhagens distintas e podem ou não ser férteis e cruzar entre si e com seus parentais (SOLTIS; SOLTIS, 2009; MOTA *et al.*, 2019; MUNIZ *et al.*, 2020). A hibridização natural é um fenômeno frequente entre as plantas (MALLETT *et al.*, 2005; LANGDON *et al.*, 2020) e um importante processo evolutivo, podendo, como consequências: (i) ter um efeito neutro na dinâmica evolutiva das linhagens; (ii) levar à extinção de linhagens, a partir de processos como “*genetic swamping*” e “*speciation reversal*”; ou ainda (iii) provocar um incremento da diversidade genética das populações envolvidas, introgregando loci que possam ser adaptativos, e propiciando o surgimento de novas linhagens e espécies (SCHLEY *et al.*, 2022). Devido aos diversos resultados advindos de eventos de hibridização, identificar os indivíduos híbridos e sua amplitude geográfica (i.e. zona de hibridização entre as espécies parentais) é de grande importância (LÓPEZ-CAAMAL; TOVAR-SÁNCHEZ, 2014). Com base em diferentes estratégias, é possível atuar na delimitação e conservação de linhagens de espécies distintas sob fluxo gênico (GOMPERT; MANDEVILLE; BUERKLE, 2017).

A hibridização é particularmente pronunciada em angiospermas e samambaias (SOLTIS; SOLTIS, 2009). Identificar indivíduos híbridos é um importante passo para a elucidação das relações filogenéticas de um grupo, visto que, devido ao padrão de herança dos caracteres fenotípicos, muitas vezes esses indivíduos podem apresentar uma morfologia intermediária e serem erroneamente classificados como pertencente a um ou o outro parental, resultando numa

taxonomia complexa (BURGARELLA *et al.*, 2009; ROBBINS *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2022). Além disso, dependendo do nível de fertilidade do híbrido e da taxa de retrocruzamento, pode haver a introgressão de regiões genômicas (ou genomas inteiros, no caso de cloroplastos e mitocôndrias). Desta forma, este processo tem como consequência uma baixa resolução filogenética e a dificuldade na diferenciação morfológica de parentais e híbridos (SOUZA *et al.*, 2019).

A tribo Caesalpinieae (Caesalpinioideae, Leguminosae) é um clado pantropical que abriga cerca de 205 espécies (GAGNON *et al.*, 2016; BRUNEAU *et al.*, 2024). Esse grupo vem sendo alvo de diversos estudos taxonômicos, filogenéticos (GAGNON *et al.*, 2016; GAGNON *et al.*, 2019) e citogenéticos (VAN-LUME *et al.*, 2017, VAN-LUME *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2019 MATA-SUCRE *et al.*, 2020), buscando delimitar o relacionamento em nível intra e inter genérico. Dentro desta tribo se encontra o gênero *Cenostigma* (Tul.), constituído de árvores e arbustos nativo da região Neotropical. O gênero é composto por 14 espécies distribuídas em diferentes regiões de florestas tropicais sazonalmente secas (sigla em inglês SDFT), principalmente na Caatinga, que concentra a maior parte da sua diversidade (GAGNON *et al.*, 2019), o que dá a várias espécies do gênero o nome popular de “catingueira” (LEWIS, 1995; LEITE; MACHADO, 2009). Caracterizam-se por apresentar estípulas caducas ou persistentes, folhas pinada ou bipinadas, inflorescência do tipo racemo ou panícula, flores com pedicelo articulado, zigomorfa, monoclina, hipógina, filetes longos, antera rimosa e legume típico com valvas lignosas (QUEIROZ, 2018). Dentro da tribo Caesalpinieae, o gênero *Cenostigma* apresenta as maiores complexidades taxonômicas, com difícil delimitação de algumas espécies e baixa resolução filogenética (GAGNON *et al.*, 2016; AECYO *et al.*, 2021). Essa baixa resolução filogenética pode estar relacionada à formação de híbridos.

Aecyo *et al.* (2024), através do uso de marcadores microssatélites cloroplastidiais e nucleares, e incorporando aos dados moleculares análises morfométricas e metabolômicas, reportou fluxo gênico entre as espécies *Cenostigma microphyllum* (Mart. ex G. Don) E. Gagnon & G. P. Lewis e *C. pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P.Lewis. Ambas as espécies apresentam uma distribuição em áreas cristalinas e sedimentares e co-ocorreram em diferentes tipos de solo, altitudes e regimes de pluviosidade. Sendo assim, foi demonstrado pela primeira vez fluxo gênico interespecífico entre espécies do gênero *Cenostigma*.

No entanto, ainda há dúvidas se há e qual o nível de hibridização entre outras espécies do gênero. Os estudos morfológicos de Lewis (1995), por exemplo, propuseram indivíduos morfológicamente intermediários entre *C. laxiflorum* (Tul.) E. Gagnon & G.P.Lewis com duas outras espécies do gênero: *C. microphyllum* e *C. pluviosum* var. *peltophoroides*. Essa possível hibridização foi identificada nos locais onde as mesmas ocorrem em simpatria. Além dos mais, Castro *et al.* (2023) identificaram uma alta estabilidade na fração repetitiva dos genomas de espécies do gênero *Cenostigma*, o que teoricamente poderia facilitar o fluxo gênico interespecífico natural e a viabilidade de híbridos por meio do pareamento de cromossomos homólogos com composições de DNA similares.

Sendo assim, este trabalho buscou investigar a existência de fluxo gênico natural entre outras espécies de *Cenostigma* com relatos de morfologia intermediária, trazendo *insights* sobre o papel desses eventos para a diversificação do gênero. Mais especificamente, testamos a hipótese de Lewis (1995) de hibridização entre *Cenostigma laxiflorum* e *C. microphyllum*. Embora o autor também tenha sugerido a hibridização entre *C. laxiflorum* e *C. pluviosum* var. *peltophoroides*, *C. pluviosum* é altamente complexa do ponto de vista morfológico, sendo reconhecidas sete variedades de difícil delimitação (GAGNON *et al.*, 2016). Além disso, seu longo histórico de cultivo como planta ornamental torna difícil a interpretação de padrões biogeográficos. Por fim, diferentes análises filogenéticas revelaram que essa espécie não é monofilética (GAGNON *et al.*, 2016), sendo necessários estudos futuros para definir a sua circunscrição. Dessa forma, nós coletamos populações naturais simpátricas e alopátricas de *C. laxiflorum* e *C. microphyllum*, tendo como objetivos: (i) testar a existência de fenótipos intermediários entre indivíduos de populações naturais de *C. laxiflorum* e *C. microphyllum* por meio de análises morfométricas; (ii) genotipar os mesmos indivíduos utilizando locos nucleares e plastidiais SSR polimórficos previamente utilizados no gênero; (iii) identificar se há fluxo gênico entre as espécies *C. laxiflorum* e *C. microphyllum* e qual o nível de hibridização e introgressão; (iv) discutir o impacto que a hibridização na complexidade filogenética e taxonômica no gênero *Cenostigma*.

METODOLOGIA

COLETA

Foram coletadas folhas jovens de 65 indivíduos distribuídos em sete populações naturais de *Cenostigma laxiflorum* e *C. microphyllum* na região descrita por Lewis (1995) como de

ocorrência de possíveis híbridos entre Pernambuco e Bahia (Tabela 1, Figura 1). As folhas dos indivíduos coletadas foram dissecadas e armazenadas em sílica gel. Também foi coletado um ramo, de preferência fértil, de cada indivíduo para posterior herborização e análises morfométricas.

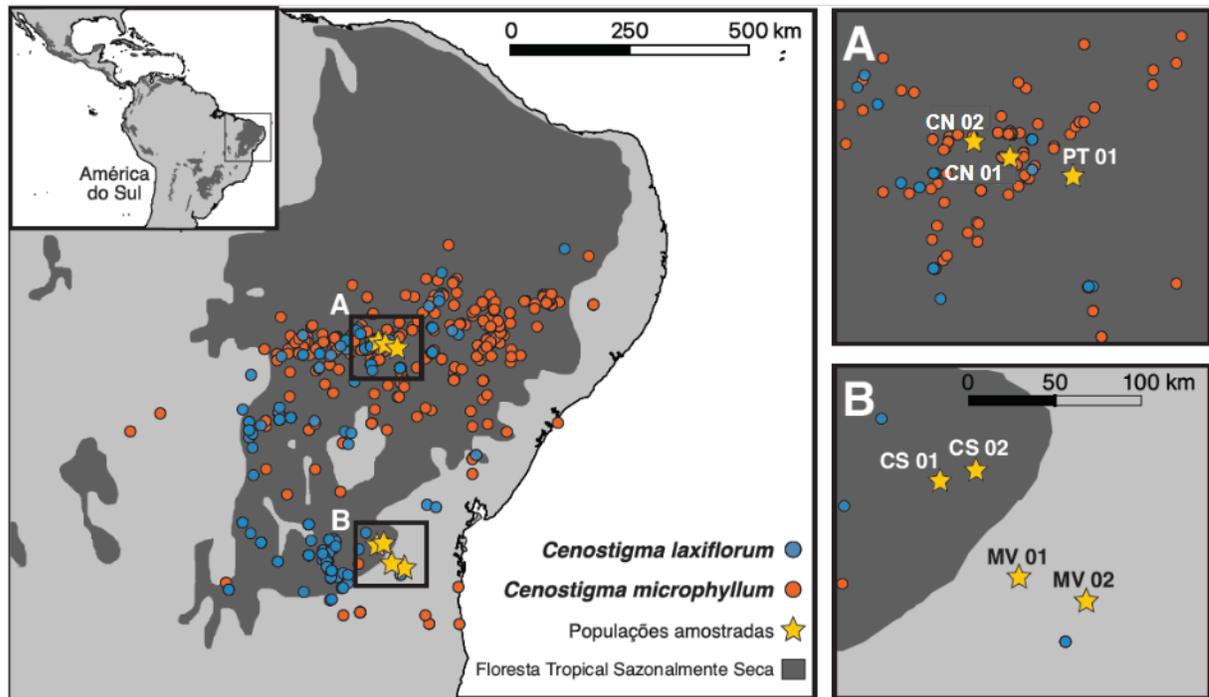


Figura 1. Distribuição geográfica das espécies *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum* de acordo com dados disponíveis no Gbif.org, assim como as populações coletadas para o presente trabalho em áreas ao norte (A) e ao sul (B) de sua distribuição.

