

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR



**ESTUDOS GENÉTICOS E TAXONÔMICOS EM *MOLDENHAWERA* SCHRAD.
(LEGUMINOSAE - CAESALPINIOIDEAE): UM GÊNERO ENDÊMICO DO BRASIL**

CAIO VINICIUS VIVAS DAMASCENO MELO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Fevereiro de 2016

CAIO VINICIUS VIVAS DAMASCENO MELO

**ESTUDOS GENÉTICOS E TAXONÔMICOS EM *MOLDENHAWERA* SCHRAD.
(LEGUMINOSAE - CAESALPINIOIDEAE): UM GÊNERO ENDÊMICO DO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética Vegetal e Animal.

Orientadora: Dr^a. Fernanda Amato Gaiotto

Co-orientador: Dr. Cássio van den Berg

Co-orientador: Dr. Luciano Paganucci de Queiroz

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Fevereiro de 2016

M528

Melo, Caio Vinicius Vivas Damasceno.

Estudos genéticos e taxonômicos em *Molde-
nhawera* Schrad. (Leguminosae -caesalpinioideae):
um gênero endêmico do Brasil / Caio Vinicius Vivas
Damasceno Melo. – Ilhéus, BA: UESC, 2016.

viii, 70f. : Il.

Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual
de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular.

Inclui bibliografia.

1. Leguminosa. 2. Microssatélites (Genética).
3. Marcadores genéticos. 4. Vegetação – Classifi-
cação. I. Título.

CDD 583.74

CAIO VINICIUS VIVAS DAMASCENO MELO

**ESTUDOS GENÉTICOS E TAXONÔMICOS EM *MOLDENHAWERA* SCHRAD.
(LEGUMINOSAE - CAESALPINIOIDEAE): UM GÊNERO ENDÊMICO DO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética Vegetal e Animal.

Aprovada: 26 de fevereiro de 2016

Dr. Jomar Gomes Jardim
(UFSB)

Dr. Ronan Xavier Corrêa
(UESC)

Dr. Cláudio Antônio Ferreira de Melo
(UESC)

Dr^a. Fernanda Amato Gaiotto
(UESC -Orientadora)

Dr. Antônio Freire de Carvalho
Filho
(UESC)

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto do esforço e colaboração de várias pessoas. Por isso, gostaria de agradecer a:

À minha orientadora, Dr^a. Fernanda Amato Gaiotto, pela orientação, amizade e pelos valiosos ensinamentos e conselhos que levarei para o resto da minha vida profissional;

Ao Dr. Luciano Paganucci de Queiroz, por ter me apresentado ao gênero *Moldenhawera*, pela orientação, ensinamentos, amizade e pela valiosa contribuição na realização deste trabalho;

Ao professor Dr. Cássio van den Berg, pela orientação, pelos ensinamentos e amizade durante o meu doutorado;

Ao amigo José Lima da Paixão, pelos momentos de descontração e pela grande ajuda na localização e coleta das amostras de *Moldenhawera*;

Ao amigo Natanael Nascimento, pelas excelentes ilustrações das espécies novas de *Moldenhawera*;

Ao amigo Dr. Luiz Gustavo Souza pela colaboração no trabalho;

Ao amigo Dr. Roberto Tarazi, pela amizade e pelos valiosos conselhos e ensinamentos que auxiliaram na concepção deste trabalho;

A Alesandro, Rodrigo, Rodolpho e Talisson pela ajuda nas coletas;

Ao amigo Horlei, pela grande ajuda no sequenciamento e nas genotipagens;

Ao amigo e colega Allan, pela amizade e pelo grande apoio no final do doutorado;

À Michelin, por todo o apoio que possibilitou a coleta na Estação Ecológica da Michelin;

Ao IESB, por todo o apoio que possibilitou a coleta na RPPN Capitão e na RPPN Nova Angélica;

Ao ICMBio por ter concedido a licença de coleta e autorização para a coleta na Reserva Biológica de Una;

A toda minha família, em especial a minha mãe (Aldene), e a minha namorada (Jaci), pelo amor, carinho, apoio e incentivo durante esta jornada;

Aos professores do PPG em Genética e Biologia Molecular, por todo o conhecimento adquirido e pelos ensinamentos que aplicarei durante toda a minha vida profissional;

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Marcadores Moleculares, em especial a Rodrigo, Daniela, Alesandro, Júnior, Acácia, Daniele e Flora, pela amizade, ajuda e pelos momentos de descontração;

A todos os colegas e amigos da Pós-graduação, em especial a Allan, Cláudio, Lívia, Cris, Joadson, Tony, Ramiris, Luciano e Rodolpho, pela amizade e pelos momentos de descontração;

À Fabrícia, Mara e Kátia, por toda a ajuda durante esses quatro anos de doutorado;

A FAPESB pela bolsa de estudos;

À FAPESB e ao CNPq, pelo financiamento do projeto (SISBIOTA PES0051/2011);

À Universidade Estadual de Feira de Santana, por toda a infraestrutura fornecida durante a etapa do trabalho desenvolvida na UEFS;

À Universidade Estadual de Santa Cruz, ao Departamento de Ciências Biológicas e ao Colegiado do PPG em Genética e Biologia Molecular, por toda infraestrutura concedida;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos, muito obrigado!

EXTRATO

MELO, Caio Vinicius Vivas Damasceno, D.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2016. **Estudos genéticos e taxonômicos em *Moldenhawera* Schrad. (Leguminosae - Caesalpinioideae): um gênero endêmico do Brasil.** Orientadora: Dr^a. Fernanda Amato Gaiotto. Co-orientadores: Dr. Cássio van den Berg e Dr. Luciano Paganucci de Queiroz.

Leguminosae destaca-se na flora de todos os ecossistemas brasileiros pela riqueza de espécies e também por apresentar um grande número de gêneros e espécies endêmicas. Dentre os gêneros endêmicos do Brasil, podemos citar *Moldenhawera*, que ocorre principalmente no domínio fitogeográfico Mata Atlântica. No passado, a taxonomia do gênero *Moldenhawera* foi considerada confusa e, apesar de uma revisão taxonômica realizada recentemente, restaram ainda alguns problemas taxonômicos. Neste sentido, no presente trabalho foram realizados estudos taxonômicos e genéticos com o propósito de resolver os problemas taxonômicos do gênero *Moldenhawera*. Duas novas espécies foram descritas (*Moldenhawera longipedicellata* e *Moldenhawera congestiflora*) e uma nova chave de identificação para a seção *Brasilianae* foi elaborada. Para a abordagem genética, foram desenvolvidos 16 marcadores microssatélites específicos para *Moldenhawera blanchetiana* e transferidos para *Moldenhawera luschnathiana*. Estes marcadores nucleares codominantes e multialélicos, juntamente com o espaçador plastidial *trnD-T*, foram aplicados para avaliar o *status* taxonômico de *Moldenhawera blanchetiana*, a qual apresenta dois táxons infraespecíficos. As análises genéticas não corroboraram o padrão morfológico reportado para as variedades de *Moldenhawera blanchetiana*. Dessa forma, *Moldenhawera blanchetiana* deve ser considerada uma única espécie sem categorias infraespecíficas.

Palavras-chave: Fabaceae, Marcadores Moleculares, Microssatélites, Taxonomia.

ABSTRACT

MELO, Caio Vinicius Vivas Damasceno, D.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2016. **Genetic and taxonomic studies in *Moldenhawera* Schrad. (Leguminosae - Caesalpinioideae): a genus endemic from Brazil.** Advisor: Dr^a. Fernanda Amato Gaiotto. Advisor Committee Members: Dr. Cássio van den Berg and Dr. Luciano Paganucci de Queiroz.

The Leguminosae stands out on all Brazilian ecosystems due to its species richness and because it has a large number of endemic genera and species. *Moldenhawera* is one of the Leguminosae genera endemic to Brazil, which occurs mainly in the Atlantic Forest phytogeographical domain. *Moldenhawera* taxonomy was considered confusing in the past, but despite the recent taxonomic revision, some problems still remain. For this reason, in this study we evaluated *Moldenhawera* under taxonomic and genetic aspects in order to solve its taxonomic problems. We described two new species (*Moldenhawera longipedicellata* and *Moldenhawera congestiflora*) and also developed a revised identification key for the section *Brasilianae*. For genetics studies we developed 16 new microsatellite markers specific for *Moldenhawera blanchetiana* that were transferred to *Moldenhawera luschnathiana*. We applied these microsatellites and the partial plastid spacer *trnD-T* to evaluate the taxonomic status of this species, which has two infraspecific taxa. The genetic analysis did not corroborate for the morphology reported to the *Moldenhawera blanchetiana* varieties. Thus, *Moldenhawera blanchetiana* should be considered a single species without infraspecific categories.

Keywords: Fabaceae, Microsatellite, Molecular markers, Taxonomy.

ÍNDICE

EXTRATO	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo Geral	3
1.1.1 Objetivos específicos.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Leguminosae.....	4
2.2 <i>Moldenhawera</i>	5
2.3 Aplicação de ferramentas genéticas na identificação e na resolução de problemas taxonômicos de angiospermas.....	13
2.3.1 Marcadores microssatélites.....	16
2.3.2 Marcadores plastidiais.....	17
3. CAPÍTULO 1: A new species of <i>Moldenhawera</i> (Leguminosae) from Brazilian Atlantic Forest	20
4. CAPÍTULO 2: <i>Moldenhawera congestiflora</i>: a new species of Leguminosae from the Brazilian Atlantic Forest	30
5. CAPÍTULO 3: Development of microsatellite markers in <i>Moldenhawera blanchetiana</i> and their transferability to <i>M. luschnathiana</i> (Fabaceae)	39
6. CAPÍTULO 4: Evaluating the taxonomic status of <i>Moldenhawera blanchetiana</i> Tul. (Leguminosae) using molecular markers	46
7. CONCLUSÕES GERAIS	64
8. REFERÊNCIAS GERAIS	65

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país megadiverso, com uma das mais ricas floras do mundo, incluindo 32.109 espécies de espermatófitas, das quais 18.423 são consideradas endêmicas (BRAZIL FLORA GROUP, 2015). Entre os táxons bem representados na flora brasileira destaca-se a família Leguminosae (Fabaceae), sendo citada como uma das famílias mais ricas na Mata Atlântica, Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pampa e Pantanal (FORZZA et al., 2010).

Morfologicamente, Leguminosae caracteriza-se como árvores, ervas, arbustos ou trepadeiras, com filotaxia principalmente alterna, folhas geralmente compostas e frutos geralmente do tipo legume (LEWIS et al., 2005). São registrados para o Brasil 210 gêneros e cerca de 2.690 espécies (LIMA et al., 2010; QUEIROZ et al., 2009). Dentre os gêneros com distribuição restrita ao Brasil, podemos citar *Moldenhawera* Schrad., o qual é composto por 10 espécies com distribuição extra-amazônica ocorrendo principalmente no domínio fitogeográfico Mata Atlântica (QUEIROZ et al., 1999; LEWIS e QUEIROZ, 2010). A maioria das espécies possui uma distribuição geográfica bastante restrita, geralmente associadas a características ambientais específicas (QUEIROZ et al., 1999).

Lewis (1987) considerou o gênero taxonomicamente confuso e, apesar da revisão realizada por Queiroz et al. (1999), novas espécies para o gênero continuam sendo descritas (ex. *Moldenhawera intermedia* G. P. Lewis e L. P. Queiroz) (LEWIS e QUEIROZ, 2010). Além disso, *Moldenhawera blanchetiana* Tul., uma espécie endêmica da Mata Atlântica do estado da Bahia, apresenta duas variedades (*M. blanchetiana* var. *blanchetiana* e *M. blanchetiana* var. *multijuga* L. P. Queiroz, G. P. Lewis e Allkin) as quais não diferem quanto a características reprodutivas e são separadas principalmente pela forma, tamanho e o número dos folíolos (QUEIROZ et al., 1999). Diante desse problema taxonômico, foi elaborada a seguinte pergunta: a descontinuidade morfológica observada nas variedades de *M. blanchetiana* representa um indício de isolamento reprodutivo entre essas duas entidades biológicas?

De fato, muitas espécies vegetais exibem variação em caracteres vegetativos (ex. folhas) que podem ser fruto da variação ambiental e, conseqüentemente, não refletiriam na sistemática do grupo taxonômico em questão (ex. MENDES e PAVIANI, 1997; WARWICK e LEWIS, 2003). Entretanto, em alguns casos, a variação em caracteres vegetativos pode refletir um isolamento reprodutivo entre espécies de um determinado

táxon (JUNCHUM et al., 2008). Dessa forma, nos casos em que os caracteres morfológicos não são suficientes para delimitar táxons vegetais, dados genéticos (ex. tamanho do genoma nuclear, citogenética, marcadores microssatélites e sequências plastidiais) podem ser úteis e dessa forma auxiliar a taxonomia, por meio de análises que permitam inferir de forma indireta o isolamento reprodutivo entre diferentes entidades taxonômicas (WANG et al., 2011; BARBOSA et al., 2012; TAVARES et al., 2013). Em Leguminosae, por exemplo, uma abordagem usando dados genéticos, morfométricos e ecológicos foi empregada com sucesso no estudo de diferentes citótipos (diploide $2n = 24$ e tetraploide $2n = 48$) de *Libidibia ferrea* (Mart.) L. P. Queiroz, apontando que esses dois citótipos correspondem a duas entidades biológicas isoladas reprodutivamente (BORGES et al., 2012). Ademais, a correta delimitação/identificação de espécies é de grande valia em programas de conservação de espécies ameaçadas (FRANKHAM et al., 2008) ou para programas de reflorestamento (BORGES et al., 2012).

Frente aos problemas apresentados acerca da taxonomia do gênero *Moldenhawera* e do *status* taxonômico de *M. blanchetiana*, estudos genéticos e taxonômicos foram realizados com espécies deste gênero.

1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo contribuir para a resolução de incertezas taxonômicas no gênero *Moldenhawera* através de análises genéticas e morfológicas.

1.1.1 Objetivos específicos

Avaliar a taxonomia do gênero *Moldenhawera*;

Desenvolver *primers* que amplifiquem locos microssatélites para *M. blanchetiana* e testar a sua transferência para outras espécies do gênero *Moldenhawera*;

Fornecer subsídios para a delimitação taxonômica entre as duas variedades de *M. blanchetiana*, através da análise da estrutura genética utilizando marcadores microssatélites e plastidiais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leguminosae

Leguminosae é a terceira maior família das angiospermas. Possui cerca de 750 gêneros e aproximadamente 19.500 espécies com distribuição cosmopolita nos mais variados ambientes terrestres (LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP, 2013). São registrados para o Brasil 210 gêneros e cerca de 2.690 espécies, das quais 1.458 são consideradas endêmicas e 190 consideradas raras (LIMA et al., 2010; QUEIROZ et al., 2009).

Leguminosae é muito diversa morfológicamente. De modo geral, caracteriza-se como árvores, ervas, arbustos ou trepadeiras, filotaxia principalmente alterna, folhas geralmente compostas, presença de estípulas, inflorescência principalmente do tipo racemosa, flores geralmente pentâmeras, diclamídias, monóclinas e quase sempre apresentam um hipanto, ovário súpero, geralmente unicarpelar e frutos geralmente do tipo legume (LEWIS et al., 2005; QUEIROZ, 2009).

As leguminosas se destacam pela sua importância econômica, sendo muitas espécies utilizadas na alimentação humana e animal (ex. feijão, soja, amendoim e ervilha), marcenaria (ex. braúna, vinhático, jatobá, sucupira e angico) e fabricação de instrumentos musicais (ex. jacarandá e pau-brasil), na produção de tintas e vernizes, como forrageiras (ex. amendoim-forrageiro e alfafa), adubação verde (ex. mucuna-preta e crotalária), pasto apícola, como ornamentais (ex. jade-vermelha, caliandra, pata-de-vaca e flamboyant), na fabricação de óleos, fibras e na indústria farmacêutica (LEWIS, 1987; LEWIS et al., 2005; QUEIROZ, 2009).

Inúmeros estudos filogenéticos apontam para a monofilia da família Leguminosae. Por exemplo, um estudo realizado por Käss e Wink (1996) utilizando o gene *rbcL* apontou para a monofilia das subfamílias Mimosoideae e Papilionoideae e para a parafilia da subfamília Caesalpinioideae. No ano seguinte, Doyle et al. (1997), usando o mesmo gene, corroborou o que havia sido encontrado por Käss e Wink (1996), no que concerne à monofilia da família Leguminosae e das subfamílias Mimosoideae e Papilionoideae e a parafilia de Caesalpinioideae. Desde então, muitos trabalhos foram realizados usando diferentes regiões genômicas e diferentes estratégias de amostragem de táxons para inferir a história evolutiva da família, das suas subfamílias, tribos e gêneros (KÄSS e WINK, 1997; KAJITA et al., 2001; WOJCIECHOWSKI et al., 2004;

LAGOUDAKIS et al., 2008; MANZANILLA e BRUNEAU, 2012; CARDOSO et al., 2013; QUEIROZ et al., 2015; RAMOS et al., 2016; SNAK et al., 2016).

2.2 *Moldenhawera*

Moldenhawera Schrad. é um gênero membro do grupo *Dimorphandra*, subfamília Caesalpinioideae e da família Leguminosae. É endêmico do Brasil, com distribuição extra-amazônica, ocorrendo nos domínios fitogeográficos Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado, nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais e do Maranhão (Figuras 1 e 2). Seu principal centro de diversidade é a Mata Atlântica com sete das 10 espécies conhecidas para o gênero. Normalmente sua distribuição está associada a características ambientais específicas, como a vegetação e o solo (Figura 3). Ocorre desde o nível do mar até >1.000 m de altitude. O estado da Bahia possui seis das 10 espécies conhecidas do gênero (*Moldenhawera luschnathiana* Yakovlev, *Moldenhawera floribunda* Schrad., *Moldenhawera nutans* L. P. Queiroz, G. P. Lewis e Allkin, *Moldenhawera brasiliensis* Yakovlev, *Moldenhawera intermedia*, *Moldenhawera blanchetiana* Tul.) (QUEIROZ et al., 1999; LEWIS e QUEIROZ, 2010).

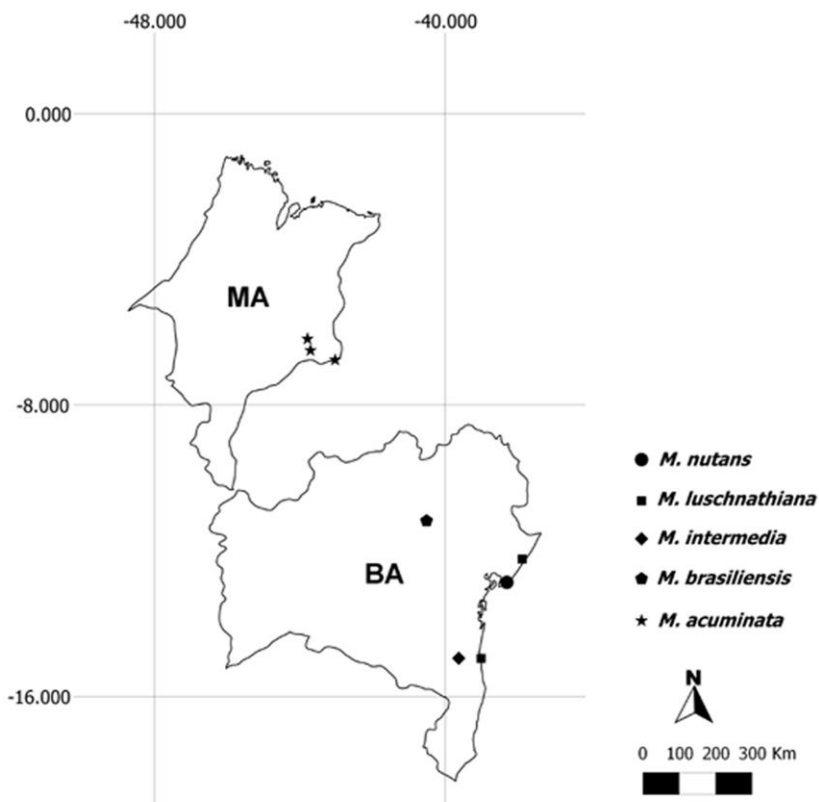


Figura 1: Distribuição geográfica de *Moldenhawera nutans*, *M. luschnathiana*, *M. intermedia*, *M. brasiliensis* e *M. acuminata* nos estados da Bahia e do Maranhão. C. V. Vivas, 2016.

