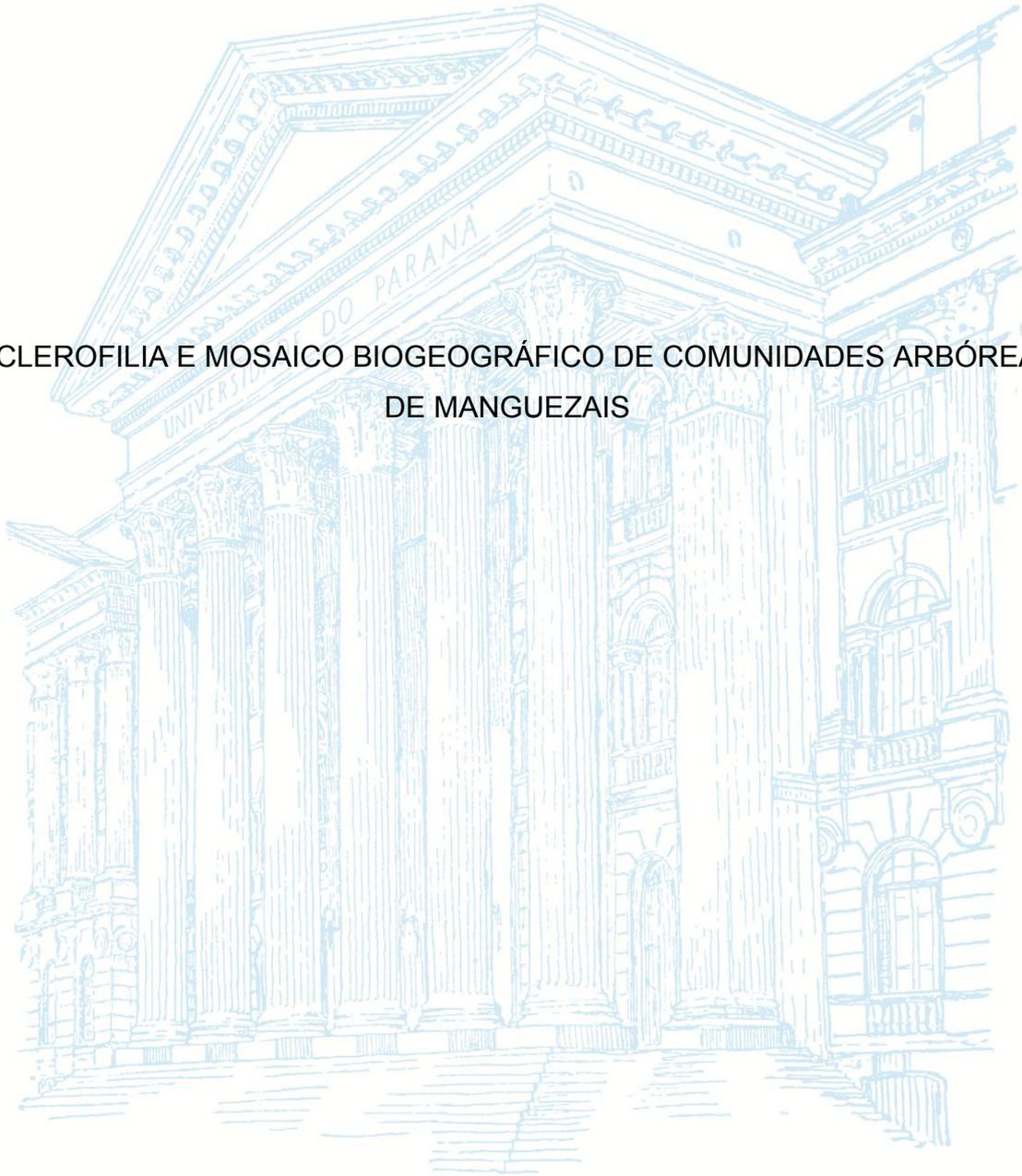


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA SERENESKI DE LIMA

ESCLEROFILIA E MOSAICO BIOGEOGRÁFICO DE COMUNIDADES ARBÓREAS
DE MANGUEZAIS



CURITIBA

2018

CAROLINA SERENESKI DE LIMA

ESCLEROFILIA E MOSAICO BIOGEOGRÁFICO DE COMUNIDADES ARBÓREAS
DE MANGUEZAIS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ecologia e Conservação.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Regina T. Boeger

Coorientador: Prof. Dr. Walter A. Boeger

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Lima, Carolina Sereneski de
Esclerofilia e mosaico biogeográfico de comunidades arbóreas de
manguezais. / Carolina Sereneski de Lima. – Curitiba, 2018.
96 p.: il. ; 30cm.