Tabela 1. Populações alopatricas e simpátricas de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum* amostradas

Pop.	Espécies	N	Município	Longitude	Latitude
CS-01	<i>C. laxiflorum</i>	14	Contendas do Sincorá-BA	W -40.8596	S -13.6493
CS-02	<i>C. laxiflorum</i>	7	Contendas do Sincorá-BA	W -40.6911	S -13.5603

MV-01	<i>C. laxiflorum</i>	11	Manoel Vitorino-BA	W -40.5345	S -14.0305
MV-02	<i>C. laxiflorum</i>	5	Manoel Vitorino-BA	W -40.25476	S -14.15919
CN-01	<i>C. laxiflorum</i> / <i>C. microphyllum</i>	9	Casa Nova-BA	W -40.8664	S -9.2238
CN-02	<i>C. laxiflorum</i> / <i>C. microphyllum</i>	14	Casa Nova-BA	W -40.9971	S -9.1761
PT-01	<i>C. microphyllum</i>	5	Petrolina-PE	W -40.6064	S -9.3618

EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO DE MARCADORES SSR E GENOTIPAGEM

O DNA genômico total foi extraído a partir de folhas jovens armazenadas em sílica utilizando o Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN) como também utilizando o método de CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio), de acordo com o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1995). O DNA foi analisado quanto à sua integridade em gel de agarose 1% e quantificado em NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific). Inicialmente, foi testada, numa subamostra de oito indivíduos de diferentes populações coletadas de *Cenostigma laxiflorum* para testar a amplificação heteróloga e polimorfismo de quatro locos plastidiais universais (cpSSR) previamente desenvolvidos para *Nicotiana tabacum* (WEISING; GARDNER, 1999) e *Eucalyptus globulus* (STEANE *et al.*, 2005), assim como seis locos plastidiais e 11 nucleares desenvolvidos para *C. microphyllum* (AECYO *et al.*, 2021). As reações de PCR para os locos selecionados marcados diretamente seguiram o protocolo de Aecyo *et al.* (2021), sendo usado o protocolo adaptado de Schuelke (2000) para os locos com marcação indireta. O sucesso da amplificação foi

confirmado em gel de agarose 3%. Todas as amostras foram genotipadas automaticamente em um sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems). Os eletroferogramas foram analisados com o auxílio do software GeneMarker V.2.2.0.

DETECÇÃO DA DIVERSIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA COM OS LOCOS PLASTIDIAIS

Os dados da genotipagem, tanto dos locos cpSSR quanto nuSSR, foram organizados numa planilha utilizando o Excel Office 2022. O software Haplotype v.1.05 (ELIADES; ELIADES, 2009) foi utilizado para identificação do número total de haplótipos (H), haplótipos privados (P), número efetivo de haplótipos (N_e), suas frequências entre as populações e diversidade genética plastidial (H). A rede de haplótipos foi construída utilizando o software Network 10.2.0.0.

DETECÇÃO DA DIVERSIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICAS COM OS LOCOS NUCLEARES

O programa GeneAlex (PEAKALL; SMOUSE, 2012) foi utilizado para calcular a diversidade genética para cada loco e população. Foram calculados o número total de alelos (N_A), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E) e coeficiente de endogamia (F_{IS}), bem como os dados de F_{ST} par-a-par.

Para estimar a proporção de mistura entre *Cenostigma microphyllum* e *C. laxiflorum* por indivíduo, foi realizada uma análise de agrupamento Bayesiano no STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD *et al.*, 2000). Estimamos a proporção de mistura usando um *burn-in* de 250.000 e *run length* de 1.000.000 com o método Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Esta análise foi realizada variando o valor K de 1 a 8 clusters (Figura Suplementar 1), em seguida foi utilizada a plataforma online CLUMPAK (KOPELMAN *et al.*, 2015) para testar o ΔK de Evanno (EVANNO *et al.*, 2005). Classificamos cada indivíduo como puro ou híbrido com base no valor de q (proporção de mistura) atribuído pelo STRUCTURE, como em Mota *et al.* (2019). Os indivíduos foram classificados como híbridos quando apresentaram valor de q entre 0,10 e 0,90 ($0,10 < q < 0,90$).

ANÁLISE DE MORFOMETRIA GEOMÉTRICA

Todos os espécimes analisados (três foliólulos proximais para cada indivíduo, sendo um foliólulo da esquerda e da direita do folíolo esquerdo e o foliólulo esquerdo do folíolo da direita, com a face abaxial voltada para baixo) foram digitalizados em escala utilizando uma impressora multifuncional HP Deskjet 3776. As imagens foram analisadas usando o software Tpsutil (ROHLF, 2010a) e o software tpsDIG 1.40 TpsDig2 (ROHLF, 2010b). Foram escolhidas quatro marcas (parte apical superior e inferior de cada foliólulo, e a segunda e quarta inserção da veia do lado esquerdo), e outras quatro semi-marcas por meio de uma projeção perpendicular, com o objetivo de contornar simetricamente à margem da folha. As configurações de marcas e semi-marcas para cada perfil foram submetidas à Análise Procrustes Generalizada (GPA) (DRYDEN; MARDIA, 1998). Uma análise discriminante (DA) foi construída com base nos dados de morfometria, a fim de avaliar se os tamanhos dos folíolos permitem discriminar as espécies analisadas e seus possíveis híbridos. Além disso, fizemos uma análise de correlação e regressão bivariada entre os valores de centróide e os valores de q resultantes da análise do Structure. Essas análises foram realizadas com o software Past 4.11 (HAMMER *et al.*, 2001) e os resultados foram editados no CorelDRAW Graphics Suite 2023.

RESULTADOS

DIFERENCIAÇÃO MORFOMÉTRICA ENTRE *C. laxiflorum* E *C. microphyllum*

O principal carácter morfológico que diferencia as espécies *C. laxiflorum* e *C. microphyllum* é o tamanho dos foliólulos (QUEIROZ, 2018; Figura 2A). Sendo assim, foi estimada a medida do valor médio do centróide (distância do centro do foliólulo para as margens) para todos os indivíduos amostrados (Tabela Suplementar 1), revelando valores extremamente variáveis (Figura 2B). Devido a seus pequenos foliólulos, os valores de centróide foram menores nos indivíduos da população alopátrica de *C. microphyllum* coletada no presente trabalho (PT01), medindo em média 2,86 mm. Por outro lado, as populações morfológicamente alopátricas de *C. laxiflorum* (CS e MV) apresentaram foliólulos maiores (17,8 mm), mas com uma ampla variação (Figura 2C). As populações nas quais essas espécies aparentemente ocorrem em simpatria (CN) também apresentaram ampla variação nos valores de centróides, desde valores próximos a *C. microphyllum* até próximos a *C. laxiflorum*, condizente com a sua condição morfológicamente intermediária.