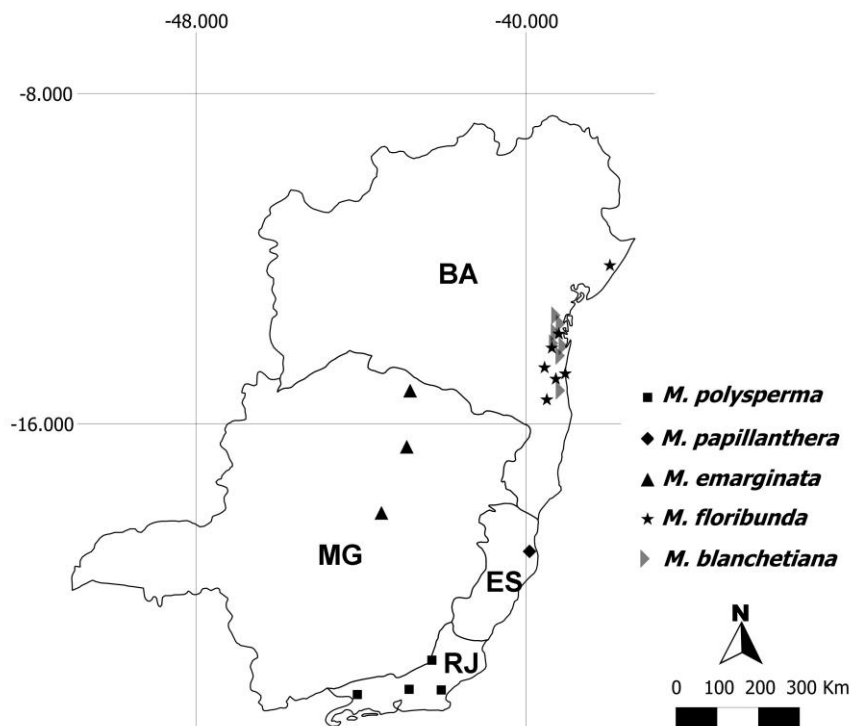


Figura 2: Distribuição geográfica de *Moldenhawera polysperma*, *M. papillanthera*, *M. emarginata*, *M. floribunda* e *M. blanchetiana* nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais e Bahia. C. V. Vivas, 2016.

O gênero foi reconhecido como membro de um grupo informal (*Peltophorum*) na tribo Caesalpinieae por Polhill e Vidal (1981). Posteriormente, foi definido como monofilético por Queiroz et al. (1999) em uma análise utilizando 22 caracteres morfológicos e *Melanoxylon brauna* Schott como grupo externo, por considerarem que este gênero era um provável grupo irmão de *Moldenhawera*. Nesta análise, *Moldenhawera* apresentou as seguintes sinapomorfias: tricomas bipartidos em formato de “T”, estípulas geralmente pinadas, ausência de um hipanto, androceu dimórfico e a conectividade do estame fértil vilosa. Manzanilla e Bruneau (2012) demonstraram que *Moldenhawera* é parte de um grupo parafilético na base de Mimosoideae, junto com *Diptychandra* Tul., *Pachyelasma* Harms e *Erythrophleum* Afzel. ex Brown.

Moldenhawera foi tipificado por *Moldenhawera floribunda* em 1821 por Schrader. Seguiram-se ao estabelecimento desse gênero os trabalhos de Pohl (1831), Tulasne (1844), Bentham (1870), Stellfeld (1948), Irwin e Arroyo (1974), Yakovlev, (1975) e Fernandes e Bezerra (1982), que resultaram na descrição de novas espécies de *Moldenhawera*. Entretanto, Lewis (1987) estudando as espécies de Leguminosae da Bahia, considerou o gênero taxonomicamente confuso, recomendando que uma revisão

do gênero fosse realizada para a resolução dos problemas taxonômicos existentes, com a determinação de caracteres morfológicos consistentes para tal fim. Queiroz et al. (1999) realizaram uma revisão do gênero *Moldenhawera*, onde (i) duas seções foram propostas (*Acuminatae* L. P. Queiroz, G. P. Lewis e Allkin e *Brasilianae* L. P. Queiroz, G. P. Lewis e Allkin), (ii) duas espécies e uma variedade foram descritas, (iii) uma espécie foi excluída (*Moldenhawera mollis* Benth.) e (iv) uma chave de identificação para as espécies do gênero foi formulada.



Figura 3: Habitats típicos de algumas espécies de *Moldenhawera*: Mata ciliar no domínio fitogeográfico Mata Atlântica nos estados da Bahia e do Espírito Santo (A, C, E e F). Dunas costeiras no litoral norte da Bahia (B). Caatinga na região norte do estado da Bahia (D). Fotos: C. V. Vivas, 2013.

Nos últimos 20 anos foram descritas quatro novas espécies e uma variedade para *Moldenhawera*, através dos estudos de Queiroz (1997), Queiroz et al. (1999) e Lewis e Queiroz (2010) sendo descritas uma espécie para o estado do Espírito Santo, uma para Minas Gerais e duas para a Bahia. Em 2009, Queiroz et al. consideraram cinco espécies de *Moldenhawera* como raras (*M. acuminata* A. Fern. e P. Bezerra, *M. brasiliensis*, *M. nutans*, *M. papillanthera* L. P. Queiroz, G. P. Lewis e Allkin e *M. polysperma* (Vell.) Stellfeld).

Morfologicamente *Moldenhawera* é caracterizado pelo hábito arbóreo ou arbustivo, tricomas bipartidos em formato de “T”, estípulas geralmente pinadas, folhas compostas pinadas, bipinadas ou parcialmente bipinadas, inflorescência racemosa, flores tetrâmeras ou pentâmeras, ausência de um hipanto, pétalas amarelas ou róseas, androceu dimórfico com apenas um estame fértil com a conectividade vilosa, sete ou nove estaminódios e fruto do tipo legume (QUEIROZ et al., 1999) (Figuras 4 e 5).

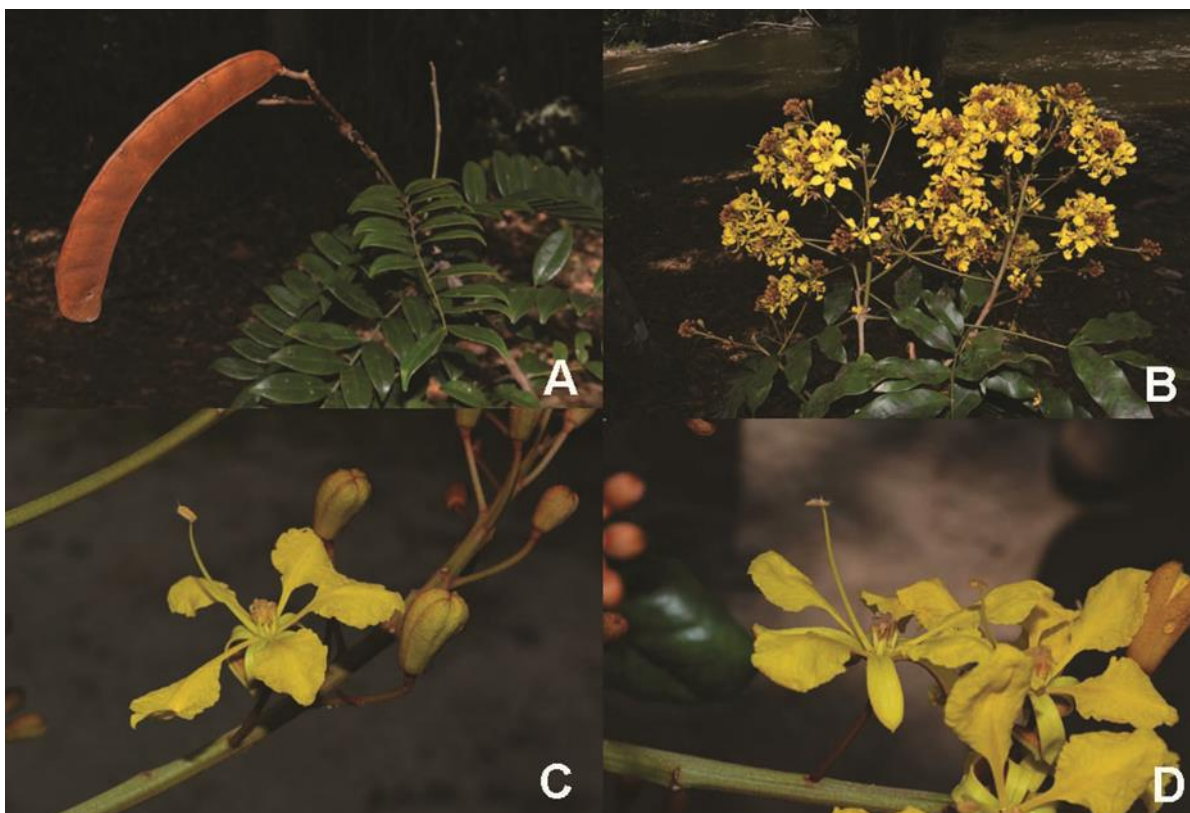


Figura 4: Características morfológicas de *Moldenhawera*: Fruto do tipo legume (A); Inflorescência racemosa (B); Flores amarelas com o androceu dimórfico (C e D). Fotos L. P. Queiroz, 2015.



Figura 5: Características morfológicas de *Moldenhawera*: Pétalos franjadas (A); Hábito arbóreo (B); Estípulas pinadas (C). Fotos: C. V. Vivas, 2013.

São reconhecidas 10 espécies para o gênero (*M. polysperma*, *M. papillanthera*, *M. floribunda*, *M. acuminata*, *M. luschnathiana*, *M. emarginata* (Spreng.) L. P. Queiroz e Allkin, *M. nutans*, *M. brasiliensis*, *M. intermedia*, e *M. blanchetiana* (QUEIROZ et al., 1999; LEWIS e QUEIROZ, 2010) (Figuras 6 - 8). *Moldenhawera blanchetiana* apresenta duas variedades (*M. blanchetiana* var. *blanchetiana* e *M. blanchetiana* var. *multijuga* L. P. Queiroz, G. P. Lewis e Allkin), as quais são diferenciadas principalmente pela forma, tamanho e o número dos folíolos (QUEIROZ et al. 1999) (Figura 9).



Figura 6: Ramo com frutos em *Moldenhawera brasiliensis* (A) e a inflorescência de *Modenhawera nutans* (B). Fotos: C. V. Vivas, 2013.



Figura 7: Inflorescência pseudopaniculada em *Moldenhawera blanchetiana* (A) e *Moldenhawera luschnathiana*. (B). Fotos: C. V. Vivas, 2015.



Figura 8: Ramo com frutos em *Moldenhawera luschnathiana* (A) e *Moldenhawera* sp. (B). Fotos: C. V. Vivas, 2013.

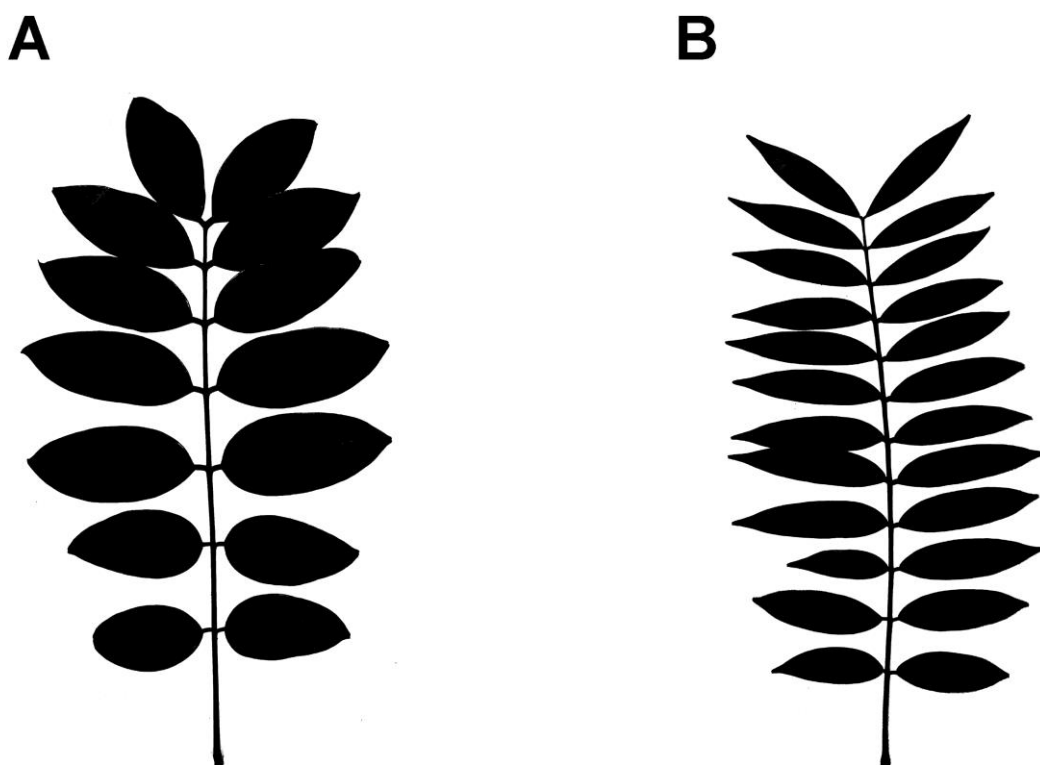


Figura 9: Características foliares das variedades de *Moldenhawera blanchetiana*: *Moldenhawera blanchetiana* var. *blanchetiana* (A) e *M. blanchetiana* var. *multijuga* (B). C. V. Vivas, 2016.

2.3 Aplicação de ferramentas genéticas na identificação e na resolução de problemas taxonômicos de angiospermas

A taxonomia das angiospermas baseia-se em dados morfológicos consistentes para tal fim (JUDD et al., 2008). No entanto, em táxons com diversificação recente ou com lentas taxas de diversificação morfológica, entidades que num primeiro momento são sustentadas com base em caracteres morfológicos, podem mostrar inconsistências taxonômicas pela não correlação entre o padrão morfológico observado e a evolução desses caracteres (SWENSON e ANDERBERG, 2005; SWENSON et al., 2008; VIVAS et al., 2014). Dessa forma, a ausência de dados morfológicos adequados para a delimitação de um determinado táxon, muitas vezes resulta em incertezas taxonômicas. Nesse contexto, dados ecológicos e genéticos podem auxiliar na resolução desses problemas taxonômicos (BARBOSA et al., 2012; BORGES et al., 2012). Contudo, excetuando as espécies vegetais usadas como modelos de estudo (ex. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) e algumas espécies com importância econômica (ex.

Lycopersicon esculentum Mill.), a base genética da maioria das características morfológicas é desconhecida (TSUKAYA, 2013). Dessa forma, a genética pode ser empregada de maneira indireta para inferir o isolamento reprodutivo entre duas ou mais entidades taxonômicas (FRANKHAM et al., 2008; JUCHUM et al., 2008).

A citogenética e o tamanho do genoma nuclear, também podem fornecer valiosas informações com potencial para a aplicação na delimitação de espécies vegetais, pois diferenças no cariótipo ou no tamanho do genoma nuclear entre duas entidades taxonômicas podem ser um indício de que exista uma barreira reprodutiva entre elas ou que os descendentes gerados de um possível cruzamento entre estas não sejam férteis (BORGES et al., 2012). Por exemplo, Almeida et al. (2007), utilizaram uma abordagem citogenética para estudar a origem do umbu-cajá, uma árvore frutífera cultivada no nordeste brasileiro, a qual é considerada um híbrido entre as espécies *Spondias mombim* L. (cajá) e *S. tuberosa* Arruda (umbú). Com base nos resultados do bandeamento cromossômico utilizando fluorocromos, da hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) usando sondas ribossômicas (5S e 45S) e da hibridização genômica *in situ* (GISH) eles concluíram que o umbu-cajá não se originou a partir de um cruzamento entre *S. mombim* e *S. tuberosa*, e apesar de demonstrar características cariotípicas próximas dessas duas espécies, possui características próprias que a distinguem das espécies do gênero *Spondias* analisadas nesse estudo. Posteriormente, Machado et al. (2015) descreveram o umbu-cajá (*Spondias bahiensis* P. Carvalho, van den Berg & M. Machado) como uma nova espécie para a ciência.

Com o advento das técnicas de sequenciamento de DNA e da PCR (*polymerase chain reaction*) entre as décadas de 70 e 80 do século passado, muitos marcadores moleculares puderam ser desenvolvidos, como o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*), SSR (*Simple Sequence Repeat* ou microssatélites) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), que foram ou ainda são aplicados em estudos genéticos, evolutivos ou na taxonomia de plantas (BODO SLOTTA e PORTER, 2006; MEUDT et al., 2009; YU et al., 2013). Alguns desses marcadores caíram em desuso, como os RAPDs, que apresentam baixa reprodutibilidade além de não poderem diferenciar homocigotos de heterocigotos, devido à natureza dominante desse marcador (KUMAR et al., 2009). Meudt et al. (2009), usaram marcadores do tipo AFLP para a delimitação

de espécies do gênero *Ourisia* Comm. ex Juss. com radiação recente. Os resultados foram consistentes com o padrão morfológico observado para as espécies estudadas, auxiliando no estabelecimento de limites entre essas espécies.

Com base na técnica de sequenciamento de DNA, muitas regiões genômicas puderam ser obtidas e empregadas em estudos evolutivos de plantas, como o gene plastidial *rbcL*, o qual codifica a subunidade maior da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase. Este gene possui cerca de 1.400 pb e foi utilizado na inferência da primeira grande filogenia molecular das plantas, realizada por Chase et al. (1993). Linder et al., (2000) utilizaram o espaçador interno transcrito nuclear (ITS) para a identificação de fragmentos de raízes, demonstrando como ferramentas genéticas podem auxiliar a taxonomia. Um método molecular de identificação de espécies foi proposto usando como base sequências de DNA. Este método denominado *DNA barcode*, usa regiões curtas e padronizadas de DNA para a identificação de espécies, foi proposto primeiramente para espécies animais, usando uma porção do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (*COI*) (HERBERT et al., 2003). Em espécies vegetais, três regiões são comumente utilizadas: porções dos genes plastidiais *matk* (maturase K) e *rbcL*, e o espaçador transcrito interno nuclear (ITS) ou uma porção deste, o ITS2 (CBOL Plant working group, 2009; China Plant BOL Group et al., 2011). Por exemplo, Vivas et al. (2014) testaram três regiões plastidiais e o espaçador transcrito interno nuclear (ITS) para a identificação molecular de espécies de Sapotaceae. A região ITS teve o melhor desempenho, identificando 81,3 % das espécies estudadas, além de apontar prováveis problemas taxonômicos entre alguns táxons dessa família.

Na última década, diferentes métodos massivos de sequenciamento de DNA foram desenvolvidos (ex. 454 Roche e HiSeq Illumina), tornando possível o sequenciamento de genomas inteiros em um curto intervalo de tempo, além de permitirem o desenvolvimento de milhares de marcadores do tipo SNPs para os quais há diversos empregos (METZKER, 2010). Em estudos evolutivos/taxonômicos de plantas, esses novos métodos de sequenciamento, por exemplo, permitem a obtenção do genoma plastidial de várias espécies simultaneamente, o qual fornece uma grande quantidade de informação (> 130.000 pb) para uma melhor compreensão das relações evolutivas entre espécies vegetais, e portanto, para a delimitação específica das mesmas (XU et al., 2013). Sanchez-Puerta e Abbona (2014), usando a plataforma de sequenciamento

Hiseq2000 da Illumina obteve o genoma plastidial de *Hyoscyamus niger* L. A partir da comparação do genoma plastidial de *H. niger* com o de outras espécies de Solanaceae, foram identificados três espaçadores plastidiais altamente informativos para a inferência das relações evolutivas entre as espécies da tribo Hyoscyameae. Outro exemplo da aplicação de métodos massivos de sequenciamento de DNA em plantas, é o estudo desenvolvido por Xu et al. (2013) em espécies de algodão. Eles sequenciaram o genoma plastidial de 12 espécies de *Gossypium* L. para investigar a origem e a evolução dos alotetraploides no gênero. O plastoma das espécies de *Gossypium* é bem conservado, porém, frente à quantidade de dados gerados, variação entre os genomas foi observada, e os resultados apontam para a monofilia dos alotetraploides do gênero.