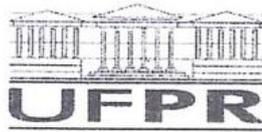
Orientadora: Maria Regina T. Boeger

Co-orientador: Walter A. Boeger

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

1. Salinidade. 2. Filogeografia. 3. Manguezais. I. Título II. Boeger, Maria
Regina T. III. Boeger, Walter A. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e
Conservação.

CDD (20. ed.) 574.526325



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ECOLOGIA E
CONSERVAÇÃO

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CAROLINA SERENESKI DE LIMA** intitulada: **Esclerofilia e mosaico biogeográfico de comunidades arbóreas de manguezais**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua apresentação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 09 de Abril de 2018.

MARIA REGINA TORRES BÖEGER
Presidente da Banca Examinadora

ELAINE BERNINI
Avaliador Externo

GUILHERME DUBAL DOS SANTOS SEGER
Avaliador Externo

MAURICIO OSVALDO MOURA
Avaliador Interno

MARCEL KRUCHELSKI TSCHA
Avaliador Externo

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Bernadete e Elizeu, por toda educação, apoio, incentivo, ajuda em tantos anos de estudo e formação. Sou muito grata pela pessoa que hoje sou e sem vocês isso não seria possível.

Meus agradecimentos à minha orientadora Prof. Maria Regina Boeger, por todo amadurecimento, aprendizado e formação profissional e acadêmica ao longo desses nove anos de caminhada.

Ao Prof. co-orientador Walter Boeger, pelo conhecimento e principalmente por incentivar o mergulho em áreas tão complexas e desconhecidas para mim, a filogeografia, genética molecular e evolução.

Ao co-orientador informal Rafael Baggio, por toda amizade, paciência, auxílio e orientação para a conclusão do capítulo II. Seu papel foi fundamental na reta final do doutorado, obrigada por ensinar com tanta paciência e zelo.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva, pela amizade ao longo de todos esses anos, pelas conversas, troca de experiências, rodas de chimarrão, festinhas e parceria nas longas filas do RU. Em especial à Daiane Pilatti, pela amizade, conversas, científicas ou não, e apoio mútuo no processo.

Aos meus amigos de longa data, que participarem direta e indiretamente do processo, obrigada pela amizade, força, carinho e compreensão. Às “bagaceiras”, pela alegria, parceria e amizade. À Ticyana Novaes, por todo auxílio, conversas e ajuda no processo de finalização desta tese.

Ao corpo docente e colegas de classe do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação. À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Ao meu esposo, Daniel Oliveira Machado, por me incentivar em todos os momentos, pela infinita paciência, compreensão, ajuda, força e amor incondicional. Sem você, nestes quatro anos, certamente tudo seria muito mais difícil. Obrigada por ser meu melhor amigo e esse companheiro maravilhoso.