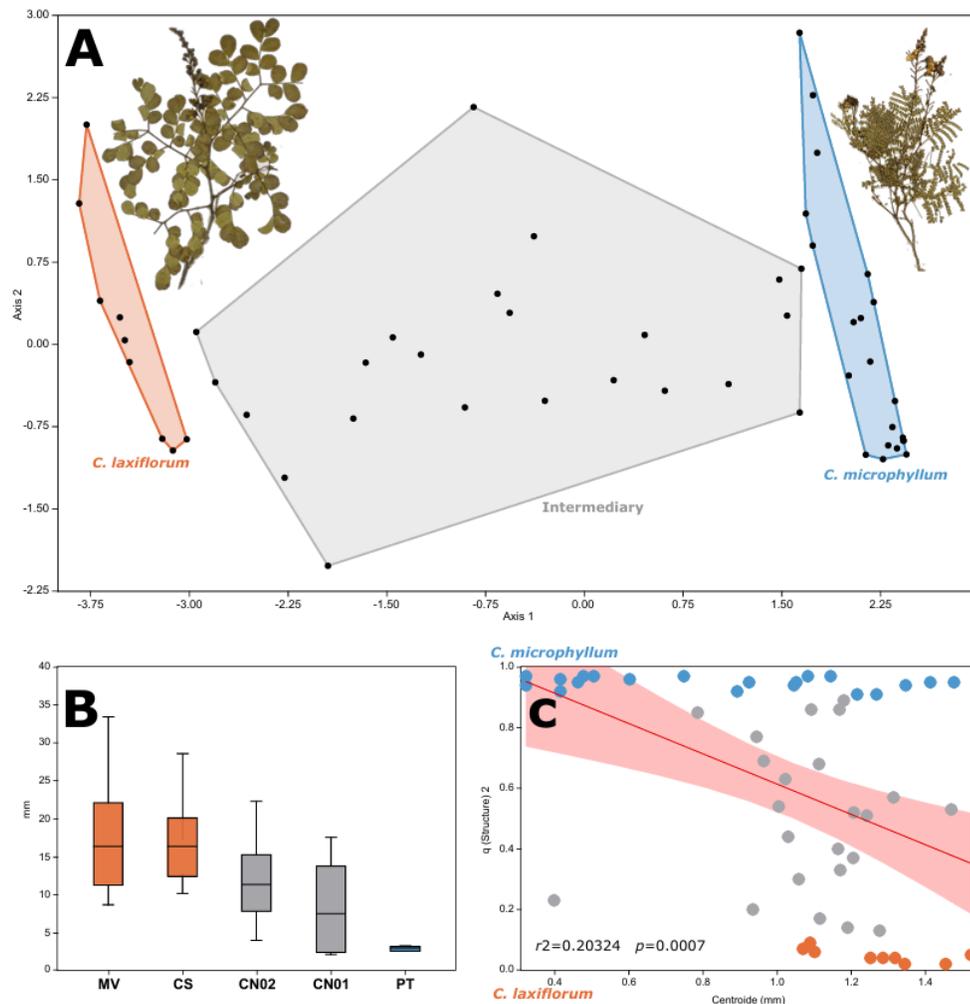


Figura 2. Análise discriminante das espécies analisadas (A). Plasticidade foliar encontrada a partir de valores de centróide obtidos nos indivíduos analisados de *Cenostigma laxiflorum* (MV, CS) e *Cenostigma microphyllum* (PT), assim em populações simpátricas entre as duas espécies (CN) (B). Relação entre o tamanho dos foliólulos e tamanho do centróide em indivíduos de *Cenostigma laxiflorum* (laranja) e *Cenostigma microphyllum* (azul), mostrando ampla variação em ambas as espécies e híbridos (C).

TRANSFERIBILIDADE DOS LOCOS MICROSSATÉLITES PARA *Cenostigma laxiflorum*

Os 10 locos plastidiais testados foram polimórficos na subamostra de *C. laxiflorum* e *C. microphyllum* do presente trabalho, com exceção do loco *cmp5*, que não amplificou no teste

inicial (Tabela 2). Os locos plastidiais *ccmp2*, *ccmp10*, *CmCPSSR4*, *CmCPSSR12* e *CmCPSSR15* apresentaram alelos em comum entre as populações de *C. microphyllum* do Catimbau analisadas por Aecyo *et al.* (2021) e as populações amostradas no presente estudo, ou dentro da faixa de variação de tamanho (*CmCPSSR8*, *CmCPSSR16*). Já os locos *EMCRC74* e *CmCPSSR7* apresentaram uma variação de 58-64 pb e 90 pb, respectivamente, entre as populações de *C. microphyllum* do Catimbau e a subamostra analisada, não sendo, por isso, considerados para as análises subsequentes.

Dos 11 locos nucleares testados, sete locos amplificaram na subamostra analisada (Tabela 2) e apresentaram polimorfismo entre os indivíduos genotipados, com 2 a 24 alelos de tamanho similar ao observado por Aecyo *et al.* 2024, com exceção dos locos *CmSSR3* e *CmSSR10* que não amplificaram no teste inicial e não foram testados novamente (Tabela 2). O loco *CmSSR2* apresentou 18 alelos, enquanto o estudo anterior encontrou cinco alelos. O loco *CmSSR9* foi o loco que apresentou maior polimorfismo com 22 alelos, seguido pelo loco *CmSSR6* com 21 alelos e pelos locos *CmSSR2* e *CmSSR4* com 18 alelos cada.

Tabela 2. Genotipagem de locos plastidiais e nucleares em *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum*. Os locos selecionados para genotipagem de todos os indivíduos coletados após testes de transferibilidade e polimorfismo em subamostra estão indicados em negrito

Genoma	Locos	Alelos de <i>C. microphyllum</i> do Catimbau (Aecyo et al., 2021)	Alelos observados na subamostra analisada	Alelos observados na genotipagem de todos os indivíduos	Referência dos locos analisados
Plastidial	ccmp2	<u>280</u> , 282, <u>287</u> , <u>288</u> , 338, 354	<u>273</u> , <u>280</u> , <u>287</u>	242, <u>273</u> , <u>280</u> , <u>287</u> , <u>288</u>	Weising; Gardner, 1999
	ccmp5	126, 127	*	-	Weising; Gardner,

					1999
	ccmp10	<u>122</u> , 123	<u>120</u> , <u>122</u>	120, <u>122</u>	Weising; Gardner, 1999
	EMCRC74	121, 122	180, 182, 186	-	Steane,2005
	CmCPSSR4	365, <u>366</u>	<u>366</u> , 367	-	Aecyo et al., 2021
	CmCPSSR7	189, 190	279	-	Aecyo et al., 2021
	CmCPSSR8	428, 429	<u>426</u> , <u>427</u>	425, <u>426</u> , <u>427</u>	Aecyo et al., 2021
	CmCPSSR1 2	125, <u>127</u> , 128	<u>126</u> , <u>127</u>	<u>126</u> , <u>127</u>	Aecyo et al., 2021
	CmCPSSR1 5	<u>229</u> , <u>230</u>	<u>228</u> , <u>229</u>	227, <u>228</u> , <u>229</u> , <u>230</u>	Aecyo et al., 2021
	CmCPSSR16	203, 204	206, 208, 210	-	Aecyo et al., 2021
Nuclear	CmSSR1	155, 158, 170, 176, 179	156, 171	156, 159, 171	Aecyo <i>et al.</i> ,2024
	CmSSR2	167, 170, 173, 185, 198	*	159 ,162, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 188, 190, 192,	Aecyo <i>et al.</i> ,2024

			193, 196, 199	
CmSSR3	315,335	*	-	<i>Aecyo et al.,2024</i>
CmSSR4	<u>160,177,179,</u> <u>185,187,189,</u> <u>191,193,195,</u> <u>197</u>	235,343, 361,367	151, 157, 159, 161, 176, <u>179,</u> 181, 182, 183, <u>185,</u> <u>187, 189,</u> <u>191, 193, 195</u>	<i>Aecyo et al.,2024</i>
CmSSR6	<u>163,167,169,</u> <u>171,172,173,</u> <u>174,175,176,</u> <u>177,178,179,</u> 180,183	163,168, 170,172,173	149, 151, 155, 160, 162, <u>163,</u> 164, 165, 166, <u>167,</u> 168, <u>169,</u> 170, <u>171,</u> <u>172, 173,</u> <u>174, 176,</u> 182, 187	<i>Aecyo et al.,2024</i>
CmSSR7	<u>163,167,169,</u> <u>171</u>	354,355	160, 165, <u>167, 169,</u> <u>171, 173, 174</u>	<i>Aecyo et al.,2024</i>
CmSSR8	<u>137,141,143,</u> 149	134	-	<i>Aecyo et al.,2024</i>
CmSSR9	<u>122,128,130,</u> <u>132,134,146</u>	124,129, 132,135	121, <u>122,</u> 123, 125,	<i>Aecyo et al.,2024</i>

			127, <u>128</u> ,	
			129, 130,	
			131, <u>132</u> ,	
			133, <u>134</u> ,	
			135, 136,	
			137, 138,	
			140, 142,	
			144, <u>146</u> , 148	
CmSSR10	223,224,226	*	-	Aecyo <i>et al.</i> ,2024
CmSSR11	128,129,150, 151	153,154	-	Aecyo <i>et al.</i> ,2024
CmSSR12	126, <u>130</u>	130,131,134	127, 131, 134, 135, 139	Aecyo <i>et al.</i> ,2024

* Não apresentaram amplificação; - Locos não amostrados para todos os indivíduos. Alelos sublinhados são comuns entre ambos os conjuntos amostrais.

ANÁLISE DE DIVERSIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA NUCLEAR ENTRE AS ESPÉCIES DE *Cenostigma*

Foram genotipados com sucesso 65 indivíduos amostrados em sete populações naturais de *Cenostigma laxiflorum* e *C. microphyllum* com os sete loci nuSSR selecionados (Tabela 2). A média da H_O dos locos variou de 0,190 para o loco CmSSR1 a 0,710 para o loco CmSSR4, enquanto a média de H_E observada foi de 0,196 no loco CmSSR1 a 0,821 no loco CmSSR9 (Tabela 3). Nenhum dos locos analisados estava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg considerando todas as populações das duas espécies em conjunto.

Tabela 3. Diversidade genética por loco nuSSR nas populações amostradas de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum*.

Locos	N	Na	Ne	H_O	H_E	F
CmSSR1	9,143	2,000	1,326	0,190	0,196	-0,045
CmSSR2	8,857	6,571	5,045	0,603	0,748	0,242
CmSSR4	9,000	6,714	4,416	0,710	0,751	0,046
CmSSR6	8,714	6,571	4,341	0,328	0,725	0,543
CmSSR7	6,571	4,286	3,342	0,531	0,676	0,185
CmSSR9	9,000	8,571	6,310	0,585	0,821	0,273
CmSSR12	9,143	3,000	1,996	0,390	0,355	-0,106

(**N**): número médios de indivíduos, (**Na**): Número médio de alelos, (**Ne**): número médio de alelos efetivos, (**H_O**): heterozigosidade média observada, (**H_E**): heterozigosidade média esperada e (**F**): média do índice de fixação.