2.3.1 Marcadores microssatélites

Os marcadores microssatélites ou *simple sequence repeats* (SSR), consistem em repetições curtas em tandem de DNA, de um a seis nucleotídeos (Figura 10). São amplamente distribuídos pelo genoma dos eucariotos e possuem tipicamente altas taxas mutacionais, que provocam graduais mudanças no tamanho dos alelos, resultando em um elevado número de alelos por locus, que os tornam bastante informativos (HARDY et al., 2003; OLIVEIRA, et al., 2006).

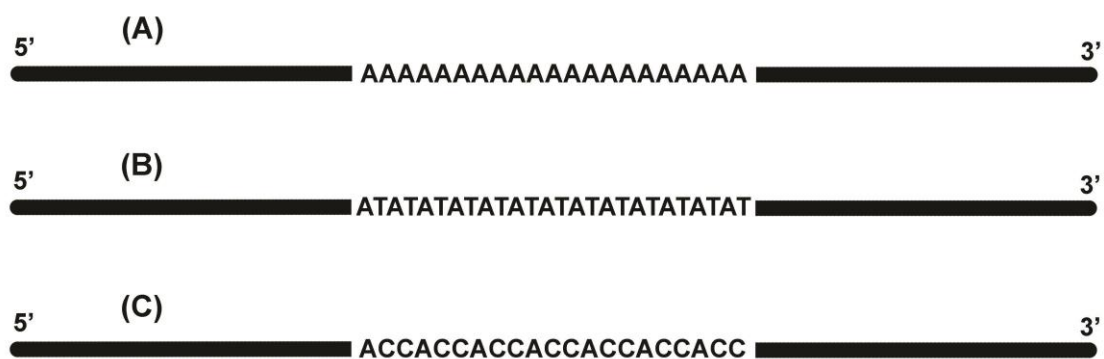


Figura 10: Representação de sequências microssatélites mononucleotídicas (A), dinucleotídicas (B) e trinucleotídicas (C).

Os microssatélites são marcadores codominantes e muito utilizados em estudos populacionais de plantas (GAIOTTO et al., 2003; TARAZI et al., 2013; SANTOS et al., 2015). No entanto, a obtenção desses marcadores, que são desenvolvidos especificamente para a espécie alvo do estudo, era demasiadamente demorada além de

muitas vezes resultarem num baixo número de locos desenvolvidos (MORAES et al., 2013; AMORIM et al., 2014). Atualmente, com o advento das técnicas de sequenciamento massivo de DNA, o desenvolvimento de marcadores microssatélites se tornou menos oneroso e mais rápido, com o potencial de desenvolver um número razoável de loci para uma espécie num intervalo menor de tempo (BORGES et al., 2015; de SOUZA et al., 2015).

Esses marcadores também são úteis em análises que visam inferir de forma indireta o isolamento reprodutivo entre diferentes entidades taxonômicas. Coelho (2010), estudando diferentes morfotipos de *Euterpe edulis* Mart., usando marcadores microssatélites previamente desenvolvidos para esta espécie (GAIOTTO et al., 2001), encontrou uma grande divergência genética entre os dois morfotipos analisados, a qual pode ser consequência de um isolamento reprodutivo entre esses morfotipos. Yu et al. 2013, usaram sete microssatélites nucleares, a região nuclear ITS e duas regiões plastidiais para estudarem a diferenciação genética entre *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn. e *Pugionium dolabratum* Maxim. bem como aplicar esses marcadores na delimitação específica dessas espécies. Os marcadores microssatélites dividiram as amostras estudadas em dois grupos, corroborando com o padrão morfológico observado, entretando, evidências de fluxo gênico entre as duas espécies foi observado.

Pinheiro et al. (2010), realizaram um grande estudo com orquídeas do gênero *Epidendrum* L., investigando o fluxo gênico entre *E. fulgens* Brongn. e *E. puniceoluteum* F. Pinheiro & F. Barros com base em marcadores microssatélites nucleares e plastidiais. *Epidendrum fulgens* e *E. puniceoluteum* diferem quanto ao número cromossômico e nível de ploidia (diploide e tetraploide, com $2n = 2x = 24$ e $2n = 4x = 52$ respectivamente), e ocorrem tanto em simpatria quanto em alopatria. As populações simpátricas apresentaram zonas híbridas e também foram observados sinais de introgressão, preferencialmente de *E. fulgens* para *E. puniceoluteum*. Esses estudos demonstram o potencial da aplicação dos marcadores microssatélites em questões envolvendo a taxonomia e a evolução de espécies vegetais.

2.3.2 Marcadores plastidiais

O genoma plastidial das angiospermas consiste numa molécula circular de DNA, de herança geralmente uniparental, dividido em quatro segmentos: duas sequências repetidas e invertidas, as quais intercalam a grande sequência de cópia única e a

pequena sequência de cópia única (Figura 11) (CLEGG et al., 1994). A estrutura do genoma plastidial é conservada, com cerca de 150.000 pares de base nas angiospermas, variando de 59.190 pb em *Rhizanthella gardneri* R. S. Rogers (DELANNOY et al., 2011) a 176.000 pb em *Vaccinium macrocarpon* Aiton (FAJARDO et al., 2013). Este genoma possui aproximadamente 100 genes, entre tRNAs, proteínas ribossomais e do fotossistema, RNA ribossomal, RNA polimerase, entre outros (CLEGG et al., 1994).

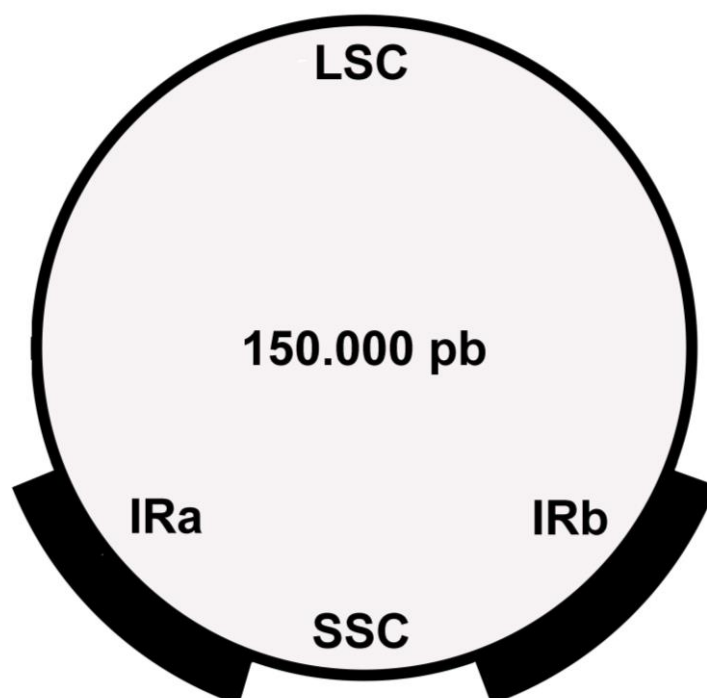


Figura 11: Representação dos quatro segmentos do genoma plastidial de uma angiosperma. As linhas largas mostram as sequências repetidas e invertidas (*IRa* e *IRb*) e as linhas estreitas a grande sequência de cópia única (*LSC* – *Large Single Copy*) e a pequena sequência de cópia única (*SSC* – *Small Single Copy*).

O genoma plastidial possui muitas regiões codificantes e não-codificantes informativas para questões evolutivas, genética de populações e taxonomia. Uma série de três trabalhos listaram as principais e mais informativas regiões não-codificantes plastidiais para plantas, com os primers e as condições de amplificação das mesmas (SMALL et al., 1998; SHAW et al., 2005; SHAW et al., 2007). Em 2009, porções de dois genes plastidiais (*matK* e *rbcL*) foram recomendadas para a identificação molecular de plantas, as quais identificaram nesse estudo 72% das espécies estudadas e 100% dos gêneros (CBOL Plant working group, 2009).

Na resolução de problemas taxonômicos/evolutivos, muitos estudos já foram realizados empregando regiões plastidiais, as quais mostraram resultados satisfatórios para este tipo de abordagem. Por exemplo, o pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), uma espécie arbórea endêmica da Mata Atlântica e símbolo do país, apresenta três morfotipos foliares, que diferem quanto ao tamanho dos folíolos (folíolos pequenos, médios e grandes) e o número de pinas (paripinada ou bipinada). Juchum et al. (2008) utilizaram o íntron do gene plastidial *trnL* para inferir as relações filogenéticas entre essas variantes foliares com outras espécies de *Caesalpinia* bem como alguns gêneros próximos. O íntron do gene *trnL* mostrou-se informativo para a resolução desse problema taxonômico e as análises apontaram que o morfotipo dos folíolos grandes e folhas paripinadas pode representar um táxon distinto dos outros dois morfotipos, que possuem folhas bipinadas e folíolos de tamanho médio ou pequeno.

Barbosa et al. (2012) usaram o espaçador plastidial *rpl32F-trnL* para estudar o complexo de espécies *Vellozia hirsuta* Goethart & Henrard, a qual apresenta uma grande variação morfológica e anatômica. As populações estudadas apresentaram-se estruturadas em quatro grupos os quais não são correlacionados com os padrões morfo-anatômicos observados para este grupo, indicando a existência de uma única espécie com grande variação fenotípica, variação a qual pode ter surgido no decorrer das mudanças climáticas do Pleistoceno.

Fica evidente que os avanços metodológicos nos campos da genética e da biologia molecular das últimas décadas (ex. sequenciamento de DNA, *PCR*, marcadores moleculares, sequenciamento massivo de DNA) contribuíram para uma melhor compreensão acerca da sistemática/evolução das angiospermas, bem como vem auxiliando a taxonomia por meio de estudos de delimitação de complexos de espécies crípticas e da identificação molecular de espécies vegetais (CHASE et al., 1993; NEWMASTER e RAGUPATHYFU, 2009; FU et al., 2011; XU et al., 2013).

Capítulo 1: A new species of *Moldenhawera* (Leguminosae) from Brazilian Atlantic Forest

Artigo publicado no periódico *Phytotaxa*

Fator de Impacto = 1,3

DOI: <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.233.1.7>

A new species of *Moldenhawera* (Leguminosae) from Brazilian Atlantic Forest

CAIO V. VIVAS^{1,3}, FERNANDA A. GAIOTTO¹ & LUCIANO P. QUEIROZ²

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 16, Salobrinho, 45662-900, Ilhéus, BA, Brazil.

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, Brazil.

³Author for correspondence: caiovivas@hotmail.com

Abstract

Moldenhawera is a small genus of caesalpinoid legumes from eastern Brazil, characterized by the presence of T-shaped trichomes, flowers lacking a hypanthium, clawed petals with wrinkled margins, and dimorphic androecium with only one fertile stamen. *Moldenhawera longipedicellata* is described as a new species from the Atlantic Forest phytogeographical domain in Espírito Santo State, Brazil. It is similar to *M. floribunda*, *M. polysperma* and *M. papillanthera* by presenting slender staminodia filaments, longer than the anthers. However, it can be distinguished from those related species by the once-pinnate leaves (vs. bipinnate), flowers with long pedicels (2–5.9 cm long) and larger sepals (16–25 × 4–8 mm) and petals (petal claw 10–19 mm long and petal blade 14–24 × 13–23 mm).

Key words: Atlantic Forest, Caesalpinioideae, *Dimorphandra* clade, Fabaceae, Neotropics.

Introduction

Moldenhawera Schrader (1821: 718) is a small genus of Leguminosae with ten described species (QUEIROZ et al., 1999; LEWIS and QUEIROZ, 2010). The genus was placed in tribe Caesalpinieae in an informal *Peltophorum* group by Polhill and Vidal (1981), but more recent phylogenetic studies have demonstrated that *Moldenhawera* is part of a heterogeneous paraphyletic grade at the base of the Mimosoideae lineage together with *Diptychandra* Tulasne (1843: 139), *Pachyelasma*

Harms (1913: 428), and *Erythrophleum* Afzel. ex Brown (1826: 235) (MANZANILLA and BRUNEAU, 2012).

The genus comprises species of trees and shrubs with biramous (T-shaped) trichomes, compoundly pinnate stipules, a racemose inflorescence, flowers lacking a hypanthium, yellow or pink clawed petals, a dimorphic androecium with only one long fertile stamen with a pubescent connective (all other stamens reduced to short staminodia) and the fruit a woody, dehiscent pod (QUEIROZ et al., 1999). *Moldenhawera* is divided into three sections: section *Moldenhawera* Queiroz et al. (1999: 831), section *Acuminatae* Queiroz et al. (1999: 837), and section *Brasilianae* Queiroz et al. (1999: 838) based on leaf division (once-pinnate or bipinnate), length of staminode filaments, and anther dehiscence of the staminodes (rimose or poricidal).

Moldenhawera is endemic to extra-Amazonian eastern Brazil, from Bahia to Rio de Janeiro states, including Minas Gerais. Additionally one species (*M. acuminata* FERNANDES and BEZERRA, 1982: 58) is disjunct from the main distribution area, occurring in Maranhão state. The major center of diversity is in the Atlantic Forest phytogeographical domain where seven out of the ten species occur (LEWIS and QUEIROZ, 2010).

Leguminosae is the second richest family in the Atlantic Forest and several species have been described from this region in relatively recent times (FORZZA et al., 2010). In the course of taxonomic and phylogenetic studies of *Moldenhawera*, a new species was found in Atlantic Forest of Espírito Santo State. It is here described and illustrated.

***Moldenhawera longipedicellata* C.V. Vivas & L.P. Queiroz, sp. nov. (Fig. 1).**

Moldenhawera longipedicellata belongs to sect. *Moldenhawera* as it shares with *M. floribunda*, *M. papillanthera*, and *M. polysperma* the slender staminode filaments which are much longer than the anthers. It can be differentiated from the remaining species of the section by its once-pinnate leaves (vs. bipinnate or partially bipinnate), the length of its pedicels, 2–5.9 cm long (vs. 1.2–3.2 cm long, QUEIROZ et al., 1999), larger flowers with sepals 16–25 mm long (vs. sepals 7–12 mm long, QUEIROZ et al., 1999), longer petal claws (10–19 mm vs. 4–9 mm long, QUEIROZ et al., 1999), and a wider petal blade (14–24 × 13–23 mm vs. 6–13 × 5–10 mm, QUEIROZ et al., 1999).

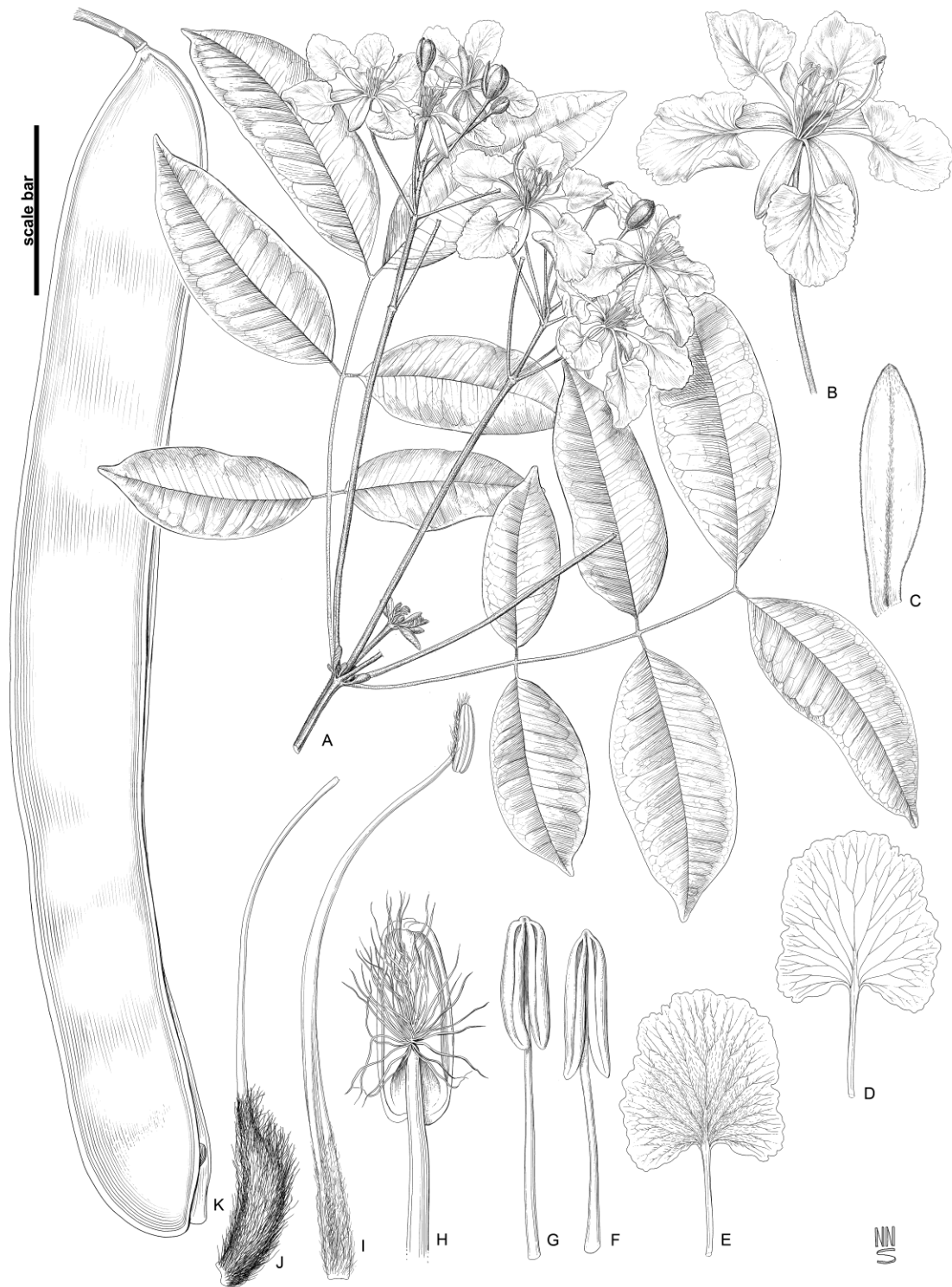


Figure 1. *Moldenhawera longipedicellata*. A. habit [scale bar (SB) = 3.2 cm]; B. flower [SB = 3.1 cm]; C. sepal (front view) [SB = 1.3 cm]; D. petal (front view) [SB = 2.3 mm]; E. petal (dorsal view) [SB = 2.3 mm]; F. staminode (inner whorl) [SB = 6.1 mm]; G. staminode (outer whorl) [SB = 6.1 mm]; H. anther of the fertile stamen showing the villous connective [SB = 1.8 mm]; I. fertile stamen [SB = 6 mm]; J. gynoecium [SB = 6 mm]; K. fruit [SB = 5 cm]. A from Pirani *et al.* 6155, B–J from Fontana *et al.* 2716, K from Boone 246. Drawn by Natanael Nascimento Santos.

Type:—BRAZIL. Espírito Santo: Santa Leopoldina, Chaves, na ES-080, ca. 8 km S da ES-261, num ramal de 1 km de extensão rumo à Cachoeira do Recanto, no Rio da Prata, 564 m, 20°00'04.6" S, 40°32'45.7" W, 22 January 2011, *J.R. Pirani, et al. 6155* (Holotype: HUEFS!, Isotypes: RB!, SPF).