*“A mente que se abre a uma
nova idéia jamais voltará ao seu
tamanho original.”*

Albert Einstein

RESUMO

O ambiente dos manguezais é influenciado pela magnitude e periodicidade das marés. Consequentemente, o ecossistema é caracterizado por solos alagados, inconsolidados e com variações de salinidade. Para sobrevivência nesse nicho ecológico limitante, as comunidades arbóreas exclusivas apresentam diversas estratégias morfológicas, fisiológicas e reprodutivas. Devido ao mosaico de condições, os manguezais são ecossistemas únicos, com elevada complexidade ambiental, ecológica e histórica. O objetivo geral desse estudo foi compreender dinâmicas ecológicas, históricas e evolutivas de espécies arbóreas exclusivas de manguezais, investigando a complexidade do ecossistema em diferentes níveis. O capítulo I teve como objetivo avaliar, a nível local, o grau de esclerofilia e a morfologia foliar de espécies arbóreas de manguezais subtropicais (*Avicennia schaueriana* Stapf and Leachman, *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn e *Rhizophora mangle* L., em duas zonas com condições edáficas e de salinidade distintas (zona de borda e de interior). *Avicennia schaueriana* apresentou folhas mais esclerófilas na borda, *R. mangle* apresentou folhas mais esclerófilas no interior e *L. racemosa* manteve folhas com esclerofilia semelhante entre zonas. As três espécies estão submetidas sobre as mesmas condições ambientais na borda e no interior dos manguezais. Entretanto, não foi possível estabelecer um padrão único para cada zona avaliada. O estudo revelou que o fator intrínseco de cada espécie, juntamente como o mosaico de condições ambientais dos manguezais, foram determinantes para o grau de esclerofilia e morfologia foliar das espécies avaliadas. O capítulo II teve como objetivo investigar, a nível global, a origem de caracteres considerados como adaptativos para o ecossistema manguezal. Foi realizado o protocolo de reconstrução de caracteres ancestrais sobre filogenias conhecidas, nas três principais famílias de manguezais: Acanthaceae, Combretaceae e Rhizophoraceae. Essas reconstruções permitiram avaliar se características são adaptativas (resposta à pressão seletiva local) ou processos de *ecological fitting* (atributos que já estavam presentes nas linhagens no momento em que ocorreu o encontro com os manguezais). A reconstrução de caracteres evidenciou que, as raízes aéreas e a viviparidade nas famílias Acanthaceae e Combretaceae, representam atributos adaptativos. Contudo, houve evidências de que a raiz aérea precede a colonização dos manguezais em espécies de Rhizophoraceae. Para as glândulas de sal em Acanthaceae e Combretaceae foram encontrados indícios de exaptação, e para o porte arbóreo em Acanthaceae evidência de plasticidade fenotípica. A presença de atributos importantes para colonização das espécies de manguezais ocorreu por um mosaico de dinâmicas evolutivas, representados por adaptação e processos de *ecological fitting*. O capítulo III teve como objetivo avaliar, a nível regional, a estruturação populacional e o fluxo gênico de sete populações de *Laguncularia racemosa* ao longo da costa Leste Ocidental. A genotipagem de sete regiões nucleares revelou que as populações de *L. racemosa* avaliadas são geneticamente estruturadas, formando quatro populações panmíticas (Flórida, Caribe, Brasil - exceto Santa Catarina, e Santa Catarina). Há evidências de que os padrões de estruturação genética atuais são resultado da influência de correntes oceânicas e climatológicas. Foram encontradas também evidências de que a maior diversidade observada nas populações equatoriais está relacionada à última

glaciação do Quaternário. Neste período, houve a formação de refúgios nas regiões equatoriais, permitindo assim, maior diversidade genética nessas populações.

Palavras-chave: Área específica foliar. Salinidade. Filogeografia. Fluxo gênico. Adaptação. *Ecological fitting*.