Dos 86 alelos observados para os sete locos nucleares genotipados nas populações amostradas, 22 são privados, o que representa 25,58% do número total de alelos encontrados (Tabela 4). Os mesmos se encontram em uma frequência baixa variando de 0,036 - 0,200 (Tabela 4). O loco CmSSR6 apresentou o maior número de alelos privados (8), distribuídos entre todas as populações amostradas, com exceção da população MV02, seguido do loco CmSSR4, que apresentou seis alelos privados distribuídos entre as populações alopátricas de *Cenostigma laxiflorum* e *C. microphyllum* e a população de indivíduos intermediários CN02 de Casa Nova-BA. As populações com maior número de alelos privados foram MV01 e PT01, com cinco alelos cada, enquanto as demais tiveram os menores números, com três alelos cada.

Tabela 4. Frequência de alelos privados em sete locos nucleares utilizados nas populações amostradas de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum*

População	Loco	Alelo	Frequência alélica
CS01	CmSSR4	176	0,071
CS01	CmSSR6	187	0,036

CS01	CmSSR9	146	0,036
CS02	CmSSR4	182	0,071
CS02	CmSSR6	151	0,071
CS02	CmSSR9	130	0,071
MV01	CmSSR4	157	0,0111
MV01	CmSSR4	179	0,056
MV01	CmSSR6	155	0,063
MV01	CmSSR6	164	0,063
MV01	CmSSR9	128	0,091
CN01	CmSSR1	159	0,111
CN01	CmSSR6	149	0,111
CN01	CmSSR6	160	0,167
CN02	CmSSR2	193	0,179
CN02	CmSSR4	159	0,107
CN02	CmSSR6	174	0,038
PT01	CmSSR2	168	0,200
PT01	CmSSR2	192	0,100
PT01	CmSSR4	151	0,100
PT01	CmSSR6	171	0,100
PT01	CmSSR9	148	0,125

A diversidade genética das populações foi similar. A média de H_O variou de 0,427 em CN02 a 0,555 em CS02, enquanto a média de H_E foi de 0,550 para PT01 a 0,653 para CS02 (Tabela 5). Todas as populações apresentaram um déficit de heterozigotos em relação ao esperado, sendo os valores de F mais elevados para as populações CN01 e CN02, ambas simpátricas.

Tabela 5. Diversidade genética por população com base em sete locos nuSSR para os indivíduos amostrados de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum*

Pop.	N	Na	Ne	H_O	H_E	F
CS01	13,714	6,714	4,124	0,474	0,653	0,229
CS02	6,714	4,429	2,830	0,555	0,555	0,013
MV01	9,714	5,429	3,929	0,501	0,622	0,109
MV02	4,714	4,143	3,301	0,457	0,603	0,225
CN01	8,286	5,857	4,573	0,480	0,663	0,265
CN02	12,429	7,286	4,899	0,427	0,627	0,233
PT01	4,857	3,857	3,120	0,443	0,550	0,163

(N) número médios de indivíduos, (Na) Número médio de alelos, (Ne) número médio de alelos efetivos, (H_O) heterozigosidade média observada, (H_E) heterozigosidade média esperada e (F) média do índice de fixação.

As análises do STRUCTURE identificaram dois clusters em nossa amostragem (Figura Suplementar 2), correspondendo às duas espécies de *Cenostigma* investigadas. A atribuição dos indivíduos a esses dois grupos genéticos revelou uma estruturação geográfica, com as quatro populações do sul (CS e MV) contendo indivíduos, em sua maioria, correspondendo a um agrupamento, enquanto as três populações do norte correspondendo, em sua grande maioria, a um segundo agrupamento genético (Figura 3).

Os indivíduos foram geneticamente classificados entre parentais e híbridos, sendo encontrados 23 indivíduos de *C. microphyllum*, 12 indivíduos de *C. laxiflorum* e 30 híbridos. Nas populações CS, a maioria (14) dos indivíduos foram geneticamente classificados como híbridos,

com variáveis proporções de q , enquanto apenas sete foram atribuídos a *C. laxiflorum*. Já nas populações MV, apenas cinco indivíduos foram geneticamente classificados como *C. laxiflorum*, a maioria, 9, foram considerados híbridos, e dois foram atribuídos a *C. microphyllum*, embora morfologicamente todos, exceto um, tenham sido identificados como *C. laxiflorum* e essas populações tenham sido inicialmente consideradas alopátricas. Nas populações ao norte, todos os indivíduos de PT01 foram atribuídos a *C. microphyllum*, sem detecção de híbridos, constituindo a única população de fato pura. Já nas duas populações morfologicamente consideradas simpátricas, 16 indivíduos foram atribuídos a *C. microphyllum*, sete híbridos e nenhum a *C. laxiflorum*, indicando que mesmo indivíduos geneticamente atribuídos à *C. microphyllum* foram eventualmente identificados como *C. laxiflorum*.

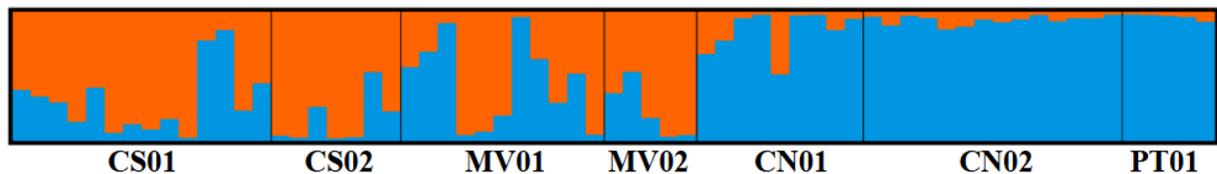


Figura 3. Atribuição genética dos 65 indivíduos de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum* amostrados a partir da genotipagem de sete locos nuSSR por meio do STRUCTURE.

A correlação entre a atribuição genética dos indivíduos (q) e a variação morfológica observada entre os mesmos com base nos dados de centróide, indica correlação, embora fraca, entre eles. Tanto indivíduos geneticamente atribuídos a *C. laxiflorum* quanto indivíduos atribuídos a *C. microphyllum* apresentaram ampla variação no tamanho dos foliólulos, variação similar à observada nos possíveis híbridos (Figura 2C). A variação em indivíduos “puros” de *C. laxiflorum* foi curiosamente menor que a observada em indivíduos “puros” de *C. microphyllum*, sugerindo que a variação fenotípica em *C. microphyllum* é maior que atualmente considerada e justificando a identificação de vários indivíduos de *C. microphyllum* como *C. laxiflorum*.

De acordo com os dados de F_{ST} par-a-par (Tabela 6), podemos observar uma diferenciação moderada clara entre a população alopátrica de *Cenostigma microphyllum* (PT) e de *C. laxiflorum* (CS e MV; 0,088 - 0,168). A diferenciação entre as populações de *C. laxiflorum* foi menor, mas variou de 0,038 (MV01-02) a 0,096 (CS01-CS02). As populações simpátricas se diferenciaram

das populações de *C. laxiflorum* com F_{ST} entre 0,060 e 0,155, com diferenciação entre elas de 0,047 apenas. A diferenciação para *C. microphyllum* (PT) foi intermediária, com F_{ST} entre 0,061 e 0,087. Ambas apresentaram maior proximidade com MV01, que teve a maioria de seus indivíduos classificados como híbridos de acordo com os dados genéticos.

Tabela 6. F_{st} nuclear par-a-par inferido entre as populações amostradas de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum*.

	CS01	CS02	MV01	MV02	CN01	CN02	PT01
CS01	0,000						
CS02	0,096	0,000					
MV01	0,060	0,088	0,000				
MV02	0,077	0,085	0,038	0,000			
CN01	0,103	0,155	0,074	0,107	0,000		
CN02	0,074	0,124	0,060	0,101	0,047	0,000	
PT01	0,116	0,168	0,088	0,125	0,087	0,061	0,000

ANÁLISE DE DIVERSIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA PLASTIDIAL ENTRE AS ESPÉCIES DE *Cenostigma*

Os seis locos plastidiais mais polimórficos foram genotipados, porém o loco CmCPSSR4 apresentou 46% de dados faltantes e foi desconsiderado para as análises populacionais. Os cinco locos plastidiais analisados apresentaram entre dois e sete alelos por loco na amostragem de 50 indivíduos, variando de 120 a 427 pares de bases (Tabela 2). A combinação de alelos para os cinco locos analisados resultou em nove haplótipos, sendo identificados de um a três haplótipos por população (Tabela 7). As populações apresentaram uma diversidade haplotípica variando entre 0,0 a 1,0 (Tabela 7) e uma clara estruturação geográfica foi observada (Figura 4). Dois

haplótipos (H2 e H3) foram compartilhados entre as populações CS01 e CS02, sendo o H3 também presente em CN01; já o H7 estava presente entre MV02 e CS01. Os dois haplótipos de PT01 (H6 e H8) foram exclusivos dessa população, e tanto CN01 como CN02 também apresentaram haplótipos exclusivos (H9 e H1, respectivamente), mais relacionados aos haplótipos de PT01 (H8 e H6, respectivamente; Figura 4).

Tabela 7. Análise da variabilidade haplotípica gerada a partir de cinco locos cpSSR em indivíduos de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum*. **N:** número de indivíduos genotipados. **H:** Haplótipos detectados em cada população. **P:** Número de haplótipos privados. **N_e:** Número efetivo de haplótipos. **H_e:** Diversidade genética.