Tree 5–18 m × 13–35 cm DBH; trichomes of two types: short and symmetrical, translucent or ferruginous (on young branches, petiole, leaf rachis, leaflet under surface, inflorescence rachis, pedicels, sepal outer surface, and fruits), and long and asymmetrical, ferruginous (on petal outer surface and ovary). Stipules caducous, pinnately compound, with an axis 2–6 mm long and one or two semicircular segments 4–13 × 3–12 mm. Leaves paripinnate; petiole 6.1–8.4 cm long, cylindrical, slightly flattened along the upper edge, rachis 12.8–26.9 cm long, cylindrical, sulcate along the upper edge, petiolules 5–10 mm long; leaflets opposite, chartaceous to coriaceous, 3–4 pairs per leaf, leaflets increasing in size towards the leaf apex, the basal ones 7.6–10.7 × 3.1–6.7 cm, the distal ones 11–17.5 × 3.9–7.7 cm, elliptic-oblong or narrowly elliptic, base obtuse, apex abruptly acuminate, margins entire, upper surface glabrous, dark green, shiny, lower surface glabrescent with very sparse ferruginous trichomes, venation brochidodromous, the main vein prominent on the lower surface, 14–17 pairs of secondary veins. Inflorescence a corymbose raceme, 11.1–21.6 cm long, usually fasciculate at the branch apex, rarely grouped in a terminal panicle, raceme peduncle 10–15.3 cm long, sulcate, rachis 1.6–6.7 cm long, sulcate; first order bracts (at the base of the raceme) identical to the stipules in shape and size; second order bracts (at the base of the flowers) caducous (only the scars seen); pedicels 2–5.9 cm long. Flower bud obovoid; flowers pentamerous; sepals 16–25 × 4–8 mm, narrowly elliptical or oblanceolate, densely pubescent on the outer surface, glabrous on the inner surface except for a line of translucent or yellow trichomes in the middle of the blade; petals yellow, clawed, the claw 10–19 mm long, blade 14–24 × 13–23 mm, sub-orbiculate, apex rounded, base slightly to deeply cordate, margins irregularly crenate and undulate, outer surface densely pubescent with long asymmetrical ferruginous hairs, inner surface glabrous; fertile stamen 1, filament 18–21 mm long, base villose with yellowish trichomes, anther 2.5–3.1 × 1–1.3 mm, longitudinally dehiscent, glabrous, connective villous with long white hairs; staminodes 9 with slender filaments, anthers dehiscent by short apical slits, glabrous, four stamens of the outer whorl with filaments 9–10 mm long and anthers 4–5 × 1.5–2 mm, five stamens of the inner whorl with filaments 7–9

mm long and anthers 5–6 × 1.7–2 mm; ovary sessile, 5–6 × 2 mm, 9–14 ovulate, densely velutinous with dark ferruginous trichomes, style 14–16 mm long. Legume 23.8–40 × 3.8–4.4 cm, oblong, base obtuse, apex rounded, slightly apiculate, margins straight, slightly ribbed; valves woody, covered by caducous ferruginous trichomes. Seeds 9–14 per pod, 2.3–3.2 × 1.1–2.3 cm, ovate to oblong, flattened, testa smooth.

Additional examined material (paratypes): BRAZIL. Espírito Santo: Cariacica, Reserva Biológica Duas Bocas, 17 January 2009, *A.P. Fontana et al.* 5821 (CEPEC!, MBML, RB!, UPCB). Domingos Martins, 478 m, 20°24'39" S, 40°36'53" W, 10 November 2007, *D.A. Folli* 6186 (HUEFS!, RB!). Domingos Martins, 478 m, 20°24'39" S, 40°36'53" W, 4 August 2008, *D.A. Folli* 6174 (CVRD, RB!). Santa Leopoldina, Cachoeira da Fumaça, 3 June 1984, *W. Boone* 246 (MBML, RB!). Santa Leopoldina, Fazenda Caioaba, 150–250 m, 20°00'21" S, 40°28'06" W, 6 January 2006, *L.F.S. Magnago et al.* 512 (MBML, RB!). Santa Leopoldina, Estrada Santa Tereza - Santa Leopoldina, 528 m, 20°01'14" S, 40°32'20" W, 14 September 2006, *R. Marquete et al.* 3918 (HUEFS!, RB!). Santa Leopoldina, Chaves, Cachoeira Recanto da Mata, 534 m, 20°00'72" S, 40°32'45" W, 26 January 2007, *A.P. Fontana et al.* 2716 (CEPEC!, K, MBML, RB!, SPF). Santa Leopoldina, Cachoeira Recanto da Mata, 544 m, 20°00'14" S, 40°32'77" W, 1 November 2007, *F.L.R. Filardi et al.* 778 (HUEFS!, RB!). Santa Leopoldina, 539 m, 20°00'04" S, 40°32'45" W, 6 September 2013, *C.V. Vivas et al.* 244 (HUEFS!). Santa Leopoldina, 518 m, 20°01'15" S, 40°32'17" W, 6 September 2013, *C.V. Vivas et al.* 245 (HUEFS!). Santa Leopoldina, 488 m, 20°02'46" S, 40°31'54" W, 6 September 2013, *C.V. Vivas et al.* 246 (HUEFS!). Santa Leopoldina, 298m, 20°04'09" S, 40°32'30" W, 6 September 2013, *C.V. Vivas et al.* 247 (HUEFS!).

Distribution and habitat :— *Moldenhawera longipedicellata* is currently known only in the municipalities of Santa Leopoldina, Cariacica and Domingos Martins in Espírito Santo State, eastern Brazil. It occurs in montane rain forest or montane gallery forest at elevations ranging from 150 to 600m (Figure 2).

Etymology :— The species epithet alludes to the long pedicel of the flowers.

Common name :— caingá, caingá-preto.

Phenology :— Flowering January and February, and fruiting from July to September.

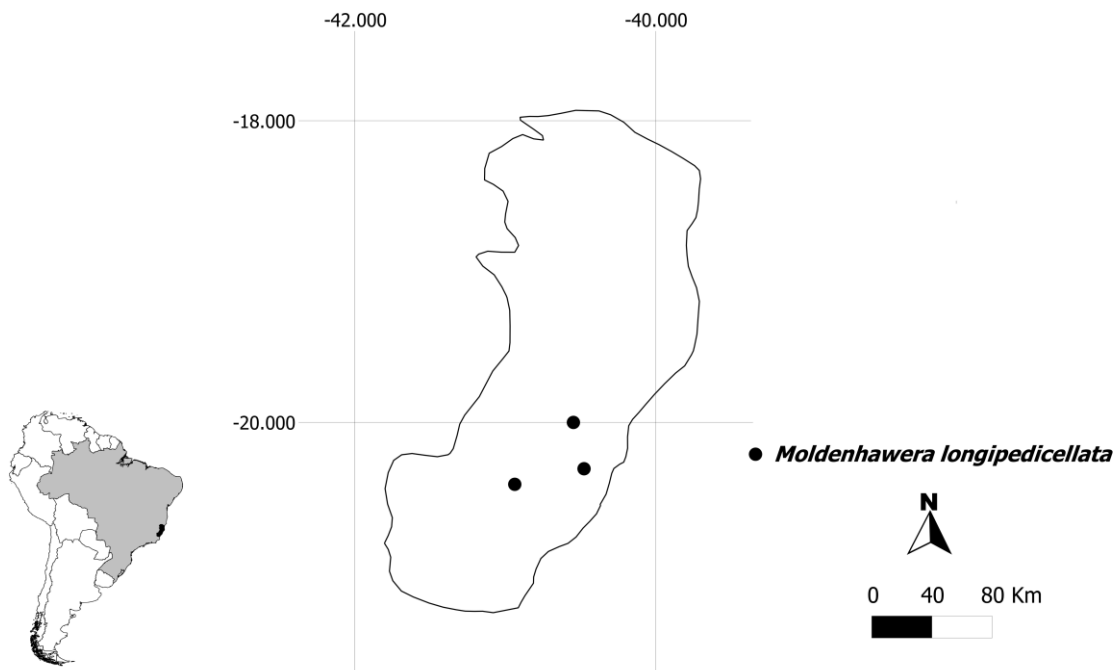


Figure 2. Distribution of *Moldenhawera longipedicellata* in Espírito Santo State, Brazil.

Notes :— *Moldenhawera longipedicellata* can be recognized by the following combination of characters: a tree, leaves once-pinnate with relatively large leaflets (7.6–17.5 × 3.1–7.7 cm), flowers pentamerous, long-pedicellate (pedicel 2–5.9 cm long), with relatively large sepals (16–25 × 4–8 mm), yellow petals with long claws (10–19 mm long) and a wide blade (14–24 × 13–23 mm), the base of the single fertile stamen pubescent, the nine staminodes with anthers dehiscent by short apical slits and slender filaments (1.25–2× longer than the anthers). The presence of long, slender staminode filaments was considered as diagnostic of sect. *Moldenhawera* by Queiroz et al. (1999): the section includes *M. floribunda* Schrader (1821: 718), *M. polysperma* (Vell.) Stellfeld (1948: 28), and *M. papillanthera* Queiroz et al. (1999: 833). *Moldenhawera longipedicellata* is distinguished from all other species of sect. *Moldenhawera* by having once-pinnate leaves, longer pedicels and larger flowers. It is additionally distinguished from *M. floribunda* by having the base of the fertile stamen filament pubescent (vs. glabrous), and from *M. polysperma* and *M. papillanthera* by the staminodes with anthers dehiscent by short apical slits (vs. longitudinally dehiscent in *M. polysperma* and indehiscent in *M. papillanthera*).

Moldenhawera longipedicellata and the other species of sect. *Moldenhawera* occur in evergreen tropical rain forests of the Atlantic Forest phytogeographical domain and are geographically distributed from coastal Bahia to Rio de Janeiro states. However, their distribution ranges do not overlap; *M. polysperma* is restricted to Rio de Janeiro state, *M. floribunda* to Bahia state, *M. papillanthera* to coastal plains of northern Espírito Santo state, and *M. longipedicellata* to montane rain forests of central-southern Espírito Santo between 150–600 m elevation.

Acknowledgements

We thank Natanael Nascimento Santos for the high quality illustration, the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research funding (SISBIOTA Grant# PES0051/2011), and FAPESB and CNPq for scholarships to CVV, FAG and LPQ.

References

- Brown, R. (1826). *Narrative of Travels and Discoveries in Nothern and Central Africa*. Murray, London, 440 pp.
- Fernandes, A. & Bezerra, P. (1982). *O genero Moldenhawera (Leguminosae-Caesalpinioideae) no Brasil - uma nova espécie*. Anais da Sociedade Botânica do Brasil, XXXII Congresso Nacional de Botânica, Terezina, pp. 58–62.
- Forzza, R.C., Baumgratz, J.F.A., Costa, A., Hopkins, M., Leitman, P.M., Lohmann, L.G., Martinelli, G., Morim, M.P., Coelho, M.A.N., Peixoto, A.L., Pirani, J.R., Queiroz, L.P., Stehmann, J.R., Walter, B.M.T. & Zappi, D. (2010) As Angiospermas do Brasil. *In*: Forzza, R.C., Baumgratz, J.F.A., Bicudo, C.E.M., Carvalho Jr, A.A., Costa, A., Costa, D.P., Hopkins, M., Leitman, P.M., Lohmann, L.G., Maia, L.C., Martinelli, G., Menezes, M., Morim, M.P., Coelho, M.A.N., Peixoto, A.L., Pirani, J.R., Prado, J., Queiroz, L.P., Souza, V.C., Stehmann, J.R., Sylvestre, L.S., Walter, B.M.T. & Zappi, D. (Eds.) *Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil*, v. 1. Andrea Jakobsson Estúdio, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp. 78–89.
- Lewis, G.P. & Queiroz, L.P. (2010). *Moldenhawera intermedia* (Leguminosae: Caesalpinioideae), a new species from the Brazilian state of Bahia. *Kew Bulletin* 65: 205–207.
- Harms, H.A.T. (1913). Leguminosae Africanae. VI. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 49: 419–454.
- Manzanilla, V. & Bruneau, A. (2012). Phylogeny reconstruction in the Caesalpinieae grade (Leguminosae) based on duplicated copies of the sucrose synthase gene and plastid markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65: 149–162.
- Polhill, R.M. & Vidal, J.E. (1981). Tribe Caesalpinieae. *In*: Polhill, R.M. & Raven, P.H. (Eds.), *Advances in Legume Systematics*, part 1. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 81–95.
- Queiroz, L.P., Lewis G.P. & Allkin R. (1999) A revision of the genus *Moldenhawera* Schrad. (Leguminosae–Caesalpinioideae). *Kew Bulletin* 54: 817–852.
- Schrader, H.A. (1821). *Moldenhawera*. *Göttingische Gelehrte Anzeigen* 1:718.
- Stellfeld, C. (1948). *Os novos gêneros e as novas espécies de Freire Allemão*. Irmãos Pongetti editores, Rio de Janeiro, 66 pp.

Tulasne, L.R.E. (1843). Nova quedam proposit genera in Leguminosarum classe.
Annales des Sciences Naturelles, Botanique 20: 136–144.

Capítulo 2: *Moldenhawera congestiflora*: a new species of Leguminosae from the Brazilian Atlantic Forest.

**Artigo a ser submetido ao periódico *Phytotaxa*
Fator de Impacto = 1,3**

***Moldenhawera congestiflora*: a new species of Leguminosae from the Brazilian Atlantic Forest**

CAIO VINICIUS VIVAS¹, GUSTAVO SOUZA², FERNANDA AMATO GAIOTTO¹
& LUCIANO PAGANUCCI DE QUEIROZ³

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 16, Salobrinho, 45662-900, Ilhéus, BA, Brazil. Email: caiovivas@hotmail.com

²Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

³Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, Brazil. Email: luciano.paganucci@gmail.com

Abstract

We described and illustrated a new species of *Moldenhawera* from the Brazilian Atlantic Forest. *Moldenhawera congestiflora* is distinguished from other species of the section *Brasilianae* by the combination of the tree habit, leaves relatively long (rachis > 24 cm long), leaflets elliptic to oblong with apex acuminate, flower bud densely grouped at the inflorescence apex, flowers pentamerous, petal blades relatively small (6–8 × 4–5 mm), and base of the fertile stamen villose. Additionally we provide a new identification key for the section *Brasilianae*.

Key words: Atlantic Forest, Caesalpinioideae, Fabaceae, taxonomy

Introduction

Moldenhawera Schrader (1821:718) is a small genus of the caesalpinoid legume tribe Caesalpinieae (Lewis et al. 2005). It presents an extra-Amazonian distribution in the Cerrado, Caatinga and Atlantic Forest phytogeographic domains (Queiroz et al. 1999). The Atlantic Forest harbors the center of diversity for this genus with eight out of the eleven known species (Queiroz et al. 1999, Lewis & Queiroz 2010, Vivas et al. 2015). The genus is diagnosed by biramous (T-shaped) trichomes, compoundly pinnate stipules, flowers lacking a hypanthium, dimorphic androecium with one fertile stamen and seven or nine staminodes, and anther of the fertile stamen with a pubescent connective. It is divided into three sections: *Acuminatae* Queiroz et al. (1999: 837), *Brasilianae* Queiroz et al. (1999: 838) and *Moldenhawera*, based mainly on leaf

division, length and thickness of staminode filaments, and anther dehiscence of the staminodes (Queiroz et al. 1999).

In the course of taxonomic and genetic studies in the genus of *Moldenhawera*, we found specimens with a morphological discontinuity in relation to the described species of this genus that are being proposed as a new species from the Atlantic forest of Bahia. Additionally, we provided a new identification key for the section *Brasilianae*.

***Moldenhawera congestiflora* C.V. Vivas & L.P. Queiroz, sp. nov. (Fig. 1).**

Moldenhawera congestiflora is similar to *M. blanchetiana* Tul. and *M. luschnathiana* Yakovlev by the arboreal habit (trees > 3 m), once pinnate leaves, staminodes with thickened and fleshy filaments with anthers dehiscent by short apical slits. This new species differs from *M. blanchetiana* by its longer leaves (rachis 24–51.8 cm vs. 7.3–17.5 cm long, Queiroz et al. 1999), leaflets slightly decrescent towards both ends (vs. leaflets increasing in size towards the leaf apex), leaflet size (the basal ones 9–12.8 × 3.1–4.8 cm vs. 3.7–4.4 × 1.9–2.3 cm, Queiroz et al. 1999), flower bud densely grouped at the inflorescence apex (vs. flower bud sparse in the inflorescence apex), small petals (claw 4–7 mm long and blade 6–8 × 4–5 mm vs. claw 6–10 mm long, blade 10–16 × 8–18 mm, Queiroz et al. 1999), and base of the fertile stamen villose (vs. base of the fertile stamen glabrous). *Moldenhawera congestiflora* is distinguished from *M. luschnathiana* by the leaflet margin plane (vs. revolute), leaflet apex acuminate (vs. rounded, rarely obtuse, emarginate), flower bud densely grouped at the inflorescence apex (vs. flower bud sparse in the inflorescence apex), small petals blade (blade 6–8 × 4–5 mm vs. 13–20 × 12–16 mm, Queiroz et al. 1999), and fruit suture (not winged vs. winged).

TYPE:—BRAZIL. Bahia: Igrapiúna, Cachoeira de Pancada Grande, na trilha acima da cachoeira. 13°47'08" S, 39°10'31" W. Elev. 94 m, 25 November 2015, L.P. Queiroz 16185 (holotype: HUEFS!, isotypes: CEPEC!, K!, NY!, RB!).

Trees 5–16 m × 14–28 cm DBH. biramous (T-type) trichomes of two kinds: short and symmetrical, translucent or ferruginous (on young branches, petiole, leaf rachis, leaflet under surface, inflorescence rachis, pedicels, sepal outer surface, and fruits); long and asymmetrical ferruginous (on petal outer surface and ovary). Stipules caducous, pinnately compound, with an axis 2–4.7 mm long and one or two semicircular-orbicular

segments 4–18 × 6–19 mm. Leaves alternate, opposite or verticillate, paripinnate; petiole 3–13 cm long, cylindrical, slightly flattened along the upper edge, rachis 22–51.8 cm long, cylindrical, slightly sulcate along the upper edge, petiolules 3–7 mm long; leaflets 6–9 pairs, opposite, chartaceous to coriaceous, slightly decrescent towards both ends, the basal ones 9–12.8 × 3.1–4.8 cm, the middle ones 12.7–16.2 × 3.6–4.9 cm, the distal ones 8.7–12.1 × 2.8–4.2 cm, elliptic to oblong, base obtuse, margins plane, apex acuminate, upper surface glabrous, dark green, lower surface glabrous or glabrescent with very sparse ferruginous trichomes, the main vein prominent on the lower surface, secondary veins brochidodromous, 11–14 pairs. Inflorescence units racemes, 6–13 cm long, somewhat corymbose, the flowers arranged towards the apex, the racemes 2–3 fascicled in a terminal panicle, 24–51.8 long, sessile or with a peduncle 8–13 cm long; bracts at the base of the racemes identical to the stipules in shape and size; bracts at the base of the flowers setaceous, semi-persistent; pedicels 1.8–2.5 cm long. Flower bud obovoid; flowers pentamerous; sepals subequal, 10–13 × 2–2.5 mm, narrowly elliptical or oblanceolate, densely pubescent on the outer surface, glabrous on the inner surface; petals yellow, clawed, the claw 4–7 mm long, blade 6–8 × 4–5 mm, ovate or subquadratic, apex acute, obtuse or rounded, base truncated, margins irregularly fringed to crenate, outer surface densely pubescent with ferruginous trichomes, inner surface glabrous; fertile stamen 1, filament 16–17 mm long, base villose with yellowish trichomes, anther 2–2.5 × 1.2–1.8 mm, longitudinally dehiscent, glabrous, connective villous with long white hairs; staminodes 9 with thickened and fleshy filaments, anthers dehiscent by short apical slits, glabrous, four stamens of the outer whorl with filaments 5–6 mm long and anthers 2–2.5 × 1.2–1.8 mm, five stamens of the inner whorl with filaments 4–5 mm long and anthers 3 × 1.5–2 mm; ovary sessile, 4–4.45 × 2 mm, 8–9 ovulate, densely velutinous with dark ferruginous trichomes, style 14–15 mm long. Legume 23.3–25.7 × 3.7–4 cm, oblong, base obtuse, apex rounded, margins straight, slightly thickened; valves woody, glabrous. Seeds 7–8 per pod, 2–2.2 × 1.5–1.7 cm, ovate to oblong, flattened, testa smooth.