ABSTRACT

The mangrove environment is influenced by the magnitude and periodicity of the tides. Consequently, the ecosystem is characterized by flooded, inconsolidated soils with variations in salinity. To survive in an limiting ecological niche the tree communities present morphological, physiological and reproductive traits. Due to the mosaic of conditions, mangroves are unique ecosystems with high environmental, ecological and historical complexity. The general aim of the present study was evaluated ecological, historical and evolutionary dynamics of tree mangroves species, investigating the ecosystem complexity at different levels. The aim of the chapter I was to evaluate, in the local level, the degree of sclerophylly of subtropical mangrove species (*Avicennia schaueriana* Stapf and Leachman, *Laguncularia racemosa* (L.) CF Gaertn and *Rhizophora mangle* L.) with distinct soil and salinity conditions (fringe and interior zone). *Avicennia schaueriana* showed more sclerophyllous leaves at the fringe zone, *R. mangle* in the interior zone and, *L. racemosa* showed no difference among zones. Despite the fact that all three species of mangrove are subjected to similar environmental conditions, species-related and environmental zone-related factors were determinants of the morphological patterns and levels of sclerophylly observed. The aim of the chapter II was to investigate, at a global level, the origin of characters considered as adaptive for the mangrove ecosystem. The reconstruction protocol of ancestral characters on known phylogenies was used in the three major mangrove families: Acanthaceae, Combretaceae and Rhizophoraceae. These reconstructions allowed to evaluate if characters are adaptive (response to local selective pressure) or processes of ecological fitting (attributes that were already present in the lineages at the time of the encounter with the mangroves). The reconstruction evidenced that aerial roots and viviparity in Acanthaceae and Combretaceae species represented adaptive characters. However, was found evidence that aerial root precedes the colonization of mangroves in Rhizophoraceae species. Salt glands in Acanthaceae and Combretaceae showed evidence of exaptation, and life form in Acanthaceae evidence of phenotypic plasticity. Therefore the presence of key traits in tree mangrove species occurred through a mosaic of evolutionary processes, represented by adaptation and ecological fitting processes. The aim of the chapter III was to evaluate, at regional level, the population structure and the gene flow of seven populations of *Laguncularia racemosa* along the Western Atlantic. The genotyping of seven nuclear regions revealed that the evaluated populations of *L. racemosa* was genetically structured, constituted of four panmictic populations (Florida, Caribbean, Brazil - except Santa Catarina and Santa Catarina). Were found evidence that the genetic structure patterns are a result of the influence of oceanic and climatological currents. Was also found evidence that the higher diversity observed in equatorial populations is related to the last Quaternary glaciation. In this period, there was a formation of refuges in the equatorial regions, which allowed higher genetic diversity in these populations.

Key words: Specific leaf area. Salinity. Phylogeography. Gene flow. Adaptation, Ecological fitting.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	11
	REFERÊNCIAS	15
2	CAPÍTULO I	18
	The influence of edaphic factors on sclerophylly of mangrove tree species in southern Brazil	19
2.1	ABSTRACT	20
2.2	RESUMEN	20
2.3	INTRODUCTION	21
2.4	MATERIALS AND METHODS	23
2.5	RESULTS	26
2.6	DISCUSSION	33
2.7	ACKNOWLEDGMENTS	36
2.8	REFERENCES	36
3	CAPÍTULO II	42
	Adaptação ou <i>ecological fitting</i>? Compreendendo a origem de atributos chave em linhagens de árvores de manguezais	43
3.1	RESUMO	44
3.2	ABSTRACT	44
3.3	INTRODUÇÃO	45
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	47
3.5	RESULTADOS	50
3.6	DISCUSSÃO	57
3.7	CONCLUSÕES	62
3.8	AGRADECIMENTOS	63
3.9	REFERÊNCIAS	63
4	CAPÍTULO III	69
	Efeitos históricos e recentes na diversidade e estruturação genética de <i>Laguncularia racemosa</i> (L) Gaertn em estuários da costa Leste Ocidental	70
4.1	RESUMO	71
4.2	ABSTRACT	71

4.3	INTRODUÇÃO	72
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	74
4.5	RESULTADOS.....	77
4.6	DISCUSSÃO	80
4.7	AGRADECIMENTOS	87
4.8	REFERÊNCIAS.....	87
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
	REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO GERAL

A estrutura e a distribuição mundial da biodiversidade de plantas são geralmente governadas por fatores históricos, clima e localização geográfica. Regiões distintas ao longo dos continentes apresentam formas de vegetação similares, influenciadas pela precipitação, temperatura e umidade (WOODWARD & WILLIAMS, 1987; HOFFMANN & JACKSON, 2000; WOODWARD *et al.*, 2004). As florestas tropicais, em sua maioria, apresentam uma das maiores riquezas e diversidade de espécies, proporcional à diminuição da latitude e aumento da temperatura (WOODWARD *et al.*, 2004). Entretanto, para os manguezais, ecossistema costeiro de regiões tropicais e subtropicais, esses padrões de distribuição são distintos (GIRI *et al.* 2010).