População	Espécies	N	Haplótipos	P	N _e	H _e
CS01	<i>C. laxiflorum</i>	12	H2, H3 e H7	0	2,571	0,667
CS02	<i>C. laxiflorum</i>	7	H2 e H3	0	1,324	0,286
MV01	<i>C. laxiflorum</i>	9	H5	1	1,000	0,000
MV02	<i>C. laxiflorum</i>	2	H4 e H7	1	2,000	1,000
CN01	<i>C. laxiflorum</i> <i>/C.</i> <i>microphyllum</i>	6	H3 e H9	1	1,385	0,333
CN02	<i>C. laxiflorum</i> <i>/C.</i> <i>microphyllum</i>	11	H1	1	1,000	0,000
PT01	<i>C.</i> <i>microphyllum</i>	3	H6 e H8	2	1,800	0,667

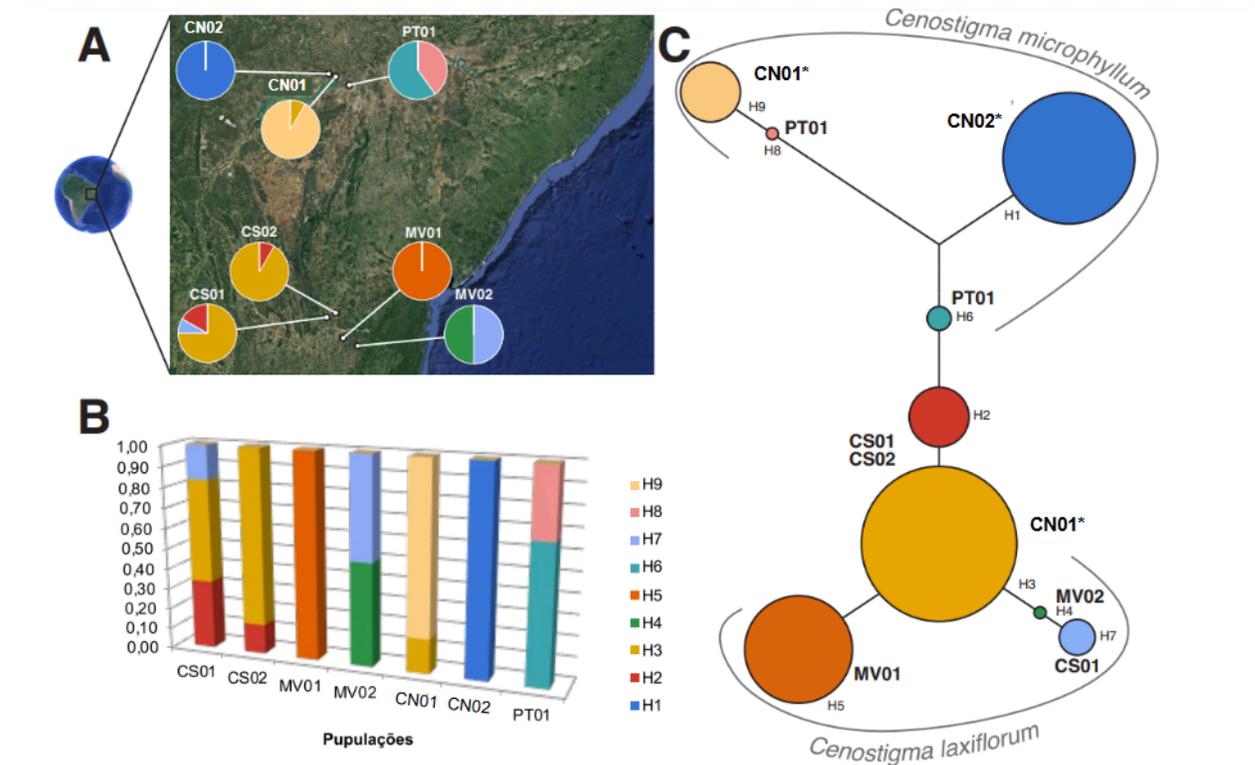


Figura 4. Haplótipos plastidiais obtidos a partir da genotipagem de cinco locos de cpSSR em populações de *Cenostigma laxiflorum* e *Cenostigma microphyllum*. **(A e B)** Frequências e distribuição geográfica dos haplótipos por população; **(C)** Rede de haplótipos. Asteriscos (*) indicam populações de indivíduos com morfologia intermediária entre as duas espécies.

A rede de haplótipos apontou uma diferenciação entre as populações de *Cenostigma microphyllum* e *C. laxiflorum*, apesar da distância entre H2 e H6. Os haplótipos das duas populações morfologicamente simpátricas analisadas são mais relacionados a haplótipos encontrados na população alopátrica de *C. microphyllum*, confirmando os dados nucleares. A presença de haplótipos exclusivos na maioria das populações, inclusive nas populações com indivíduos híbridos, e a existência de haplótipos espécie-específicos, indica fluxo limitado de sementes.

DISCUSSÃO

HIBRIDIZAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES *C. laxiflorum* e *C. microphyllum*

A morfologia foliar intermediária de indivíduos de *Cenostigma* foi o primeiro indicativo de fluxo gênico entre linhagens diferentes do gênero, como evidenciado por Lewis (1995) e Aecyo *et al.* 2024. *Cenostigma laxiflorum* e *C. microphyllum* apresentaram uma ampla variação no tamanho e número de foliólulos, especialmente nas populações coletadas em Casa Nova (BA), corroborando as observações anteriores. Os valores dos centróides indicam que as espécies analisadas possuem uma grande plasticidade, sendo esta plasticidade mais pronunciada entre os indivíduos taxonomicamente identificados como *C. laxiflorum* (OLIVEIRA *et al.*, 2023). No entanto, nossos dados revelam que a plasticidade em *C. microphyllum* é ainda maior e subestimada, tendo em vista a maior variação dos centróides entre indivíduos puros de *C. microphyllum*.

Quando consideradas as atribuições genéticas, vários indivíduos morfologicamente semelhantes a *C. laxiflorum* foram classificados geneticamente como *C. microphyllum* ou ainda como híbridos. Por outro lado, apenas um indivíduo morfologicamente similar à *C. microphyllum* foi observado numa população alopátrica de *C. laxiflorum*, sendo este um híbrido. Dentre os demais indivíduos morfologicamente intermediários, alguns foram geneticamente híbridos e outros apresentaram genoma de *C. microphyllum*, o que também foi encontrado por Aecyo *et al.* (in prep). Por um lado, é possível que *C. microphyllum* presente, na verdade, maior plasticidade foliar, em algumas populações pelo menos, do que considerado na descrição taxonômica da espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2023). Os indivíduos que apresentaram tamanhos de folíolos maiores do que o comum para *C. microphyllum* apresentaram outras características comuns a esta espécie como: número de folíolos maior do que observado em populações puras de *C. laxiflorum*, bem como formato oblongo de seus folíolos. A presença de tricomas glandulares na face abaxial dos folíolos desses indivíduos também é característico do que é encontrado em *C. microphyllum*. No entanto, a detecção de grande proporção de indivíduos geneticamente híbridos na amostra analisada sugere que, de fato, haja hibridização entre ambas as espécies, o que poderia também explicar a maior plasticidade fenotípica observada em *C. microphyllum* nas populações analisadas.

Apesar das análises morfológicas possuírem limitações acerca da expressão fenotípica altamente dependente das condições ambientais, bem como da proximidade das espécies analisadas (ARNOLD, 2006), é provável que essas não sejam as causas da variação observada, visto que, numa mesma população, foi encontrada variação quanto ao tamanho dos foliólulos,

observada até dentro do mesmo indivíduo. Outro fator que poderia explicar a variação observada e que se constitui num grande desafio na detecção de introgressão entre espécies com tempos de geração longos e grandes tamanhos populacionais efetivos, como árvores, é distinguir se de fato os resultados apontam para introgressão ou se trata de uma separação incompleta de linhagens (ABBOTT *et al.*, 2017). No entanto, as espécies estudadas não são espécies irmãs ou proximamente relacionadas (GAGNON *et al.*, 2016; CASTRO *et al.*, 2023), o que torna a hipótese de hibridização neste caso mais provável.

Tanto em nosso estudo como no outro caso analisado geneticamente de hibridização no gênero *Cenostigma*, a espécie *C. microphyllum* está envolvida. Aecyo *et al.* 2024 observou uma alta diversidade genética tanto em cada uma das espécies analisadas como também nos indivíduos híbridos, e uma baixa estruturação genética foi encontrada com marcadores nucleares entre populações da mesma espécie, como no presente trabalho, um indicativo de fluxo contínuo entre elas (KHAN *et al.*, 2020). Isso sugere que os indivíduos híbridos destas espécies são férteis, e que, portanto, contribuem para a diversidade genética como um todo (MA *et al.*, 2019).

Os dados plastidiais revelaram baixa diversidade de haplótipos dentro das populações. Os dados indicam estruturação geográfica dos haplótipos, mas este padrão pode estar relacionado à presença de haplótipos espécie-específicos, tendo em vista que a população alopátrica de *C. microphyllum* amostrada está mais ao norte que as populações de *C. laxiflorum*. A rede de haplótipos dá suporte a um padrão espécie-específico, pois os haplótipos da mesma espécie estão mais relacionados entre si, diferente do observado na análise de *C. microphyllum* e *C. pyramidale*, que revelou um padrão apenas geográfico (AECYO *et al.*, 2024). Um padrão predominantemente geográfico foi também observado em *Paeonia californica* (WALTERS, 1942), diferente do observado em *Melocactus* (KHAN *et al.*, 2020). Isso pode estar relacionado ao maior tempo de divergência entre *C. laxiflorum* e *C. microphyllum* do que entre *C. microphyllum* e *C. pyramidale* (~6.5 Ma; Gagnon *et al.* 2019), e/ou a um menor fluxo gênico entre elas. Apesar da baixa diversidade de haplótipos intrapopulacionais, no geral ambas as espécies apresentam uma alta diversidade haplotípica, como observado por Aecyo *et al.* 2024.