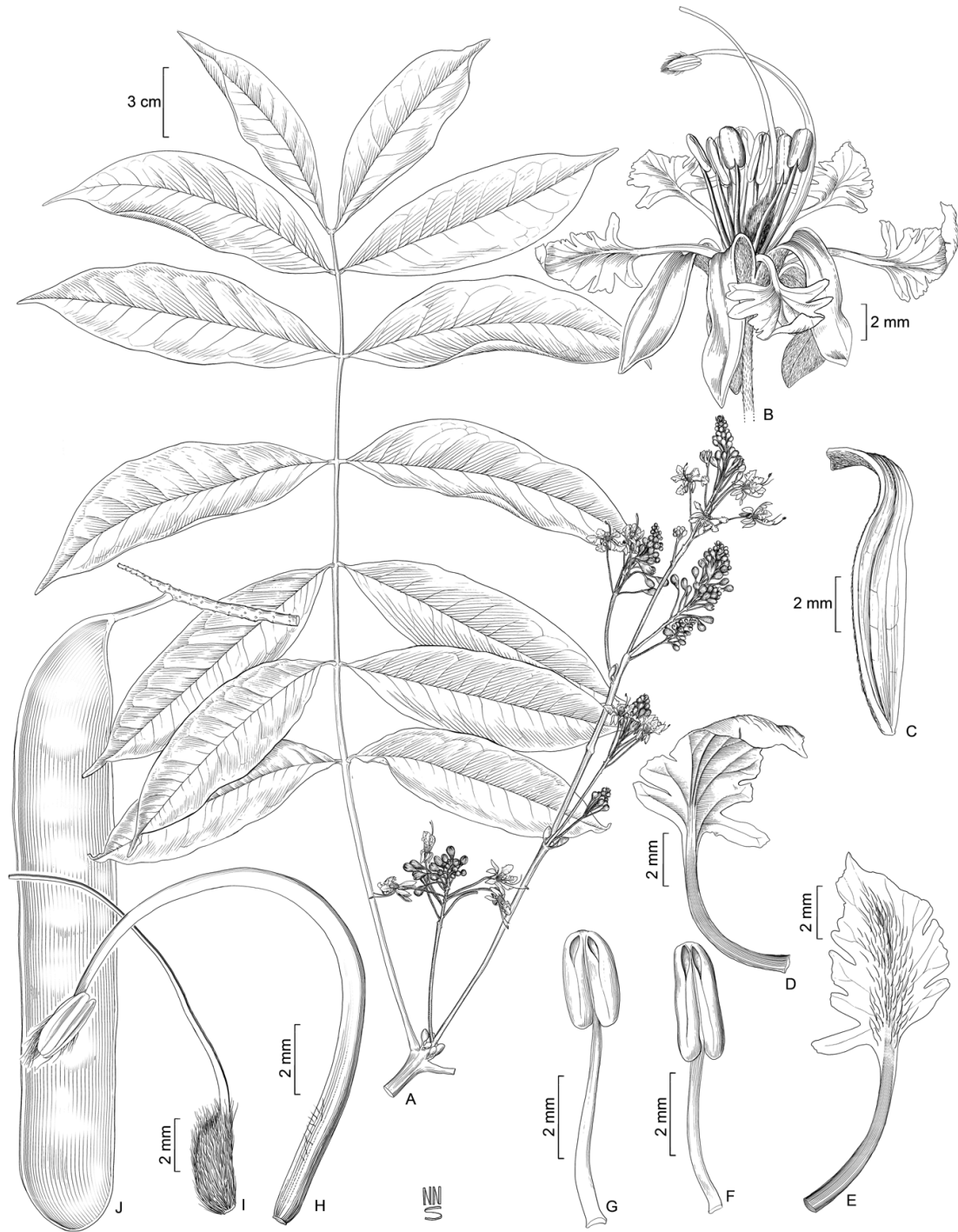


FIGURE 1. *Moldenhawera congestiflora*. A. Flowering branch; B. flower; C. sepal (inner view); D. petal (inner view); E. petal (outer view); F. staminode (inner whorl); G. staminode (outer whorl); H. fertile stamen; I. gynoecium; J. fruit. A–I from *Vivas & Bezerra 268*, J from *Fiaschi et al. 2132*. Drawn by Natanael Nascimento Santos.

Additional examined material (paratypes)—BRAZIL. Bahia: Igrapiúna, Reserva Ecológica da Michelin, 13°47'25" S, 39°10'42" W, 21 September 2014, *C.V. Vivas & J.L. Paixão* 259 (HUEFS). Igrapiúna, Reserva Ecológica da Michelin, 13°47'27" S, 39°10'43" W, 21 September 2014, *C.V. Vivas & J.L. Paixão* 260 (HUEFS). Igrapiúna, Reserva Ecológica da Michelin, 13°47'53" S, 39°10'51" W, 21 September 2014, *C.V. Vivas & J.L. Paixão* 261 (HUEFS). Igrapiúna, Reserva Ecológica da Michelin, 80 m, 13°47'29" S, 39°10'44" W, 31 January 2015, *C.V. Vivas & R.A. Bezerra* 268 (HUEFS). Valença, RPPN Água Branca, 220 m, 13°19'44" S, 39°5'25" W, 28 March 2004, *P. Fiaschi et al.* 2132 (CEPEC). Valença, RPPN Água Branca, 66 m, 13°19'48" S, 39°5'30" W, 12 December 2012, *C.V. Vivas & J.L. Paixão* 234 (HUEFS). Valença, RPPN Água Branca, 13°19'47" S, 39°5'29" W, 22 September 2014, *C.V. Vivas & J.L. Paixão* 263 (HUEFS). Valença, RPPN Água Branca, 13°19'47" S, 39°5'29" W, 22 September 2014, *C.V. Vivas & J.L. Paixão* 264 (HUEFS).

Distribution and habitat: *Moldenhawera congestiflora* is known only in the rainforest from Bahia state at elevations 60–220 m, in the municipalities of Igrapiúna and Valença (Figure 2). It is associated with riparian forest and occurs in small populations in the two sites of known collection.

Etymology: The species epithet alludes to the flower bud densely grouped in the inflorescence apex.

Phenology: Flowering November to March, and fruiting from September to March.

Notes :— *Moldenhawera congestiflora* can be recognized by the combination of tree habit, leaves relatively long (rhachis 24–51.8 cm long), flower bud densely grouped in the inflorescence apex, flowers pentamerous, yellow petals with small blades (6–8 × 4–5 mm), the base of the single fertile stamen pubescent, thickened and fleshy filaments of the staminodes, and the nine staminodes with anthers dehiscent by short apical slits. This species belongs to sect. *Brasilianae* together with *M. blanchetiana* Tulasne (1844: 158), *M. luschnathiana* Yakovlev (1975: 220), *M. emarginata* (Spreng.) L.P. Queiroz & Allkin (1997: 107), *M. nutans* Queiroz et al. (1999: 844) and *M. brasiliensis* Yakovlev (1975: 220), by presenting once pinnate leaves, staminodes with thickened and fleshy filaments and with anthers dehiscent by short apical slits.

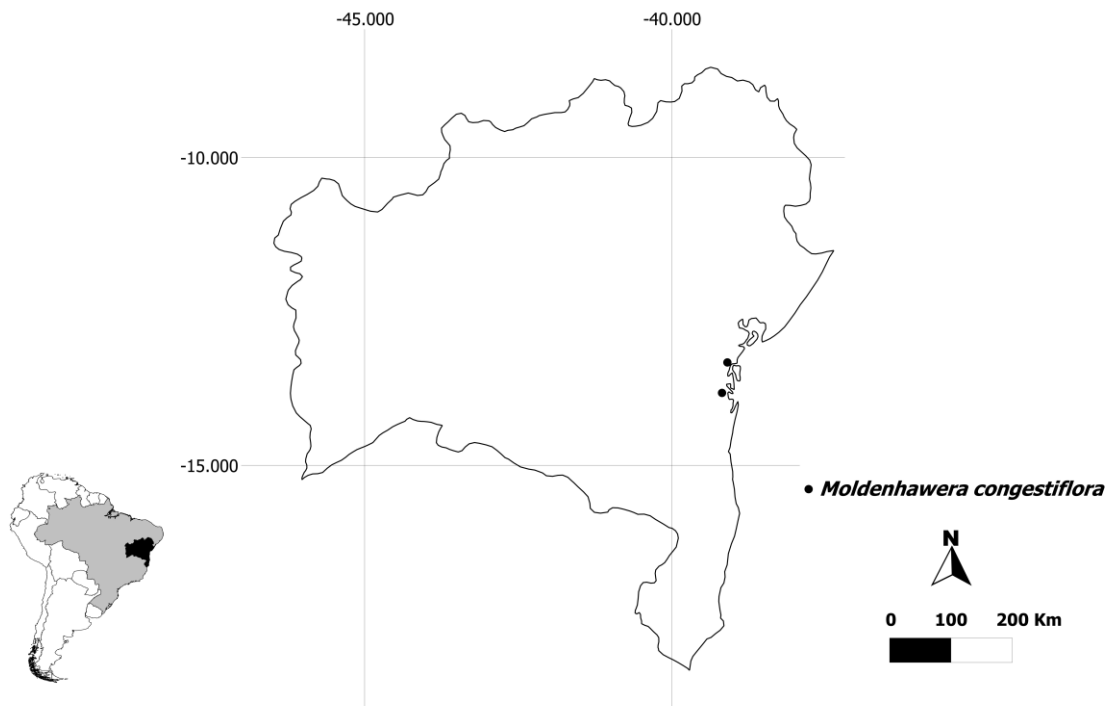


FIGURE 2. Distribution of *Moldenhawera congestiflora* in Bahia State, Brazil.

The first specimen collected from *M. congestiflora* was misidentified as *M. blanchetiana*, of which differs by its longer leaves (rhachis > 24 cm vs. < 24 cm long), leaf configuration (leaflets slightly decrescent towards both ends vs. leaflets increasing in size towards the leaf apex), leaflet size (the basal ones 9–12.8 × 3.1–4.8 cm vs. 3.7–4.4 × 1.9–2.3 cm, Queiroz et al. 1999), flowers distribution in the inflorescence (densely grouped at the inflorescence apex vs. sparse in the inflorescence apex), small petals blade (6–8 × 4–5 mm vs. 10–16 × 8–18 mm, Queiroz et al. 1999), and base surface of the fertile stamen (pubescent vs. glabrous). This species is also related to *M. luschnathiana*, of which differs by leaflet margin (plane vs. revolute), leaflet apex (acuminate vs. rounded, rarely obtuse, emarginate), flowers distribution in the inflorescence (densely grouped at the inflorescence apex vs. sparse in the inflorescence apex), small petals blade (blade 6–8 × 4–5 mm vs. 13–20 × 12–16 mm, Queiroz et al. 1999), and fruit suture (not winged vs. winged).

Moldenhawera congestiflora is restricted to gallery forests in central-eastern Bahia state, in the municipalities of Igrapiúna and Valença. It occurs in sympatry with

M. floribunda Schrader (1821: 718) and *M. blanchetiana*. *Moldenhawera congestiflora* is easily differentiated from *M. floribunda* (sect. *Moldenhawera*) by leaves pinnate (vs. bipinnate), staminodes with thickened and fleshy filaments (vs. slender filaments).

Key to the species of *Moldenhawera* sect. *Brasilianae*.

1. Leaflet margin revolute ... 2

- Leaflet margin plane ... 3

2. Trees 5+ m high; filament of the fertile stamen glabrous; pod with upper margin winged ... *M. luschnathiana*

- Mostly shrubs, < 3 m high; filament of the fertile stamen villose at the base; pod not winged ... *M. nutans*

3. Flower tetramerous ... *M. brasiliensis*

- Flower pentamerous ... 4

4. Shrubs, < 3 m high; inflorescence an axillary raceme, usually solitary; species endemic from Cadeia do Espinhaço in the state of Minas Gerais ... *M. emarginata*

- Trees 3+ m high; inflorescence a panicle unit, racemes usually fasciculate; species endemic from Atlantic Forest in the state of Bahia ... 5

5. Leave rachis < 24 cm long; leaflets increasing in size towards the leaf apex; flower buds evenly distributed in the raceme axis; base of the fertile stamen glabrous ... *M. blanchetiana*

- Leave rachis > 24 cm long; leaflets slightly decrescent towards both ends; flower buds densely grouped in the inflorescence apex; base of the fertile stamen villose ... *M. congestiflora*

Acknowledgements

We thank José Lima da Paixão, Rodrigo Alves Bezerra and Reserva Ecológica da Michelin for support in the field, Natanael Nascimento Santos for illustration, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research funding (SISBIOTA

Grant# PES0051/2011), and FAPESB and CNPq for scholarships to CVV, FAG and LPQ.

References

- Boissier, P.E. (1839). *Voyage botanique dans le midi de l'Espagne*. Gide, Paris, 2: 237.
- Brown, R. (1826). *Narrative of Travels and Discoveries in Nothern and Central Africa*. Murray, London, 440 pp.
- Lewis, G.P. & Queiroz, L.P. (2010). *Moldenhawera intermedia* (Leguminosae: Caesalpinioideae), a new species from the Brazilian state of Bahia. *Kew Bulletin* 65: 205–207.
- Lewis, G.P., Schrire, B., Mckinder, B., Lock, J.M. (2005). *The Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, 577 pp.
- Queiroz, L.P. (1997). Novas combinações em *Moldenhawera* Schrad. e *Cratyliia* Mart. ex Benth. e uma nova variedade de *Zornia brasiliensis* Vog. (Leguminosae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 16: 107–109.
- Queiroz, L.P., Lewis, G.P. & Allkin, R. (1999) A revision the genus *Moldenhawera* Schrad. (Leguminosae–Caesalpinioideae). *Kew Bulletin* 54: 817–852.
- Schrader, H.A. (1821). *Moldenhawera*. *Göttingische Gelehrte Anzeigen* 1:718.
- Tulasne, M. L.-R. (1844). Légumineuses Arborescentes de l' Amérique du Sud. *Archives du Muséum d'Histoire Naturelle* 4: 158–160.
- Vivas, C.V., Gaiotto, F.A. & Queiroz, L.P. (2015) A new species of *Moldenhawera* (Leguminosae) from Brazilian Atlantic Forest. *Phytotaxa* 233: 085–089.
- Yakovlev, G.P. (1975). New species of *Moldenhawera* Schrad. *Botaničeskii Žhurnal (Moscow & Leningrad)* 60 (2): 219–220.

Capítulo 3: Development of microsatellite markers in *Moldenhawera blanchetiana* and their transferability to *M. luschnathiana* (Fabaceae)

Artigo publicado no periódico *Conservation Genetics Resources*

DOI:10.1007/s12686-014-0351-0

Fator de Impacto = 1,17

Development of microsatellite markers in *Moldenhawera blanchetiana* and their transferability to *M. luschnathiana* (Fabaceae)

CAIO VINICIUS VIVAS¹, CÁSSIO VAN DEN BERG², LUCIANO PAGANUCCI de QUEIROZ², FERNANDA AMATO GAIOTTO^{1,3}

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 16, Salobrinho, 45662-900, Ilhéus, BA, Brazil.

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, Brazil.

³Corresponding author: gaiotto@uesc.br

ABSTRACT

The first microsatellite (SSR) markers were developed for *Moldenhawera blanchetiana* and transferred to *M. luschnathiana*, two species endemic to the Atlantic Forest, Brazil. Sixteen loci for *M. blanchetiana* were characterized, 15 of which showed high levels of heterozygosity ($He = 0.645$ and $Ho = 0.559$). The fifteen loci were transferred to *M. luschnathiana* where 14 were polymorphic ($He = 0.567$ and $Ho = 0.550$). The average numbers of alleles per locus was 6.6 for *M. blanchetiana* and 4.5 for *M. luschnathiana*. High values of the combined exclusion probability ($Q > 0.999$, for both species) demonstrated the potential of these loci for paternity testing. These microsatellite markers are useful tools for performing genetic and evolutionary studies as well as for the management and conservation of populations of these two species.

Keywords: SSR, Conservation genetics, Transferability, NGS, Atlantic Forest.

Moldenhawera is a genus of Fabaceae that is restricted to eastern Brazil. Ten species and 11 taxa are recognized, distributed in the Atlantic Forest, Cerrado, and Caatinga phytogeographic domains in areas under anthropogenic disturbances (QUEIROZ, et al., 1999). *Moldenhawera blanchetiana* Tul. and *M. luschnathiana* Yakovlev are tree species endemic to the rain forests of the Atlantic Forest in the state of Bahia, Brazil. Here, we report the development of 16 microsatellite (simple sequence repeat, SSR) markers for *M. blanchetiana* and transferability of 15 of these loci in *M. luschnathiana*, which will allow genetic and evolutionary studies as well as assist in designing conservation strategies for these species in the coastal Atlantic forests.

We extracted DNA from a single *M. blanchetiana* individual (voucher Vivas, 230 HUEFS) using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB 2%) method, for genomic library construction. The library was enriched with (AC)_n and (AG)_n DNA probes and sequenced using 454 pyrosequencing technology (Ecogenics GmbH, Schlieren, Switzerland). Thirty primer pairs were tested, but only 16 were successfully amplified in *M. blanchetiana* (n = 28), and 15 of them were transferred to *M. luschnathiana* (n = 20) (Table 1). The PCR reaction mixtures consisted of 1x buffer (Phoneutria, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), 1 unit Taq DNA polymerase (Phoneutria), template DNA (7.5 ng), 3.25 mM of each dNTP, BSA (3.6 µg), MgCl₂ (20 mM), 3.9 mM of reverse primer, 3.9 mM of forward primer with 19bp of M13 sequence (CACGACGTTGTAAAACGA) added to the 5' end, 1.43 mM of an M13-labeled tail with fluorochrome (6-FAM, VIC, PET, or NED, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and ultra-pure water to a final volume of 13 µL. We tested different annealing temperatures (48°C–64°C) for each primer pair, and for the amplification reaction we used the following PCR program: 94°C for 1 min, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, T_a (°C) (Table 1) for 1 min, 72°C for 1 min, then 8 cycles at 94°C for 1 min, 53°C for 1 min, 72°C for 1 min, and an additional cycle at 72°C for 10 min. The amplicons were separated by capillary electrophoresis in multiload systems on an ABI 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems) and analyzed using Gene Marker version 2.6.0 (SoftGenetics, State College, Pennsylvania, USA).

We estimated the number of alleles per locus (*A*), observed heterozygosity (*H_o*), expected heterozygosity (*H_e*), and paternity exclusion probability (*Q*) using CERVUS version 3.0.3 (KALINOWSKI, et al., 2007), linkage disequilibrium using FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2002), and deviation from Hardy–Weinberg equilibrium using GenAEx 6.4 (PEAKALL and SMOUSE, 2006). Fifteen loci were polymorphic in *M. blanchetiana*, with an average of 6.6 alleles per locus. The observed heterozygosity ranged from 0 to 1 and the expected heterozygosity ranged from 0 to 0.902 (Table 1). Transferability to *M. luschnathiana* was successful (15 loci), possibly because both species are closely related. Fourteen of the 15 loci were polymorphic and there was considerable variation in the number of alleles, observed heterozygosity, and expected heterozygosity in *M. luschnathiana* (Table 1). No linkage disequilibrium between loci was observed in either species, but seven loci that deviated from Hardy–Weinberg equilibrium were detected in *M. blanchetiana* and *M. luschnathiana* (Table 1). The high

value of the combined exclusion probability for both species (more than 0.999), indicates that these loci will be powerful tools for paternity testing.

These are the first microsatellite markers developed for *M. blanchetiana* and transferred to *M. luschnathiana*. They are highly informative, and potentially applicable to genetic, evolutionary, and conservation studies of these species.

Table 1 Characteristics of 16 microsatellite (SSR) markers developed for *Moldenhawera blanchetiana* and their transferability to *M. luschnathiana*.