Os manguezais representam apenas 1% da biodiversidade de florestas tropicais. Contudo, está entre os ecossistemas mais produtivos mundialmente, sendo reconhecido por diversos serviços ecossistêmicos, constituem a base de cadeias tróficas de espécies de importância ecológica e/ou econômica (HOGARTH 1999; GIRI *et al.* 2010; SPALDING *et al.* 2010; DONATO *et al.*, 2011). Esse ecossistema é também considerado como um berçário ecológico, gerador de bens e serviços à população humana, além da proteção da linha da costa contra desastres ambientais (SPALDING *et al.* 2010).

Apesar da elevada importância ecológica, social e econômica, os manguezais encontram-se ameaçados devido à ação de diversos tensores antrópicos. Dentre os principais tensores estão: desmatamento, áreas para construção de aterros, especulação imobiliária, construção de portos e áreas para aquicultura (KATHIRESAN & BINGHAM 2001; SPALDING *et al.* 2010). Estimativas indicam que nos últimos 50 anos houve um declínio de cerca de 30% a 50% de toda a cobertura vegetal do ecossistema (POLIDORO *et al.*, 2010). Os manguezais por serem extremamente suscetíveis, possivelmente serão um dos primeiros ecossistemas a ser afetado pelas rápidas mudanças climáticas (JAGTAP & NAGLE 2007; GILMAN *et al.* 2008). Assim sendo, projetos que busquem compreender a ecologia e as dinâmicas deste ecossistema são fundamentais para subsidiar ações e áreas prioritárias de conservação, além de compreender o seu significado e papel nos ambientes adjacentes (PARIDA & JHA, 2010).

O ambiente de transição entre a região costeira e marinha submete os manguezais à magnitude e periodicidade das marés. Dessa forma, o ambiente é caracterizado por solos alagados, ricos em nutrientes, inconsolidados e com variações de salinidade. Devido a estas características, os manguezais são ecossistemas únicos, com elevada complexidade ambiental, ecológica e histórica (KATHIRESAN & BINGHAM, 2001; SPALDING *et al.*, 2010; PARIDA & JHA, 2010). Apesar de muitos estudos nas últimas décadas, as dinâmicas ecológicas, históricas e evolutivas dos manguezais ainda não foram totalmente elucidadas. A adição de conhecimento acerca dessas dinâmicas permite ampliar a compreensão de como as mudanças climáticas podem influenciar na dinâmica temporal, espacial e de distribuição dos manguezais (FRANKHAM, 2005; CHEN *et al.*, 2011). Neste contexto, o objetivo desse estudo foi compreender padrões ecológicos, processos históricos, evolutivos e de colonização de espécies arbóreas de manguezais, permitindo assim, avaliar a complexidade do ecossistema em diferentes níveis.

As comunidades de árvores de manguezais estão sujeitas a condições ambientais limitantes e possuem diferentes estratégias para se desenvolver ao estresse ambiental (GILMAN *et al.*, 2008). A esclerofilia é uma resposta a condições ambientais estressantes (READ & SANSON, 2003) e está entre as principais estratégias para o desenvolvimento nesse ecossistema. Nesse contexto, No **capítulo I** foi avaliada a morfologia foliar e a esclerofilia de espécies arbóreas (*Avicennia schaueriana* Stapf and Leachman, *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn e *Rhizophora mangle* L.), a nível local, em manguezais subtropicais brasileiros. O objetivo desse capítulo foi avaliar se diferenças nas condições edáficas e na salinidade de duas zonas distintas de manguezais (zona de borda e zona de transição), podem afetar a morfologia das folhas e, conseqüentemente, o grau de esclerofilia dessas espécies.