FLUXO GÊNICO INTERESPECÍFICO OCORRE AMPLAMENTE EM *Cenostigma*

O fluxo gênico entre linhagens pode ter um papel fundamental na adaptação da espécie, mas a introgressão gerada a partir destes cruzamentos pode ser uma das causas para incertezas

filogenéticas. O fluxo gênico também pode criar *syngameons*, onde várias espécies diferentes estão conectadas entre si através dos eventos de hibridização que ocorrem entre elas (BUCK *et al.*, 2022). Dados genéticos do presente trabalho, assim como os dados de Aecyo *et al.* 2024, indicam que, no gênero *Cenostigma*, ao menos três espécies estão envolvidas em hibridização, caracterizando um *syngameon*. O fato de *C. microphyllum* apresentar geralmente folhas de tamanho muito menor pode facilitar a detecção de híbridos com essa espécie. Esses dados sugerem, portanto, que a hibridização no gênero pode ser ainda mais ampla do que morfologicamente evidente e atualmente conhecida.

O fluxo gênico entre espécies de *Cenostigma* foi sugerido por Lewis (1995) em seus estudos, que identificou a presença de indivíduos de *C. laxiflorum* com características de outras espécies do gênero, teorizando assim a existência de híbridos naturais entre as espécies do gênero que ocorrem em simpatria. Alguns indivíduos apresentavam folhas pequenas com um número maior de pinas (quatro pares mais um terminal) e uma maior quantidade de foliólulos (até 15 por pina) similar ao que pode ser observado em indivíduos de *C. microphyllum*. Também foram observados indivíduos entre os municípios de Manoel Vitorino e Catingal com características intermediárias entre *C. laxiflorum* e *C. pluviosum* var. *peltophoroides*. Neste caso, os foliólulos eram menores do que habitualmente encontrado em *C. laxiflorum*, porém maiores do que é esperado para *C. pluviosum* var. *peltophoroides*. Os indivíduos amostrados no presente estudo em Manoel Vitorino indicaram possível hibridização com *C. microphyllum* a partir dos agrupamentos genéticos obtidos com os microssatélites nucleares. Não foi possível estabelecer se há ou não fluxo gênico entre *C. laxiflorum* e *C. pluviosum* var. *peltophoroides*, sendo necessária uma amostragem mais ampla, que inclua indivíduos de populações naturais de *C. pluviosum* e idealmente outras espécies do gênero.

A filogenia obtida por Castro *et al.*, (2023) foi a que melhor resolveu as relações do gênero até o momento, embora os autores tenham utilizado apenas um acesso de cada espécie. Porém, a sistemática confusa do grupo não se dá apenas devido à análise de poucos marcadores ou regiões pouco informativas, mas também devido à captura do plastoma dos parentais pelos indivíduos híbridos como relatado por AECYO *et al.*, 2024. Quando um indivíduo híbrido geneticamente mais relacionado a *C. pyramidale* devido a retrocruzamentos sucessivos com pólen dessa espécie tem como progenitor feminino inicial *C. microphyllum* e herda a sequência de seu plastoma, há uma incongruência filogenética entre marcadores plastidiais e nucleares, além de incongruência

com a morfologia. No presente estudo, os indivíduos das populações de morfologia intermediárias eram, em sua maioria, geneticamente mais relacionados a *C. microphyllum*, tanto com marcadores plastidiais como nucleares, mesmo aqueles morfologicamente similares a *C. laxiflorum*. No entanto, uma maior proporção de indivíduos híbridos foi observada em populações inicialmente identificadas como alopátricas de *C. laxiflorum*. Isso sugere que o fluxo de pólen pode ter um papel importante na introgressão bidirecional entre as espécies, mas que essa introgressão é mais facilmente reconhecida morfologicamente em populações de *C. microphyllum*. A detecção de poucos híbridos nas populações morfologicamente intermediárias também sugere que esses resultem de eventos mais frequentes de hibridização no passado, e que a hibridização seja atualmente mais comum nas populações do sul da Bahia, onde uma alta proporção de híbridos com valores intermediários foram detectados. Uma análise com o NewHybrids (ANDERSON; THOMPSON, 2002) é necessária para melhor esclarecer essa questão.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A transferibilidade dos marcadores plastidiais permitiram identificar haplótipos espécie-específicos, compatível com a estruturação geográfica das populações analisadas. As populações de *C. laxiflorum* do sul da Bahia apresentaram um conjunto exclusivo de haplótipos. Por outro lado, as populações com a morfologia intermediária do norte da Bahia/sul de Pernambuco, que ocorrem geograficamente mais próximas a *C. microphyllum*, apresentaram haplótipos distintos de ambas as espécies. No entanto, o fato desses haplótipos serem geneticamente relacionados aos haplótipos de *C. microphyllum*, e os nuSSRs também indicarem maior proximidade entre as populações intermediárias (CN) e *C. microphyllum* (mesmo agrupamento genético), sugere que a similaridade morfológica com *C. laxiflorum* pode resultar de introgressão limitada, de poucos caracteres, a partir de eventual fluxo de pólen, entre as espécies. Vários indivíduos geneticamente híbridos, embora identificados como *C. laxiflorum*, foram observados em populações alopátricas do sul da Bahia, especialmente em Manoel Vitorino. Nesse caso, os indivíduos possuíam haplótipos de *C. laxiflorum*, indicando possível fluxo de pólen de *C. microphyllum* a partir de populações próximas. Sendo assim, acreditamos que haja fluxo de pólen bidirecional e formação de híbridos provavelmente até o presente em ambas as

espécies, sendo a introgressão de *C. laxiflorum* em *C. microphyllum* mais facilmente perceptível devido à menor plasticidade fenotípica taxonomicamente considerada para essa última espécie. A presença de hibridização mesmo em linhagens distantes de *Cenostigma* pode estar relacionada ao curto tempo de divergência do gênero (14 Ma; GAGNON *et al.*, 2019) e/ou à sua similaridade cariotípica e genômica (CASTRO *et al.*, 2023), que pode propiciar a viabilidade de híbridos interespecíficos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Emanuel Evaristo pela identificação taxonômica dos indivíduos coletados, e a Plataforma de Sequenciamento de DNA do CB/UFPE localizada no Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva do Departamento de Genética pela genotipagem automática. Agradecemos também ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES código 0001) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processos 4075222021-2 e 310693/2018-7).

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, Richard J. *et al.* Genomics of hybridization and its evolutionary consequences. **Molecular Ecology**, [S.L.], v. 25, n. 11, p. 2325-2332, 2016.
- AECYO, Paulo. *et al.* Plastome evolution in the Caesalpinia group (Leguminosae) and its application in phylogenomics and populations genetics. **Planta**, [S.I.], 2021.
- AECYO, Paulo. *et al.* Integrative evidence on the hybridization between *Cenostigma microphyllum* and *C. pyramidale* (Leguminosae) in the Caatinga dry forest. **Plant Biology**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-12, 16 dez. 2024.
- ANDERSON, E.C.; THOMPSON, E. A. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. **Genetics**, [S.L.], v. 160, n.3, p. 1217–1229, 2002.
- BUCK, Ryan *et al.* The Syngameon Enigma. **Plants**, [S.L.], v. 11, n. 7, p. 895, 2022.
- BURGARELLA, C *et al.* Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *q. ilex*). **Heredity**, [S.L.], v. 102, n. 5, p. 442-452, 2009.

- CASTRO, Natália *et al.* Genomic stability in *Cenostigma Tul.*, (Caesalpinioideae, Fabaceae): causes and consequences. *Botanical Journal Of The Linnean Society*. [S.L.], p. 1-15. ago. 2023.
- DRYDEN, I.L.; MARDIA, K.V., 1998. *Statistical Analysis of Shape*. Wiley, Chichester.
- ELIADES, N. G.; Eliades D. G. (2009). *HAPLOTYPE ANALYSIS: Software for analysis of haplotype data*. Distributed by the authors. Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August University Goettingen, Germany. URL <http://www.uni-goettingen.de/en/134935.html>.
- EVANNO, G. Detecting the numbers of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. ***Molecular Ecology***, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 2611–2620, 2005.
- FERREIRA, M; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995.
- HAMMER, Ø. *et al.* PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. ***Palaeontologia Electronica***, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.
- GAGNON, Edeline *et al.* A new generic system for the pantropical *Caesalpinia* group (Leguminosae). ***Phytokeys***, [S.L.], v. 71, p. 1-160, 2016.
- GAGNON, Edeline *et al.* Global Succulent Biome phylogenetic conservatism across the pantropical *Caesalpinia* Group (Leguminosae). ***New Phytologist***, [S.L.], v. 222, n. 4, p. 1994-2008, 14 jan. 2019.
- GOMPERT, Zachariah; MANDEVILLE, Elizabeth G.; BUERKLE, C. Alex. Analysis of Population Genomic Data from Hybrid Zones. ***Annual Review Of Ecology, Evolution, And Systematics***, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 207-229, 2017.
- KHAN, Gulzar *et al.* Maintaining genetic integrity with high promiscuity: frequent hybridization with low introgression in multiple hybrid zones of *Melocactus* (cactaceae). ***Molecular Phylogenetics And Evolution***, [S.L.], v. 142, p. 1-10, 2020.
- KOPELMAN, Naama N. *et al.* CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across *K*. ***Molecular Ecology Resources***, [S.L.], v. 15, n. 5, p. 1179-1191, 2015.
- LANGDON, Quinn K. *et al.* Postglacial migration shaped the genomic diversity and global distribution of the wild ancestor of lager-brewing hybrids. ***Plos Genetics***, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 1-14, 2020.