Locus	GenBank ID	Repeat motif	Primer sequence 5' - 3'	T _a (°C)	Size range (bp)	<i>Moldenhawera blanchetiana</i>					<i>Moldenhawera luschnathiana</i>				
						A	Ho	He	Q	HWE	A	Ho	He	Q	HWE
MOL01	KM044822	(CA) ₂₁	F: ACGCTGTAAGTCTGGCTG R: GTCGATCATAACCATTACTATGTCTCTC	57	151–207	14	0.577	0.830	0.864	ns	8	0.600	0.850	0.838	ns
MOL03	KM044823	(AC) ₁₄	F: TTGCTGCCATTAGAGTGTGG R: AAACCAAGGGCCCAGGATAC	53	168–172	3	0.185	0.237	0.207	ns	5	0.684	0.707	0.640	ns
MOL08	KM044824	(CA) ₁₆	F: TTCCTAGGCTGAGTTGGGTC R: ACCCACAGGGAGAATCAGTAG	58	231–275	10	0.571	0.742	0.724	ns	10	0.900	0.867	0.868	ns
MOL10	KM044825	(AC) ₁₄	F: TCCATGTGGAGAACACGAGC R: CAGTTGGAGCTTCTTGCCAG	52	103–115	6	0.964	0.715	0.645	*	7	0.800	0.853	0.833	ns
MOL11	KM044826	(GT) ₁₃	F: ACTAGGCTCTGTTGTGGTGG R: GCAGATGCAGAGCAACATTTTC	57	167–199	3	0.964	0.627	0.487	*	2	1	0.513	0.281	***
MOL13	KM044827	(AC) ₁₅	F: TGGCATAACAATCAATCCTCAGC R: TTCAAAGAGGCAAGACGTATG	57	177–219	3	0.857	0.586	0.456	ns	3	0.750	0.550	0.433	ns
MOL14	KM044828	(TG) ₁₅	F: GCCAATTGTTGGACGAATGC R: ACTGTGATATGCCTGAGATGC	57	154–198	8	0.357	0.821	0.792	ns	8	0.625	0.858	0.812	*
MOL18	KM044829	(AC) ₁₉	F: CACTGAAGCCTCAACCACAG R: AGCTTCCTACAGAACCGCAC	62	217–247	9	0.500	0.862	0.863	ns	3	0.050	0.304	0.237	**
MOL24	KM044830	(CA) ₁₈	F: TCATCACACAGAGTATGGAAACC R: TGTGGATTGTAAGCAGTGG	58	158–186	2	0.964	0.508	0.281	*	2	0.500	0.385	0.239	ns
MOL50	KM044831	(CA) ₁₇	F: CCTCACGCACACACACTATC R: CACGGTTTCTTCTTTCCCC	62	197–237	4	0.519	0.551	0.434	ns	3	0.235	0.219	0.189	ns
MOL54	KM044832	(AC) ₂₀	F: TGTGTGCAAAGTGTCCATTCTC R: TCTGATATTGCTGTCTAACTGATG	57	144–194	2	1	0.509	0.281	*	2	1	0.513	0.281	***
MOL57	KM044833	(CA) ₁₉	F: ACCCAAGTATGGTGACTTCAG R: CAACACTAAGAGAGTGTGAGCC	52	231–261	13	0.600	0.902	0.917	ns	3	0.375	0.411	0.322	**

MOL60	KM044834	(AC) ₂₂	F: TTAGCATTGAGGAGGGTGCG R: TGGTCTGTTGTAGCACAATTTC	56	178–206	10	0.304	0.874	0.877	*	4	0.550	0.685	0.591	*
MOL65	KM044835	(TG) ₁₅	F: AGCAGGAGGATAAGTGTCCAG R: GCCTTACTATTTCTTTCTACTACTACAG	57	221–253	11	0.292	0.884	0.897	*	6	0.188	0.794	0.741	***
MOL72	KM044836	(TG) ₁₇ C(GT) ₁₁	F: AGCCACACGTGAAGTACAATAG R: ACGTGCAACTCGTCCAATAG	56	139	1	0	0	0	-	1	0	0	0	-
MOL77	KM044837	(AC) ₁₄	F: TGTAAATGGGCTTAAGAGATCC R: AACTCCTTGTTCAGTCCG	56	153–173	7	0.286	0.668	0.594	*	-	-	-	-	-
Mean	-	-	-	-	-	6.6	0.559	0.645	0.999 ^a	-	4.5	0.550	0.567	0.999 ^a	-

T_a, annealing temperature; A, number of alleles; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity; Q, paternity exclusion probability; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium; ns, not significant deviation from HWE; *, **, and ***, significant deviation from HWE (*P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001). ^aCombined exclusion probability.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank José Lima da Paixão, Alesandro Souza, and Rodrigo Bezerra for support in the field, Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio) for providing sampling authorizations, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research funding (SISBIOTA grant#PES0051/2011), and FAPESB and CNPq for scholarships to CVV, FAG, CB, and LPQ.

REFERENCES

GOUDET, J. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>, 2002. Accessed 2 September 2014.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, 16:1099-1106, 2007.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, 6:288-295, 2006.

QUEIROZ, L. P.; LEWIS, G. P.; ALLKIN, R. A revision the genus *Moldenhawera* Schrad. (Leguminosae–Caesalpinioideae). **Kew Bulletin**, 54: 817–852, 1999.

Capítulo 4: Evaluating the taxonomic status of *Moldenhawera blanchetiana* Tul. (Leguminosae) using molecular markers

Artigo a ser submetido ao periódico *Botanical Journal of the Linnean Society*

Fator de Impacto = 2,5

Evaluating the taxonomic status of *Moldenhawera blanchetiana* Tul. (Leguminosae) using molecular markers

ABSTRACT

Moldenhawera blanchetiana is a tree species found only in the Atlantic Forest phytogeographical domain from Bahia State, Brazil. This species has two distinct varieties based on shape, size and number of leaflets. We genotyped 206 specimens of these two varieties of *M. blanchetiana* by 11 SSRs loci and sequencing the plastid spacer *trnD-T* of 49 in order to investigate its taxonomic status and the pattern of genetic variation between varieties. All sampled sites showed high levels of genetic diversity (H_E ranging from 0.615 to 0.740). The populations showed a pattern of isolation by distance ($r = 0.6462$ and $p = 0.0340$) and three distinct genetic pools were detected. F_{ST} revealed some genetic structure among populations (F_{ST} ranging from 0.060 to 0.140). With AMOVA, we found that the most variance (85.2 %) is within populations, 12.6 % is among populations of the same variety and only 2.2 % is among the varieties. We identified 15 haplotypes and discovered that specimens of the two varieties in sympatry have a single haplotype. Our results do not corroborate the morphology pattern reported previously for *M. blanchetiana* varieties and, therefore, do not support them as genetically distinct lineages. We concluded that *M. blanchetiana* is a single species, in which the observed morphology does not reflect a putative reproductive isolation between these infraspecific entities.

Keywords: isolation by distance, microsatellites, reproductive isolation, taxonomy, Tropical Forest.

INTRODUCTION

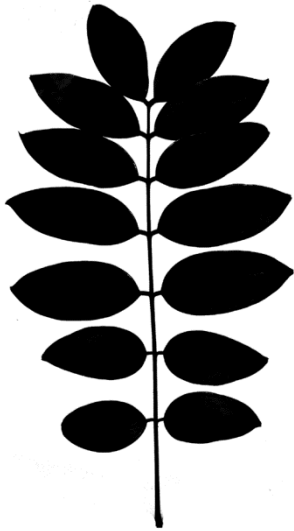
The angiosperm taxonomy is usually well resolved with the use of reliable morphological data for this purpose (JUDD et al., 2008). However, in some taxa the absence of suitable morphological characteristics makes the species delimitation a laborious activity (SWENSON and ANDERBERG, 2005; SWENSON et al., 2008). Moreover, the phenotypic variation of vegetative traits (e.g. leaves) observed among populations of same species may be

the result of a reproductive isolation among them (JUCHUM et al., 2008), phenotypic plasticity or the result of mutations in genes related to the morphogenesis of these traits (KIMURA et al., 2008).

In this context, molecular markers such as microsatellites and plastidial regions can be used to infer any putative reproductive isolation between two or more biological entities differing morphologically. (WANG et al., 2011; BARBOSA et al., 2012). This approach has already been successfully applied in different morphotypes of *Caesalpinia echinata* Lam. (JUCHUM et al., 2008), in ecologically diverged *Populus* species (WANG et al., 2011), and in the delimitation of *Pugionium* species (YU et al., 2013). In the last decade, DNA barcodes based on molecular data have showed good potential to assist in taxonomic studies of land plants, assisting on the resolution of taxonomic uncertainty (NEWMASTER and RAGUPATHY, 2009; REN et al., 2010; SINGH et al. 2012; VIVAS et al., 2014).

Moldenhawera blanchetiana Tul. is a tree species found only in Atlantic Forest phytogeographical domain from Bahia State, Brazil. This species is characterized as: a tree, stipules pinnately compound, leaves paripinnate, leaflets opposite, chartaceous to coriaceous, inflorescence a pseudopanicule, flower bud obovoid, flowers pentamerous, petals yellow, dimorphic androecium with only one long fertile stamen with a pubescent connective and fruit a woody, dehiscent pod (QUEIROZ et al., 1999). *Moldenhawera blanchetiana* has considerable variation in vegetative traits, and in the course of taxonomic review for *Moldenhawera*, Queiroz et al. (1999) identified a morphological discontinuity in allopatric specimens of *M. blanchetiana*. Two varieties were established by Queiroz et al. (1999) which are distinguished mainly based on shape, size and number of leaflets (Figure 1). *Moldenhawera blanchetiana* var. *blanchetiana* is well distributed in arboreal restinga and gallery forests of Bahia coastline, while *M. blanchetiana* var. *multijuga* is restricted to central-eastern Bahia, with no overlap in the geographical distribution of these varieties (QUEIROZ et al., 1999). In this study, we use both nuclear and plastid markers to evaluate the taxonomic status of *Moldenhawera blanchetiana* Tul.

A



B



Figura 1: Leaf characteristics of *Moldenhawera blanchetiana* var. *blanchetiana* (A) and *Moldenhawera blanchetiana* var. *multijuga* (B).

MATERIALS AND METHODS

We sampled 63 individuals of *Moldenhawera blanchetiana* var. *multijuga* (MBM) from two locations (Valença and Cairu), 100 of *Moldenhawera blanchetiana* var. *blanchetiana* (MBB) from four locations (Una, Itacaré, Maraú and Camamu) and 43 individuals of both varieties from one location (Ituberá) (Figure 2). All samples (206) were identified following the key by Queiroz et al., (1999) and voucher specimens were deposited at the HUEFS herbarium (Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana).

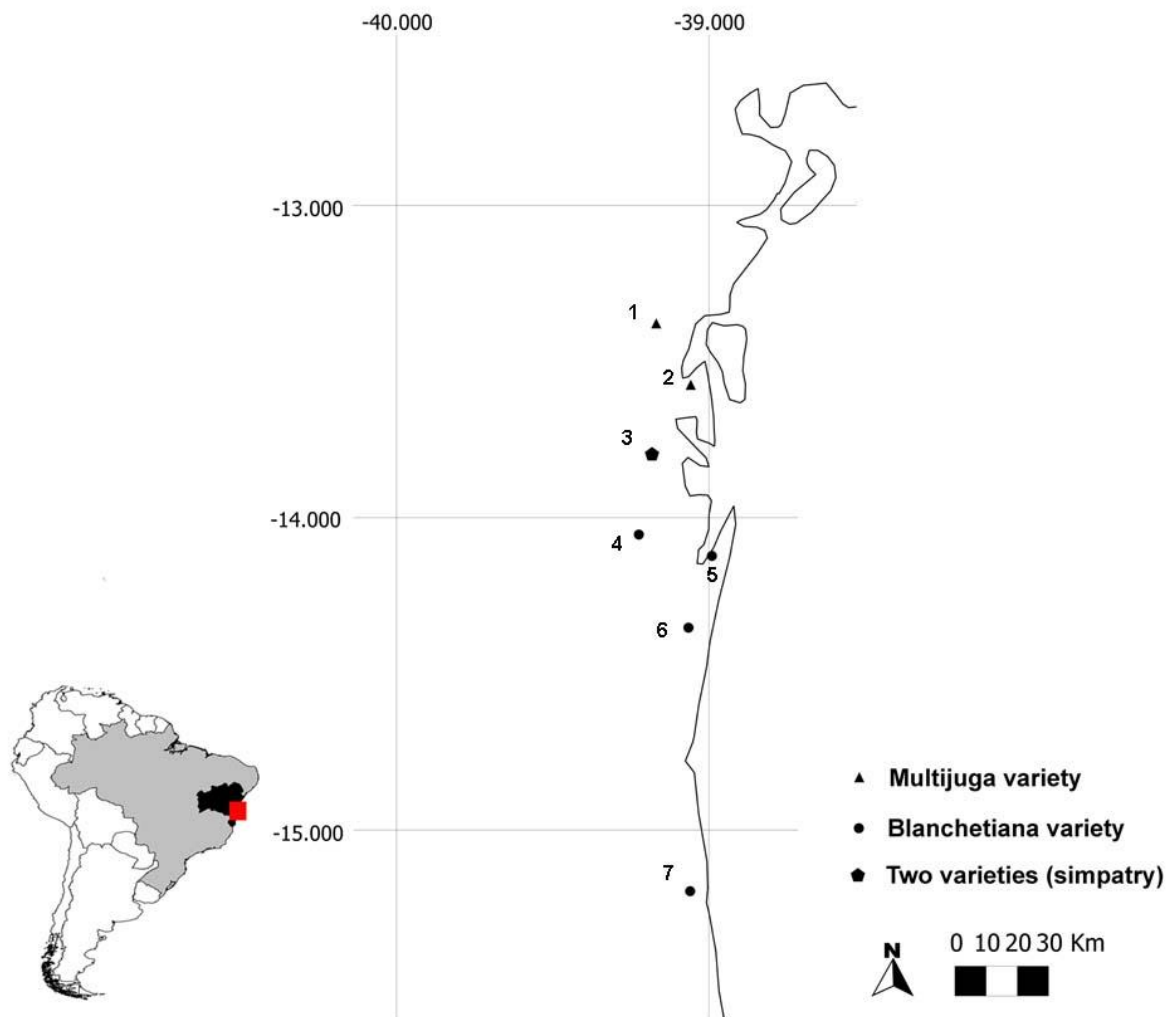


Figure 2: Geographical location of sampling sites. 1- Valença, 2- Cairu, 3- Ituberá, 4- Camamu, 5- Maraú, 6- Itacaré, 7- Una.

DNA was isolated using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB 2%) method (DOYLE and DOYLE 1987). Eleven microsatellite loci (S.1) were amplified based on Vivas et al. (2015). The amplicons were separated by capillary electrophoresis in multiload systems on an ABI 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems) and analyzed using Gene Marker version 2.6.0 (SoftGenetics, State College, Pennsylvania, USA).

The plastid spacer *trnD-T* was sequenced partially using the primers *trnT*^{GGU} (DEMASURE et al., 1995) and *trnY*^{GUA} (SHAW et al., 2005). The PCR mix followed Vivas et al. (2014) for the amplification of plastid spacer. For the amplification reaction we used the following PCR program: 80°C for 5 min, followed by 30 cycles at 94°C for 45 s, 52°C for 30 s and 72°C for 1 min, and an additional cycle at 72°C for 5 min (SHAW et al., 2005). The PCR products were purified using polyethylene glycol (10% PEG 8000, 2.5 M NaCl) and sequenced in both directions using a Big Dye Terminator kit, version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in an ABI 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems).

We estimated the mean number of alleles per locus (N_a), observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) using GenAlEx 6.4 (PEAKALL and SMOUSE, 2006), and genetic divergence between populations (F_{ST}) using Arlequin v.3.5 (EXCOFFIER and LISCHER, 2010). Additionally we used UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) to group populations in pairs using the F_{ST} value. The mantel test was performed to verify the existence of isolation by distance.

Analysis of molecular variance (AMOVA) were performed using Arlequin v.3.5 (EXCOFFIER and LISCHER, 2010) to check how genetic variation is partitioned between varieties, among populations of each variety and within populations. A bayesian clustering approach was performed using Structure 2.3.4 (PRITCHARD et al. 2000). We tested ten K (K = 1-10), with ten runs for each K, and used a burn-in period of 100,000 and a running period length of 100,000 replications. The appropriate K was estimated using the Evanno et al. (2005) method on Structure Harvester software (EARL and VONHOLDT, 2012).

Sequences were edited using the Staden package (STADEN et al., 1999). The alignment was done using Muscle (EDGAR, 2004) in Mega6 program (TAMURA et al., 2011). All sequences were examined visually for possible errors in editing and alignment, and manual adjustments were made when necessary. We generated haplotypes using DnaSP v.5 (LIBRADO and ROZAS, 2009). A haplotype network was generated using the median-

joining network method (BANDELT et al., 1999) in Network v.4.5.0.0, in order to infer the relations between *M. blanchetiana* varieties.

RESULTS

Considering only the genetic analysis based on microsatellite, all sampled sites showed high levels of genetic diversity (Table 1). The mean number of alleles per locus was 6.8, while the expected heterozygosity ranged from 0.615 to 0.740. Private alleles were found in most sampled locations. The F_{ST} revealed genetic structure among populations ranging from 0.058 to 0.266, regardless of variety (Table 2). The specimens sampled in Una (MBB variety) showed high genetic structure when compared to other sampled areas.

Table 1: Number of specimens sampled and genetic parameters estimated of *Moldenhawera blanchetiana* varieties.

Pop	Variety	N	Na	Pa	H_O	H_E
Una	MBB	26	6.9	6	0.474	0.637
Maraú	MBB	18	4.7	2	0.489	0.615
Camamu	MBB	29	5.5	0	0.378	0.662
Itacaré	MBB	27	6.3	2	0.556	0.682
Ituberá	MBB and MBM	43	8.6	6	0.546	0.670
Valença	MBM	31	7.9	7	0.593	0.687
Cairu	MBM	32	7.8	3	0.523	0.740
Mean	-	-	6.8	-	0.509	0.670

N, number of specimens sampled; Na, mean number of alleles per locus; Pa, private alleles; H_O , observed heterozygosity; H_E , expected heterozygosity.

The Mantel test, based on F_{ST} and the geographic distance matrix showed a positive correlation ($r = 0.6462$ and $p = 0.0340$) between increased geographical distance and genetic differentiation for the *Moldenhawera blanchetiana* populations, revealing likely pattern of isolation by distance (S.2).

Table 2: Pairwise F_{ST} estimates of *Moldenhawera blanchetiana* varieties using 11 loci SSRs.

	Una	Maraú	Camamu	Itacaré	Ituberá	Valença	Cairu
Una (MBB)	0						
Maraú (MBB)	0.266*	0					
Camamu (MBB)	0.204*	0.076*	0				
Itacaré (MBB)	0.179*	0.070*	0.067*	0			
Ituberá (MBB and MBM)	0.166*	0.137*	0.083*	0.060*	0		
Valença (MBM)	0.189*	0.221*	0.153*	0.122*	0.092*	0	
Cairu (MBM)	0.137*	0.136*	0.099*	0.077*	0.058*	0.084*	0

* $p < 0.05$

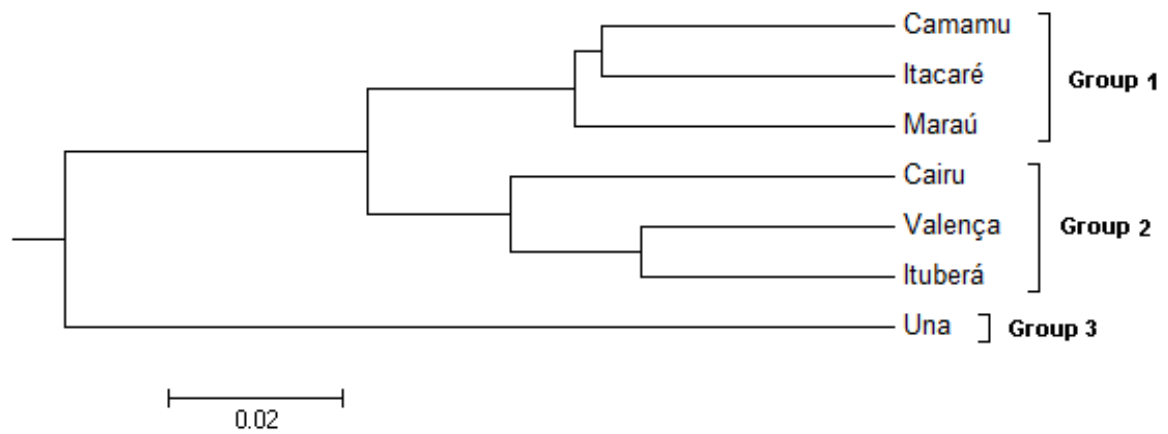


Figure 3: Clustering of seven populations of the *Moldenhawera blanchetiana* using the unweighted arithmetic average method (UPGMA), based on the F_{ST} obtained from 11 SSRs loci.