- LEITE, Ana Virgínia, MACHADO, Isabel Cristina. Biologia reprodutiva da “catingueira” (*Caesalpinia pyramidalis* Tul., Leguminosae-Caesalpinioideae), uma espécie endêmica da Caatinga. **Revista Brasileira Botânica**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 79-88, 2009.
- LEWIS, Gwilym Peter. SYSTEMATIC STUDIES IN NEOTROPICAL 'CAESALPINA L.' (LEGUMINOSAE: caesalpinioideae), including a revision of the 'poinchianella-erythrostemon' group. 1995. 354 f. Tese (Doutorado) - Faculty of Science, University Of St Andrews, [S.I.], 1995.
- LÓPEZ-CAAMAL, Alfredo; TOVAR-SÁNCHEZ, Efraín. Genetic, morphological, and chemical patterns of plant hybridization. *Revista Chilena de História Natural*, [S.I.], v. 87, n. 16, p. 1-14, 2014.
- MA, Yazhen *et al.* Ancient introgression drives adaptation to cooler and drier mountain habitats in a cypress species complex. **Communication Biology**, [S.L.], v. 2, n. 213, p. 1-12, 2019.
- MALLET, James. Hybridization as an invasion of the genome. **Trends In Ecology & Evolution**, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 229-237, 2005.
- MATA-SUCRE, Yennifer *et al.* Revisiting the cytomolecular evolution of the *Caesalpinia* group (Leguminosae): a broad sampling reveals new correlations between cytogenetic and environmental variables. **Plant Systematics And Evolution**, [S.L.], v. 306, n. 2, p. 1-13, 2020.
- MOTA, M. R. *et al.* The role of hybridization and introgression in maintaining species integrity and cohesion in naturally isolated inselberg bromeliad populations. *Plant Biology*, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 122-132, 2019.
- MUNIZ, André Carneiro *et al.* The protected tree *Dimorphandra wilsonii* (Fabaceae) is a population of inter-specific hybrids: recommendations for conservation in the brazilian cerrado/atlantic forest ecotone. **Annals of Botany**, [S.L.], v. 126, n. 1, p. 191-203, 2020.
- OLIVEIRA, Felipe Gomes dos Anjos *et al.* Flora da Bahia: Leguminosae – *Cenostigma* (Caesalpinioideae: Caesalpineae). **Sitientibus série Ciências Biológicas**, [S.L.], v. 23, p. 1-15, 2023,
- PEAKALL, Rod; SMOUSE, Peter E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in excel. population genetic software for teaching and research: an update. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.
- PRITCHARD, Jonathan K *et al.* Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, [S.L.], v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

- QUEIROZ, Rubens Teixeira de. **Plantas do Brasil**. 2018. Disponível em: <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com/search?q=cenostigma+laxiflorum>. Acesso em: 03 ago. 2022.
- ROBINS, T P *et al.* Landscape and taxon age are associated with differing patterns of hybridization in two *Eucalyptus* (Myrtaceae) subgenera. **Annals Of Botany**, [S.L.], v. 127, n. 1, p. 49-62, 2021.
- ROHLF, F. J.; tpsUtil, version 1.46. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, 2010a.
- ROHLF, F. J.; tpsDig, version 2.16. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, 2010b.
- SCHLEY, Rowan J *et al.* Hybridization: a 'double-edged sword' for neotropical plant diversity. **Botanical Journal Of The Linnean Society**, [S.L.], v. 199, n. 1, p. 331-356, 2021.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology**, v.18, n. 2, p. 233, 2000.
- SOLTIS, Pamela S.; SOLTIS, Douglas E. The Role of Hybridization in Plant Speciation. **Annual Review of Plant Biology**, [S.L.], v. 60, n. 1, p. 561-588, 2009.
- STEANE, D. A. *et al.* A set of chloroplast microsatellite primers for *Eucalyptus* (Myrtaceae). **Molecular Ecology Notes**, [s.l.], v. 5, p.538-541, 2005.
- SOUZA, Gustavo *et al.* Do tropical plants have smaller genomes? Correlation between genome size and climatic variables in the *Caesalpinia* Group (Caesalpinioideae, Leguminosae). **Perspectives In Plant Ecology, Evolution And Systematics**, [S.L.], v. 38, p. 13-23, 2019.
- VAN-LUME, Brena *et al.* Heterochromatic and cytomolecular diversification in the *Caesalpinia* group (Leguminosae): relationships between phylogenetic and cytogeographical data. **Perspectives In Plant Ecology, Evolution And Systematics**, [S.L.], v. 29, p. 51-63, 2017.
- VAN-LUME, Brena *et al.* Evolutionary convergence or homology? Comparative cytogenomics of *Caesalpinia* group species (Leguminosae) reveals diversification in the pericentromeric heterochromatic composition. **Planta**, [S.L.], v. 250, n. 6, p. 2173-2186, 2019.
- WEISING, K; GARDNER, R. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, v. 42, n. 1, p. 9-19, 1999.
- ZHANG, Wei-Ping *et al.* Dead-End Hybridization in Walnut Trees Revealed by Large-Scale Genomic Sequence Data. **Molecular Biology And Evolution**, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 1-12, 2022.

APÊNDICE A

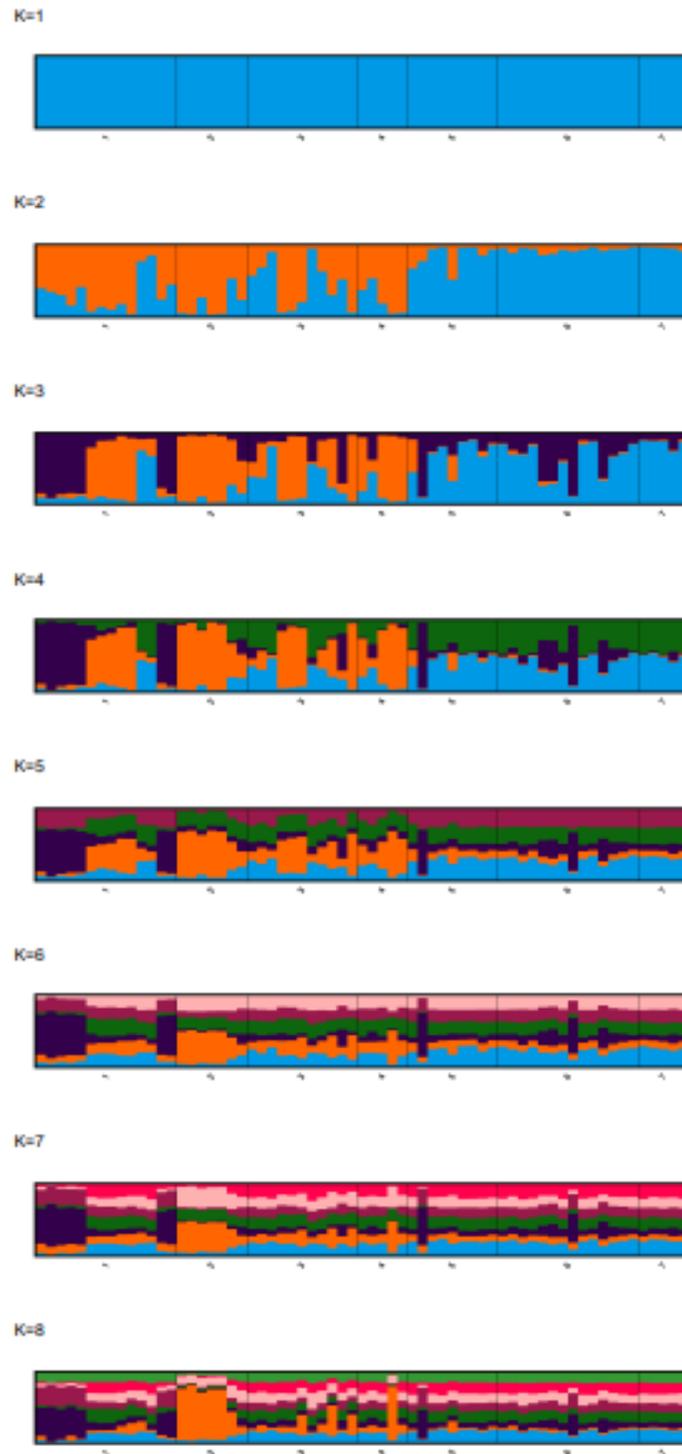


Figura Suplementar 1. Agrupamento Bayesiano das populações amostradas realizada no STRUCTURE variando o K de 1 a 8.

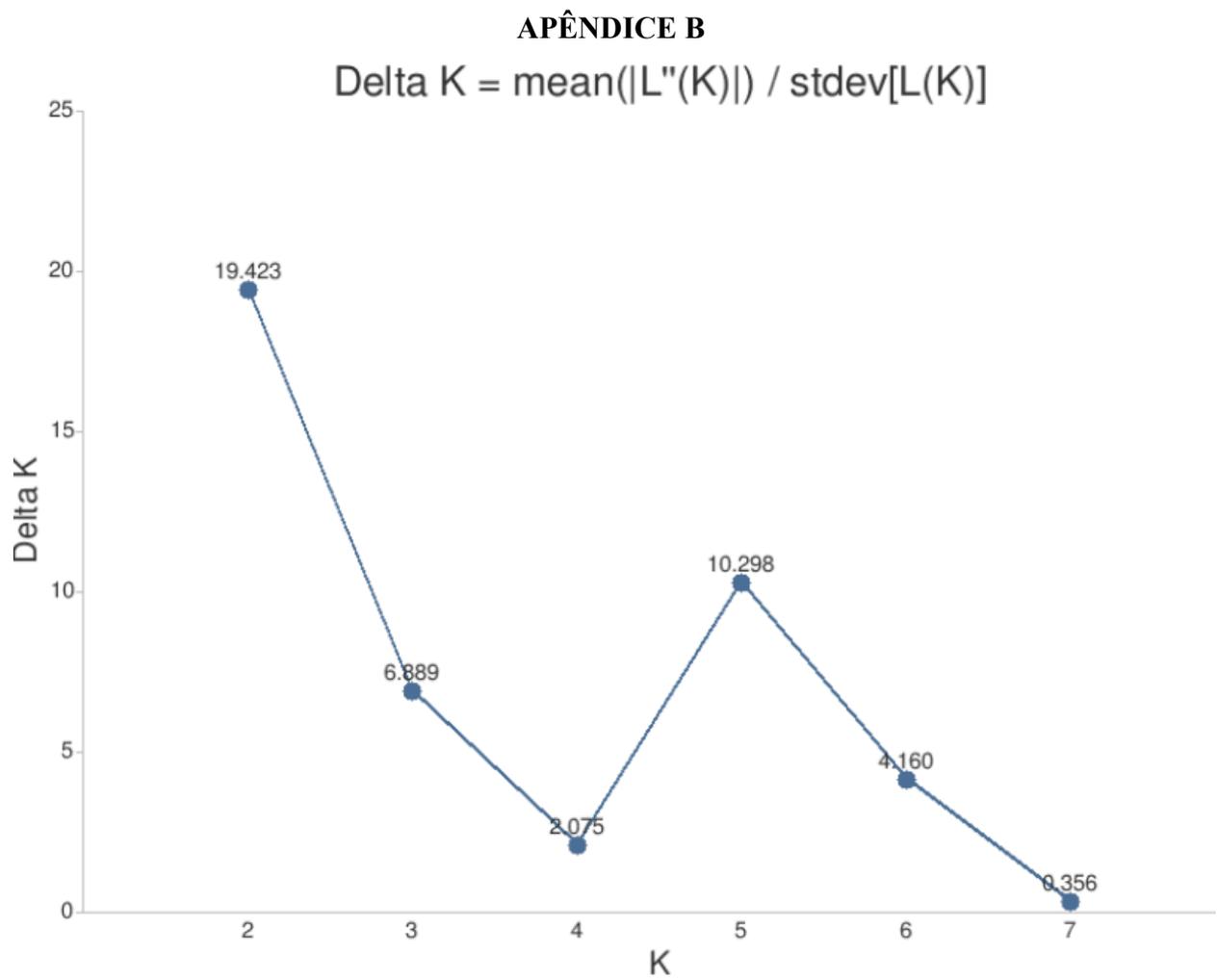


Figura Suplementar 2. Best K de Evanno para as populações amostradas.

APÊNDICE C

Tabela Suplementar 1. Valores de q , morfologia e centróide para as populações analisadas. **(H):** híbrido **(L):** *Cenostigma laxiflorum* e **(M):** *Cenostigma microphyllum*. Indivíduos com (-) não possuem dados para a respectiva categoria.

Ind.	Pop.	q	Atribuição		
			genética	Morfologia	Centróide (mm)
CS01-01	CS01	0,39	H	<i>C. laxiflorum</i>	-
CS01-02	CS01	0,33	H	<i>C. laxiflorum</i>	14,8
CS01-03	CS01	0,29	H	<i>C. laxiflorum</i>	-
CS01-04	CS01	0,14	H	<i>C. laxiflorum</i>	15,49
CS01-05	CS01	0,40	H	<i>C. laxiflorum</i>	14,6
CS01-06	CS01	0,06	L	<i>C. laxiflorum</i>	12,62
CS01-07	CS01	0,13	H	<i>C. laxiflorum</i>	8,9
CS01-08	CS01	0,09	L	<i>C. laxiflorum</i>	12,27
CS01-09	CS01	0,17	H	<i>C. laxiflorum</i>	13,04
CS01-10	CS01	0,02	L	<i>C. laxiflorum</i>	-
CS01-11	CS01	0,78	H	<i>C. laxiflorum</i>	-
CS01-12	CS01	0,86	H	<i>C. laxiflorum</i>	12,36
CS01-13	CS01	0,23	H	<i>C. laxiflorum</i>	-
CS01-14	CS01	0,44	H	<i>C. laxiflorum</i>	10,71
CS02-01	CS02	0,04	L	<i>C. laxiflorum</i>	19,3
CS02-02	CS02	0,02	L	<i>C. laxiflorum</i>	28,49
CS02-03	CS02	0,27	H	<i>C. laxiflorum</i>	-
CS02-04	CS02	0,02	L	<i>C. laxiflorum</i>	22,1
CS02-05	CS02	0,03	L	<i>C. laxiflorum</i>	-
CS02-06	CS02	0,54	H	<i>C. laxiflorum</i>	10,1
CS02-07	CS02	0,23	H	<i>C. microphyllum</i>	2,5
MV01-01	MV01	0,57	H	<i>C. laxiflorum</i>	20,6
MV01-02	MV01	0,69	H	<i>C. laxiflorum</i>	9,2
MV01-03	MV01	0,91	M	<i>C. laxiflorum</i>	16,44

MV01-04	MV01	0,04	L	<i>C. laxiflorum</i>	17,86
MV01-05	MV01	0,07	L	<i>C. laxiflorum</i>	11,74
MV01-06	MV01	0,20	H	<i>C. laxiflorum</i>	8,6
MV01-07	MV01	0,95	M	<i>C. laxiflorum</i>	25,9
MV01-08	MV01	0,63	H	<i>C. laxiflorum</i>	10,52
MV01-09	MV01	0,30	H	<i>C. laxiflorum</i>	11,44
MV01-10	MV01	0,52	H	<i>C. laxiflorum</i>	16,09
MV01-11	MV01	0,05	L	<i>C. laxiflorum</i>	33,35
MV02-01	MV02	0,37	H	<i>C. laxiflorum</i>	16,04
MV02-02	MV02	0,53	H	<i>C. laxiflorum</i>	29,5
MV02-03	MV02	0,18	H	<i>C. laxiflorum</i>	-
MV02-04	MV02	0,03	L	<i>C. laxiflorum</i>	-
MV02-05	MV02	0,04	L	<i>C. laxiflorum</i>	20,8
CN01-01	CN01	0,68	H	<i>C. laxiflorum</i>	12,97
CN01-02	CN01	0,77	H	<i>C. laxiflorum</i>	8,8
CN01-03	CN01	0,95	M	-	-
CN01-04	CN01	0,97	M	<i>C. laxiflorum</i>	13,94
CN01-05	CN01	0,51	H	<i>C. laxiflorum</i>	17,45
CN01-06	CN01	0,97	M	<i>C. microphyllum</i>	3
CN01-07	CN01	0,97	M	<i>C. microphyllum</i>	2,1
CN01-09	CN01	0,85	H	<i>C. microphyllum</i>	6,1
CN01-10	CN01	0,94	M	<i>C. microphyllum</i>	2,1
CN02-01	CN02	0,96	M	-	-
CN02-02	CN02	0,89	H	<i>C. laxiflorum</i>	15,13
CN02-03	CN02	0,96	M	<i>C. microphyllum</i>	4
CN02-04	CN02	0,95	M	<i>C. microphyllum</i>	8,4
CN02-05	CN02	0,86	H	<i>C. laxiflorum</i>	14,73
CN02-06	CN02	0,88	H	<i>C. laxiflorum</i>	-
CN02-07	CN02	0,94	M	<i>C. microphyllum</i>	11,1
CN02-08	CN02	0,91	M	<i>C. laxiflorum</i>	18,54

CN02-09	CN02	0,94	M	<i>C. laxiflorum</i>	22,22
CN02-10	CN02	0,97	M	<i>C. microphyllum</i>	5,6
CN02-11	CN02	0,92	M	<i>C. laxiflorum</i>	7,8
CN02-12	CN02	0,95	M	<i>C. microphyllum</i>	11,26
CN02-13	CN02	0,95	M	<i>C. laxiflorum</i>	30
CN02-14	CN02	0,97	M	<i>C. laxiflorum</i>	12,1
PT01-01	PT01	0,97	M	<i>C. microphyllum</i>	3
PT01-02	PT01	0,97	M	<i>C. microphyllum</i>	3,2
PT01-03	PT01	0,96	M	<i>C. microphyllum</i>	2,6
PT01-05	PT01	0,95	M	<i>C. microphyllum</i>	2,9
PT01-06	PT01	0,92	M	<i>C. microphyllum</i>	2,6