Table 3: Analysis of molecular variance (AMOVA) based on 11 microsatellite loci for *Moldenhawera blanchetiana* varieties.

Source of variation	Sum of squares	Variance components	Percentage variation (%)
Among varieties	46.367	0.09697	2.22
Among populations	121.087	0.54729	12.55
Within populations	1088.138	3.71850	85.23
Total	1255.592	4.36276	

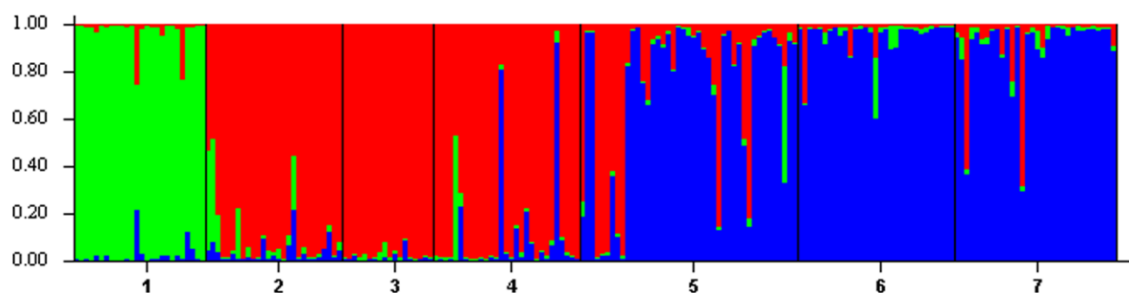


Figure 4: Structure clusters of the populations from *Moldenhawera blanchetiana* based on analysis of 11 SSRs loci ($K = 3$). Each cluster is represented by a different color ($K=3$). 1- Una (MBB), 2- Itacaré (MBB), 3- Maraú (MBB), 4- Camamu (MBB), 5- Ituberá (MBM and MBB), 6- Cairu (MBM), 7- Valença (MBM).

The UPGMA based on population pairwise F_{ST} values revealed three distinct genetic groups matching with the geographical distribution (Figure 3). The Structure analysis also revealed three genetic groups ($K = 3$) (Figure 4 and S.3), corroborating the same groups obtained using UPGMA. With AMOVA, we found most of the variance (85.2 %) within populations, 12.6 % among populations of the same variety and only 2.2 % among the varieties (Table 3). Fifteen haplotypes were identified from partially sequenced plastid spacer *trnD-T* (S.4). No group has been identified in median-joining network analysis (S.5). We found a single haplotype for specimens of the two varieties in sympatry.

DISCUSSION

Moldenhawera shows considerable morphological variation and its taxonomy was considered confusing by Lewis (1987). Despite the taxonomic revision performed by Queiroz et al. (1999), some problems still remained (eg *Moldenhawera blanchetiana* varieties). Thus, genetic studies of infra-specific taxa or species complex in tropical regions can provide us information about the speciation process, the evolution of morphological traits and the taxonomy of these groups. In this sense, the MBB and MBM varieties proposed by Queiroz et al. (1999) based on the number and shape of the leaflets were not sustained based on genetic data from SSRs and plastid markers.

All microsatellite loci used for the genetic analysis were informative and proved to be suitable for this approach, as indicated by Vivas et al. (2015). The high levels of genetic

diversity observed ($H_E > 0.615$) were consistent with other studies of tropical tree species (AZEVEDO et al., 2007; TARAIZI et al., 2013; LEAL et al., 2014). The genetic structure observed in this study is likely a result of limited gene flow between locations. This explanation can be supported by the demography of this species. We observed that the distribution of *Moldenhawera blanchetiana* individuals is usually grouped, however fragmented throughout its range in the Atlantic Forest of Bahia state, where the MBM is restricted to a small region in the central-eastern Bahia coast. We have showed that the genetic structure increases with geographical distance, regardless of the *M. blanchetiana* varieties, as indicated by the Mantel test. Among the floral visitors and potential pollinators of *Moldenhawera* is the solitary bee of the genus *Bombus* (L. P. de Queiroz personal observation). The flight of some species of this genus can reach distances of approximately 10 km (KRAUS et al., 2009), which would explain a lower genetic differentiation between *M. blanchetiana* specimens collected in neighboring areas. Gene flow between individuals of different localities should happen mainly by crossing. Based on our field observations, we believe that *Moldenhawera* species have a dispersion syndrome by autochory, with limited seed dispersal and seedling bank often forming around the matrix plants.

The analysis of molecular variance (AMOVA) indicates how genetic variation is partitioned into different hierarchical levels (EXCOFFIER et al., 1992). In this sense, our data showed that only 2.22% of the variation observed result from differences between the putative varieties MBB and MBM. In the preliminary AMOVA analysis using specimens of *M. blanchetiana* and *M. luschnathiana*, we found a variation of 13.93% between these two species (S.6), which are considered evolutionarily related (QUEIROZ et al., 1999). Thus, our results showed that MBB and MBM do not represent two distinct biological entities. Thus, the pattern of isolation by distance observed in this study better explain the population pattern observed for MBB and MBM rather than hypothesis of reproductive isolation between these varieties.

Three distinct genetic groups were detected using UPGMA and bayesian clustering approaches (Figures 3 and 4). These groups reflect the geographic distribution of sampled locations, and may be the result of historical processes (e.g. climate fluctuations in the Pleistocene), which resulted in this demographic pattern, as suggested by Barbosa et al. (2012) for *Vellozia hirsuta*. The analysis of the partial *trnD-T* spacer no identified groups and along with the regular pattern of few mutations among haplotypes, suggests that haplotype

divergence is recent. Specimens of the two varieties in sympatry have a single haplotype, showing a high genetic similarity. These results also do not corroborate with the morphological pattern that supports *M. blanchetiana* varieties suggested by Queiroz et al. (1999). Barbosa et al. (2012) analyzing the species complex *Vellozia hirsuta*, found that the genetic structure and the phylogeographic pattern observed for the populations analyzed based on plastid spacer *rpl32F-trnL*, are not correlated with the different morpho-anatomical patterns reported. For this species complex, the authors suggested that *V. hirsuta* is a single biological entity with great variation, as we believe that had occurred to *M. blanchetiana*.

The morphological differentiation in plant species may be an indication of a putative reproductive isolation between different biological entities (JUCHUM et al., 2008), or the result of variable quantitative trait locus (QTL) expression on leaves shapes (DROST et al., 2015). Specimens of MBB and MBM cultivated under the same environmental conditions remained the morphological patterns that distinguish them, indicating that these traits are inherited and not a consequence of environmental variation (phenotypic plasticity) (C. V. Vivas personal observation). However, our results did not corroborate the morphological pattern reported for *M. blanchetiana* varieties and, therefore, do not support them as genetically distinct lineages. We concluded that *M. blanchetiana* is a single species, in which the observed morphology does not reflect a putative reproductive isolation between these infraspecific entities.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank José Lima da Paixão, Rodrigo Alves Bezerra, Alesandro Souza Santos, Reserva Ecológica da Michelin and Instituto de Estudos Sócio-Ambientais do Sul da Bahia (IESB) for support in the field, Horlei Ribeiro for laboratory assistance, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research funding (SISBIOTA Grant# PES0051/2011). FAPESB and CNPq also provides scholarship to CVV, and research fellowships to FAG, CB and LPQ.

REFERENCES

- AZEVEDO, V. C.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A. Y.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic structure and mating system of *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev., a heavily logged Amazonian timber species. **Journal of Heredity**, v. 98, n. 7, 646–654, 2007.
- BUZATTI, R. S. D. O.; RIBEIRO, R. A.; LEMOS FILHO, J. P. D.; LOVATO, M. B. Fine-scale spatial genetic structure of *Dalbergia nigra* (Fabaceae), a threatened and endemic tree of the Brazilian Atlantic Forest. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, 838–846, 2012.
- DEMESURE, B.; SODZI, N.; PETIT, R. J. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. **Molecular Ecology**, v. 4, 129–131, 1995.
- DROST, D. R.; PURANIK, S.; NOVAES, E.; NOVAES, C. R.; DERVINIS, C.; GAILING, O.; KIRST, M. Genetical genomics of *Populus* leaf shape variation. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, 2015.
- EDGAR, R. C. Muscle: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, 1792–1797, 2004.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, 2611–2620, 2005.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, 564–567, 2010.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, 479–491, 1992.
- KIMURA, S.; KOENIG, D.; KANG, J.; YOONG, F. Y.; SINHA, N. Natural variation in leaf morphology results from mutation of a novel KNOX gene. **Current Biology**, v. 18, n. 9, 672–677, 2008.

- KRAUS, F. B.; WOLF, S.; MORITZ, R. F. A. Male flight distance and population substructure in the bumblebee *Bombus terrestris*. **Journal of Animal Ecology**, v. 78, n. 1, 247–252, 2009.
- LEAL, J. B.; SANTOS, R. P.; GAIOTTO, F. A. Effect of selective logging on genetic diversity and gene flow in *Cariniana legalis* sampled from a cacao agroforestry system. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, 626–635, 2014.
- LIBRADO P.; ROZAS, J. DnaSP ver. 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, 1451–1452, 2009.
- NEWMASER, S. G.; RAGUPATHY, S. Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical *Acacia* (Mimosoideae, Fabaceae). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, suppl. 1, 172–180, 2009.
- QUEIROZ, L. P.; LEWIS, G. P.; ALLKIN, R. A revision the genus *Moldenhawera* Schrad. (Leguminosae–Caesalpinioideae). **Kew Bulletin**, v. 54, 817–852, 1999.
- REN, B. Q.; XIANG, X. G.; CHEN, Z. D. Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, 594–605, 2010.
- SHAW, J.; LICKEY, E. B.; BECK, J. T.; FARMER, S. B. LIU, W. et al. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 1, 142–166, 2005.
- SINGH, H. K.; PARVEEN, I.; RAGHUVANSHI, S.; BABBAR, S. B. The loci recommended as universal barcodes for plants on the basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of *Dendrobium* species. **BMC Research Notes**, v. 7, e42, 2012.
- STADEN, R.; BEAL, K.; BONFIELD, J. K. The Staden package. In: Misener, S., Krawets, S. A. (ed.), **Computer Methods in Molecular Biology 132**, Bioinformatics Methods and Protocols. Totowa: Humana Press, 115–130, 1998.
- SWENSON, U.; ANDERBERG, A. A. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). **Cladistics**, v. 21, 101–130, 2005.
- SWENSON, U.; RICHARDSON, J. E.; BARTISH, I. V. Multi-gene phylogeny of the pantropical subfamily Chrysophylloideae (Sapotaceae): evidence of generic polyphyly and extensive morphological homoplasy. **Cladistics**, v. 24, 1006–1031, 2008.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, 2725–2729, 2013.
- TARAZI, R.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOSKY, R. Long-distance dispersal in a fire-and livestock-protected savanna. **Ecology and Evolution**, v. 3, n. 4, 1003–1015, 2013.

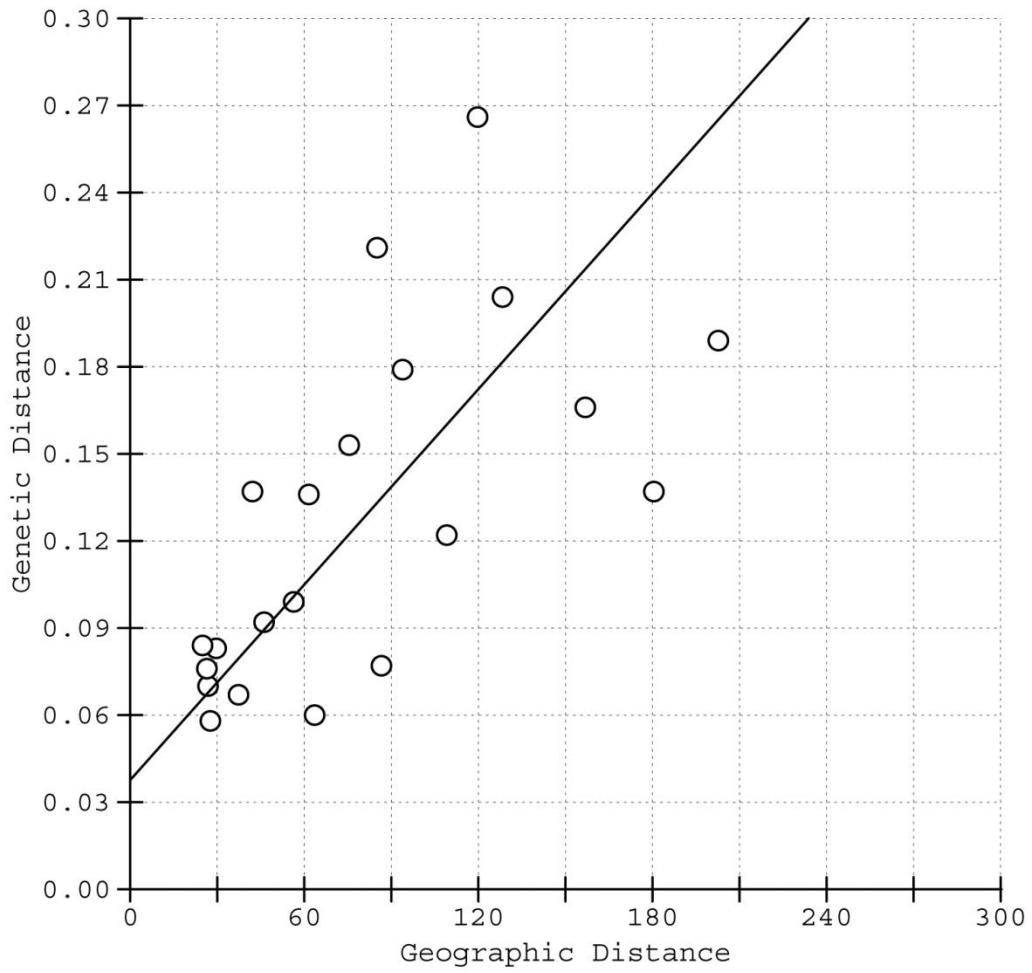
- TSUKAYA, H. Leaf Development. **The Arabidopsis Book**. American Society of Plant Biologists, v. 11, e0163, 2013.
- VIVAS, C. V.; MORAES, R. C. S.; ALVES-ARAÚJO, A.; ALVES, M.; MARIANO-NETO, E.; van den BERG, C.; GAIOTTO, F. A. DNA barcoding in Atlantic Forest plants: what is the best marker for Sapotaceae species identification?. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 4, 662–670, 2014.
- VIVAS, C. V.; van den BERG, C.; QUEIROZ, L. P.; GAIOTTO, F. A. Development of microsatellite markers in *Moldenhawera blanchetiana* and their transferability to *M. luschnathiana* (Fabaceae). **Conservation Genetics Resources**, v. 7, 255–257, 2015.
- WANG, J.; WU, Y.; REN, G.; GUO, Q.; LIU, J.; LASCOUX, M. Genetic differentiation and delimitation between ecologically diverged *Populus euphratica* and *P. pruinosa*. **PLoS One**, v. 6, n. 10, e26530, 2011.
- YU, Q.; WANG, Q.; WU, G.; MA, Y.; HE, X.; WANG, X.; XIE, P.; HU, L.; LIU, J. Genetic differentiation and delimitation of *Pugionium dolabratum* and *Pugionium cornutum* (Brassicaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, n. 7, 1355–1365, 2013.

SUPPLEMENTS

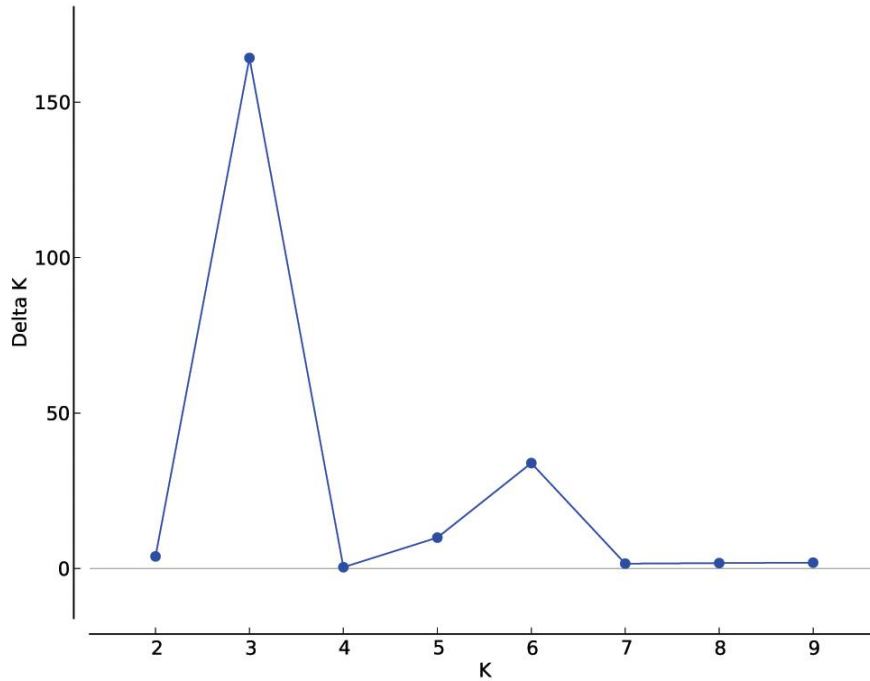
S. 1: Microsatellite (SSR) markers used in genetic analysis of *Moldenhawera blanchetiana* varieties.

Locus	Repeat motif	Primer sequence 5' - 3'	T _a (°C)	Size range (bp)
MOL01 ^A	(CA) ₂₁	F: ACGCTGTACTAGTCTGGCTG R: GTCGATCATAACCATTACTATGTCTCTC	57	151–207
MOL08 ^A	(CA) ₁₆	F: TTCCTAGGCTGAGTTGGGTC R: ACCCACAGGGAGAATCAGTAG	58	231–275
MOL10 ^A	(AC) ₁₄	F: TCCATGTGGAGAACACGAGC R: CAGTTGGAGCTTCTTGGCAG	52	103–115
MOL11 ^A	(GT) ₁₃	F: ACTAGGCTCTGTTGTGGTGG R: GCAGATGCAGAGCAACATTTTC	57	167–199
MOL14 ^A	(TG) ₁₅	F: GCCAATTGTTGGACGAATGC R: ACTGTGATATGCCTGAGATGC	57	154–198
MOL35 ^B	(GA) ₁₁	F: ATTTCTGGTACTTGCAATGG R: GAAACGCATCCAATCATTTC	56	127–153
MOL43 ^B	(TG) ₁₃	F: TTTCTTTGCATGCTCCGTAT R: ACTAGCACACATAGTCACTC	57	121–153
MOL46 ^B	(GT) ₁₁	F: GGGTAACTTTAGAATAAGATTATGTGC R: TGCATGTCAGATACACACACAG	53	187–203
MOL57 ^A	(CA) ₁₉	F: ACCCAAGTATGGTGACTTCAG R: CAACACTAAGAGAGTGTGAGCC	52	231–261
MOL65 ^A	(TG) ₁₅	F: AGCAGGAGGATAAGTGTCCAG R: GCCTTACTATTTCTTTCTACTACTACAG	57	221–253
MOL77 ^A	(AC) ₁₄	F: TGTAAATGGGCTTAAGAGATCC R: AACTCCTTGTTCTCAGTCCG	56	153–173

^AVivas et al., 2015; ^Bunpublished primers



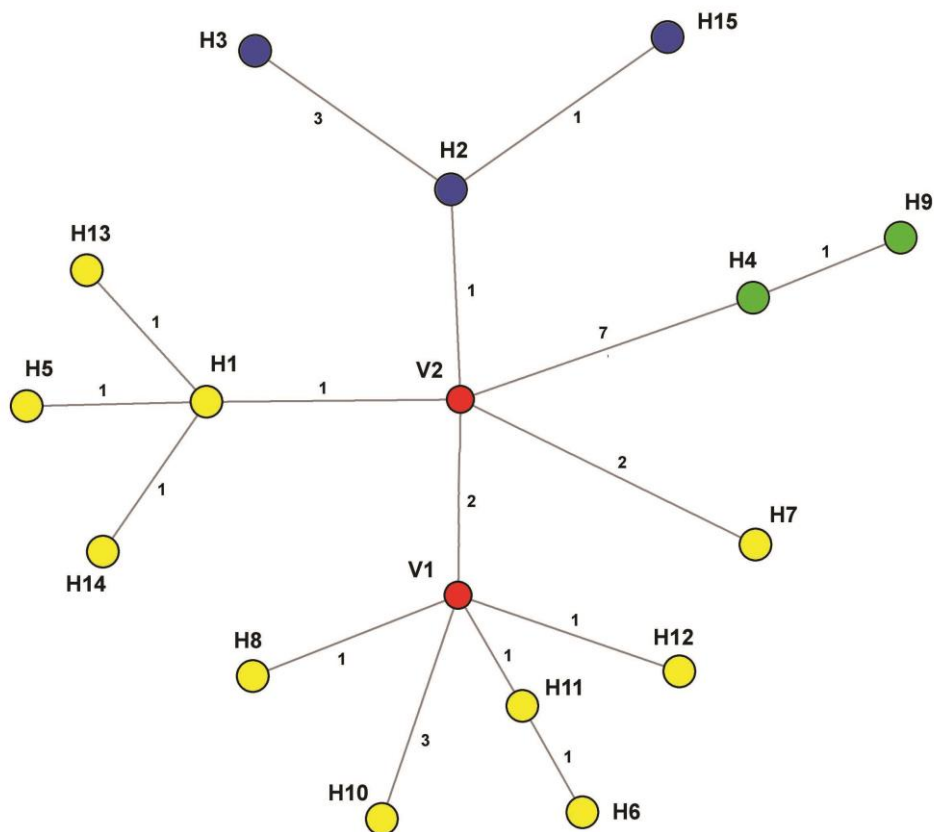
S. 2: Mantel test of *Moldenhawera blanchetiana* populations, based on the F_{ST} and the geographic distance (Km) matrix.



S. 3: Structure Harvester results showing the appropriate K using the Evanno et al. (2005) method.

S. 4: Haplotypes found in *Moldenhawera blanchetiana* varieties.

Haplotype	Variety	Locality
H1	MBB	Maraú, Itacaré and Camamu
H2	MBM	Valença and Cairu
H3	MBM	Cairu
H4	MBB/MBM	Ituberá
H5	MBB	Camamu
H6	MBB	Una
H7	MBB	Uruçuca
H8	MBB	Una
H9	MBB/MBM	Ituberá
H10	MBB	Una
H11	MBB	Una
H12	MBB	Una
H13	MBB	Camamú
H14	MBB	Camamú
H15	MBM	Cairu



S. 5: Median-joining network analysis of the *Moldenhawera blanchetiana* varieties based in *trnD-T* partially spacer. MBB haplotypes (yellow circles), MBM haplotypes (blue circles), MBB/MBM haplotypes (green circles). Median vectors are represented in red circles. Numbers above branches represent the number of mutations between the haplotypes.

S. 6: Analysis of molecular variance (AMOVA) based on six microsatellite loci between *Moldenhawera blanchetiana* and *M. luschnathiana*.

Source of variation	Sum of squares	Variance components	Percentage variation (%)
Among species	42.310	0.386	13.93
Among populations of the same species	122.039	0.350	12.65
Within populations	808.423	2.032	73.42
Total	972.773	2.768	

CONCLUSÕES GERAIS

- O estudo taxonômico do gênero *Moldenhawera* resultou na descrição de duas novas espécies do gênero (*M. longipedicellata* e *M. congestiflora*) para o domínio fitogeográfico Mata Atlântica;
- A chave de identificação desenvolvida para a seção *Brasilianae* mostrou-se adequada para a identificação das espécies que compõe este táxon;
- Os marcadores microssatélites desenvolvidos neste trabalho para *M. blanchetiana* utilizando pirosequenciamento (454 Roche), mostraram níveis adequados de polimorfismo, de diversidade genética (H_E) e uma alta probabilidade de exclusão de paternidade;
- A alta taxa de transferência de loci microssatélites de *M. blanchetiana* para *M. luschnathiana* possivelmente deve-se ao fato dessas espécies serem proximamente relacionadas evolutivamente;
- Os marcadores microssatélites desenvolvidos para *M. blanchetiana* e transferidos para *M. luschnathiana* são altamente informativos e potencialmente aplicáveis em estudos genéticos, evolutivos, taxonômicos e ecológicos dessas espécies;
- O padrão morfológico observado nas variedades *M. blanchetiana* var. *blanchetiana* e *M. blanchetiana* var. *multijuga* não são sustentados com base em análises genéticas utilizando marcadores microssatélites e plastidiais. Dessa forma, *M. blanchetiana* deve ser considerada uma única espécie sem categorias infraespecíficas.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ALMEIDA, C. C. S.; CARVALHO, P. C. L.; GUERRA, M. Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 155, 541–547, 2007.
- AMORIM, J. S.; TARAZI, R.; RODRIGUES, P. S.; TSAI, S. M.; van den BERG, C.; GAIOTTO, F. A. Development of microsatellite primers for *Senna multijuga* (Fabaceae): a pioneer species from the Brazilian Atlantic forest. **Conservation Genetics Resources**, v. 6, n. 3, 569–570, 2014.
- BARBOSA, A. R.; FIORINI, C. F.; SILVA-PEREIRA, V.; MELLO-SILVA, R.; BORBA, E. L. Geographical genetic structuring and phenotypic variation in the *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) ochlopecies complex. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 9, 1477–1488, 2012.
- BENTHAM, G. Leguminosae. In: von Martius, C. F. P. **Flora Brasiliensis**, v. 15, n. 2, 1870.
- BODO SLOTTA, T. A.; PORTER, D. M. Genetic variation within and between *Iliamna corei* and *I. remota* (Malvaceae): implications for species delimitation. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 151, n. 3, 345–354, 2006.
- BORGES, D. B.; MARIANO-NETO, E.; GAIOTTO, F. A. Development of microsatellite primers for *Melanoxylon brauna* (Fabaceae): an endangered and endemic tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Genetics Resources**, v. 7, n. 1, 65–68, 2015.
- BORGES, L. A.; SOUZA, L. G. R.; GUERRA, M.; MACHADO, I. C.; LEWIS, G. P.; LOPES, A. V. Reproductive isolation between diploid and tetraploid cytotypes of *Libidibia ferrea* (= *Caesalpinia ferrea*) (Leguminosae): ecological and taxonomic implications. **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, n. 7, 1371–1381, 2012.
- BRAZIL FLORA GROUP. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, 1085-1113, 2015.
- CARDOSO, D.; QUEIROZ, L. P.; LIMA, H. C.; SUGANUMA, E.; van den BERG, C.; LAVIN, M. A molecular phylogeny of the vataireoid legumes underscores floral evolvability that is general to many early-branching papilionoid lineages. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 2, 403–421, 2013.
- CHASE, M. W.; SOLTIS, D. E.; OLMSTEAD, R. G.; MORGAN, D. et al. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 80, 528–580, 1993.
- CLEGG, M. T.; GAUT, B. S.; LEARN, G. H.; MORTON, B. R. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 91, 6795–6801, 1994.

COELHO, G. M. **Estrutura genética populacional em morfotipos de *Euterpe edulis***. 2010, 52 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

DELANNOY, E.; FUJII, S.; DES FRANCS-SMALL, C. C.; BRUNDRETT, M.; SMALL, I. Rampant gene loss in the underground orchid *Rhizanthella gardneri* highlights evolutionary constraints on plastid genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 7, 2077–2086, 2011.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L.; BALLENGER, J. A.; DICKSON, E. E.; KAJITA, T.; OHASHI, H. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. **American Journal of Botany**, v. 84, n. 4, 541–554, 1997.

FAJARDO, D.; SENALIK, D.; AMES, M. et al. Complete plastid genome sequence of *Vaccinium macrocarpon*: structure, gene content, and rearrangements revealed by next generation sequencing. **Tree Genetics & Genomes**, v. 9, n. 2, 489–498, 2013.

FERNANDES, A.; BEZERRA, P. O gênero *Moldenhawera* (Leguminosae-Caesalpinioideae) no Brasil - uma nova espécie. **Anais da Sociedade Botânica do Brasil**, XXXII Congresso Nacional de Botânica, Terezina, 58–62, 1982.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M. et al. Síntese da Diversidade Brasileira. In: FORZZA, R. C. et al. (Org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, v. 1. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Sociedade Brasileira de Genética, 2008.

FU, Y. M.; JIANG, W. M.; FU, C. X. Identification of species within *Tetrastigma* (Miq.) Planch. (Vitaceae) based on DNA barcoding techniques. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 49, n. 3, 237–245, 2011.

GAIOTTO, F. A. BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for heart of palm–*Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart.(Arecaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 1, 86–88, 2001.

GAIOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOVSKY, R. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**, v. 94, n. 5, 399–406, 2003.

HARDY, O. J.; CHARBONNEL, N.; FRÉVILLE, H.; HEUERTZ, M. Microsatellite Allele Sizes: A Simple Test to Assess Their Significance on Genetic Differentiation. **Genetics**, v. 16, 1467–1482, 2003.

IRWIN, H. S.; ARROYO, M. T. K. Three new Legume species from South America. **Brittonia**, v. 26, 264–270, 1974.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 3^o ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2008.

JUCHUM, F. S.; COSTA, M. A.; AMORIM, A. M.; CORRÊA, R. X. Phylogenetic relationships among morphotypes of *Caesalpinia echinata* Lam. (Caesalpinioideae: Leguminosae) evidenced by *trnL* intron sequences. **Naturwissenschaften**, v. 95, 1085–1091, 2008.

KAJITA, T.; OHASHI, H.; TATEISHI, Y.; BAILEY, C. D.; DOYLE, J. J. *rbcL* and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and allies. **Systematic Botany**, v. 26, 515–536, 2001.

KÄSS, E.; WINK, M. Molecular evolution of the Leguminosae: Phylogeny of the three subfamilies based on *rbcL*-sequences. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24: 365–378, 1996.

KÄSS, E.; WINK, M. Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (*rbcL*) and ncDNA (ITS 1 and 2). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 8, 65–88, 1997.

KUMAR, P.; GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; MODI, D. R.; PANDEY, B. K. Potential of molecular markers in plant biotechnology. **Plant Omics**, v. 2, n. 4, 141–162, 2009.

LAGOUDAKIS, C. S.; CHASE, M. W.; ROBINSON, D. N.; RUSSELL, S. J.; KLITGAARD, B. B. Phylogenetics of neotropical *Platymiscium* (Leguminosae: Dalbergieae): systematics, divergence times, and biogeography inferred from nuclear ribosomal and plastid DNA sequence data. **American Journal of Botany**, v 95, n 10, 1270–1286, 2008.

LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, 217–248, 2013.

LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. Royal Botanic Gardens, Kew, 1987.

LEWIS, G. P.; QUEIROZ, L. P. *Moldenhawera intermedia* (Leguminosae: Caesalpinioideae), a new species from the Brazilian state of Bahia. **Kew Bulletin**, v. 65, 205–207, 2010.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MCKINDER, B.; LOCK, J. M. **The Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew, 2005.

LIMA, H. C.; QUEIROZ, L. P.; MORIM, M. P. et al. Fabaceae. In: FORZZA, R. C. et al. (Org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, v. 1. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

- MACHADO, M. C.; CARVALHO, P. C. L.; van den BERG, C. domestication, hybridization, speciation, and the origins of an economically important tree crop of *Spondias* (Anacardiaceae) from the Brazilian Caatinga dry forest. **Neodiversity**, v. 8, 8–49, 2015.
- MANZANILLA, V.; BRUNEAU, A. Phylogeny reconstruction in the Caesalpinieae grade (Leguminosae) based on duplicated copies of the sucrose synthase gene and plastid markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 65: 149–162, 2012.
- MENDES, I. D. C. A.; PAVIANI, T. I. Morfo-anatomia comparada das folhas do par vicariante *Plathymenia foliolosa* Benth. e *Plathymenia reticulata* Benth. (Leguminosae-Mimosoideae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 20, n. 2, 185–195, 1997.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies—the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, 31–46, 2010.
- MEUDT, H. M.; LOCKHART, P. J.; BRYANT, D. Species delimitation and phylogeny of a New Zealand plant species radiation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, 111 1–17, 2009.
- MORAES, R. C.; VIVAS, C. V.; OLIVEIRA, F. A.; MENEZES, I. P.; van den BERG, C.; GAIOTTO, F. A. Microsatellite markers for an endemic Atlantic Forest tree, *Manilkara multifida* (Sapotaceae). **AoB Plants**, v. 5, p.plt006, 2013.
- NEWMASER, S. G.; RAGUPATHY, S. Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical *Acacia* (Mimosoideae, Fabaceae). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, suppl. 1, 172–180, 2009.
- OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 29, 2, 294–307, 2006.
- POHL, J. E. **Plantarum Brasiliae icones et descriptiones**. v. 2, 1–153, Vienna, 1831.
- QUEIROZ, L. P.; CARDOSO, D. B. O. S. et al. Leguminosae In: GIULIETTI, A. M. et al. (Org.). **Plantas Raras do Brasil**. Belo Horizonte, MG: Conservação Internacional, 2009.
- QUEIROZ, L. P.; LEWIS, G. P.; ALLKIN, R. A revision the genus *Moldenhawera* Schrad (Leguminosae - Caesalpinioideae). **Kew Bulletin**, 54, 817–852, 1999.
- QUEIROZ, L. P.; PASTORE, J. F. B.; CARDOSO, D. et al. A multilocus phylogenetic analysis reveals the monophyly of a recircumscribed papilionoid legume tribe Diocleae with well-supported generic relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 90, 1–19, 2015.
- RAMOS, G.; LIMA, H. C.; PRENNER, G.; QUEIROZ, L. P.; ZARTMAN, C. E.; CARDOSO, D. Molecular systematics of the Amazonian genus *Aldina*, a phylogenetically enigmatic ectomycorrhizal lineage of papilionoid legumes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 97, 11–18, 2016.

SANCHEZ-PUERTA, M. V.; ABBONA, C. C. The chloroplast genome of *Hyoscyamus niger* and a phylogenetic study of the tribe Hyoscyameae (Solanaceae). **PLoS One**, v. 9, n. 5, p.e98353, 2014.

SANTOS, A. S.; CAZETTA, E.; MORANTE FILHO, J. C.; BAUMGARTEN, J.; FARIA, D.; GAIOTTO, F. A. Lessons from a palm: genetic diversity and structure in anthropogenic landscapes from Atlantic Forest, Brazil. **Conservation Genetics**, v. 16, n. 6, 1295–1302, 2015.

SHAW, J.; LICKEY, E. B.; BECK, J. T.; FARMER, S. B.; LIU, W.; MILLER, J.; SIRIPUN, K. C.; WINDER, C. T.; SCHILLING, E. E.; SMALL, R. L. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 1, 142–166, 2005.

SHAW, J.; LICKEY, E. B.; SCHILLING, E. E.; SMALL, R. L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 3, 275–288, 2007.

SMALL, R. L.; RYBURN, J. A.; CRONN, R. C.; SEELANAN, T.; WENDEL, J. F. The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear Adh sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. **American Journal of Botany**, v. 85, n. 9, 1301–1315, 1998.

SNAK, C.; VATANPARAST, M.; SILVA, C.; LEWIS, G. P.; LAVIN, M.; KAJITA, T.; QUEIROZ, L. P. A dated phylogeny of the papilionoid legume genus *Canavalia* reveals recent diversification by a pantropical liana lineage. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 98, 133–146, 2016.

de SOUZA FRANÇA, D.; NERES, J.; GAIOTTO, F. A. Development and characterization of 26 microsatellite loci in *Licania hypoleuca* (Chrysobalanaceae) and transferability to *Licania hoehnei*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, 204–208, 2015.

STELLFELD, C. Os novos gêneros e as novas espécies de Freire Allemão. Irmãos Pongetti editores, Rio de Janeiro, 66 pp, 1948.

SWENSON, U.; ANDERBERG, A. A. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). **Cladistics**, v. 21, 101–130, 2005.

SWENSON, U.; RICHARDSON, J. E.; BARTISH, I. V. Multi-gene phylogeny of the pantropical subfamily Chrysophylloideae (Sapotaceae): evidence of generic polyphyly and extensive morphological homoplasy. **Cladistics**, v. 24, 1006–1031, 2008.

TARAZI, R.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Edge effects enhance selfing and seed harvesting efforts in the insect-pollinated Neotropical tree *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). **Heredity**, v. 110, n. 6, 578–585, 2013.

- TAVARES, A. C.; LOUREIRO, J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L.; CANHOTO, J. M.; PAIVA, J. Characterization and distinction of two subspecies of *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss., an Iberian endemic Apiaceae, using flow cytometry and essential oils composition. **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, n. 3, 611–618, 2013.
- TSUKAYA, H. Leaf Development. **The Arabidopsis Book** 11, e0163, 2013. doi:10.1199/tab.0163.
- TULASNE, M. L. R. *Moldenhawera blanchetiana*. **Archives du Muséum d'Histoire Naturelle**, v. 4, 158–160, 1844.
- VIVAS, C. V.; MORAES, R. C. S.; ALVES-ARAÚJO, A.; ALVES, M.; MARIANO-NETO, E.; van den BERG, C.; GAIOTTO, F. A. DNA barcoding in Atlantic Forest plants: what is the best marker for Sapotaceae species identification?. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 4, 662–670, 2014.
- WANG, J.; WU, Y.; REN, G.; GUO, Q.; LIU, J.; LASCoux, M. Genetic differentiation and delimitation between ecologically diverged *Populus euphratica* and *P. pruinosa*. **PLoS One**, v. 6, n. 10, e26530, 2011.
- WARWICK, M. C.; LEWIS, G. P. Revision of *Plathymenia* (Leguminosae–Mimosoideae). **Edinburgh Journal of Botany**, v. 60, n. 2, p. 111–119, 2003.
- WOJCIECHOWSKI, M. F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M. J. A phylogeny of the legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene sequences resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**, v. 91, 1846–1862, 2004.
- YAKOVLEV, G. P. New species of *Moldenhawera* Schrad. **Botaničeskii Žhurnal (Moscow e Leningrad)**, v. 60, n. 2, 219–220, 1975.
- YU, Q.; WANG, Q.; WU, G.; MA, Y.; HE, X.; WANG, X.; XIE, P.; HU, L.; LIU, J. Genetic differentiation and delimitation of *Pugionium dolabratum* and *Pugionium cornutum* (Brassicaceae). **Plant Systematics and Evolution**, 299(7), pp.1355–1365, 2013.
- XU, Q.; XIONG, G.; LI, P.; HE, F.; HUANG, Y.; WANG, K. B.; LI, Z. H.; HUA, J. P. Analysis of complete nucleotide sequences of 12 *Gossypium* chloroplast genomes: origin and evolution of allotetraploids. **PLoS One**, v. 7, n. 8, e37128, 2012.