A esclerofilia, juntamente com outros atributos (e.g. raízes aéreas, viviparidade), constituem estratégias que permitiram o estabelecimento de espécies exclusivas nos manguezais (SERENESKI-LIMA *et al.*, 2013; ARRIVABENE *et al.*, 2014). Apesar de apresentarem estratégias similares, as comunidades de plantas compreendem um grupo heterogêneo de linhagens filogeneticamente distintas (DUKE, 1992; SCHWARZBACH & RICKLEFS, 2001). Segundo alguns autores, o estabelecimento nesse ecossistema depende de atributos considerados adaptativos,

relacionados à alta pressão seletiva do ambiente (ELLISON & FARNSWORTH, 2001; DUKE, 1992; ALONGI, 2009; MORI *et al.*, 2015). Entre os atributos considerados mais importantes estão as raízes aéreas, a viviparidade, mecanismos de tolerância a salinidade e folhas esclerófilas (SHI *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2010; SERENESKI-LIMA *et al.*, 2013; ARRIVABENE *et al.*, 2014). A ecologia e fisiologia desses principais atributos são bem descritos atualmente. Entretanto, a relação dessas estratégias com as condições ambientais, formações florestais e reconstrução histórica evolutiva ainda não foram totalmente explorados. Ainda, se os atributos relevantes para o desenvolvimento neste ambiente são, na sua totalidade, adaptativos. Desse modo, o objetivo do **capítulo II** foi investigar, a nível global, a origem de atributos chave, considerados originalmente como adaptativos. Foram avaliadas as três principais famílias botânicas de manguezais (Acanthaceae, Combretaceae e Rhizophoraceae), através do protocolo de reconstruções de caracteres ancestrais sobre filogenias conhecidas. Essas reconstruções oferecem subsídios para a avaliação de atributos adaptativos (se surgiram como resposta à pressão seletiva local) ou de processos de *ecological fitting* (se já estavam presentes nas linhagens no momento em que ocorreu o encontro com os manguezais).

A presença de estratégias, anterior ou posterior à colonização dos manguezais, influenciaram os padrões de diversidade das espécies e populações atuais (DUKE *et al.*, 2002). Além de atributos morfológicos, fisiológicos e reprodutivos, a oportunidade das espécies em colonizar novas áreas é também relevante, uma vez que os padrões históricos englobam um mosaico de condições relacionadas a mudanças climáticas, correntes oceânicas e climatológicas (DODD *et al.*, 2002; TRIEST, 2008; KENNEDY *et al.*, 2016). A compreensão da estrutura genética permite elucidar os principais mecanismos históricos e contemporâneos que influenciaram a distribuição de populações na região. Esse conhecimento torna-se fundamental para compreender como as mudanças climáticas podem influenciar a dinâmica de *L. racemosa* nesse ecossistema (CHEN *et al.*, 2011; BELLARD *et al.*, 2012). Assim, no **capítulo III** foram avaliados aspectos biogeográficos, históricos e de colonização, a nível regional, em oito populações de *Laguncularia racemosa* em manguezais da costa Leste Ocidental. *Laguncularia racemosa* está entre as oito espécies arbóreas que compõe os manguezais da região Atlântico-Caribe-Leste Pacífica (AEP) (LUTHER & GREENBERG, 2009; LO *et al.*, 2014). O objetivo desse

capítulo foi avaliar a estruturação genética, o padrão do fluxo gênico e os processos históricos de colonização de populações de *L. racemosa* ao longo da costa Leste Ocidental, por meio de marcadores moleculares microssatélites.

REFERÊNCIAS

- ALONGI, D.M. 2009. **The energetics of mangrove forests**. Springer Science and Business, New York.
- ARRIVABENE, H.P., SOUZA, I., CÓ, W.L.O., RODELLA, R.A., WUNDERLIN, D.A., MILANEZ C.R., 2014. Functional traits of selected mangrove species in Brazil as biological indicators of different environmental conditions. **Science of the Total Environment**, v. 476, p. 496–504.
- BELLARD, C.; BERTELSMEIER, C.; LEADLEY, P.; THUILLER, W.; COURCHAMP, F. 2012. Impacts of climate change on the future of biodiversity. **Ecology Letters**, v. 15, p. 365–377.
- CHEN, I.C.; HILL, J.K.; OHLEMÜLLER, R.; ROY, D.B.; THOMAS, C.D. 2011. Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. **Science**, v. 333, p. 1024–1026.
- DODD, R.S.; RAFII, Z.A. 2002. Evolutionary genetics of mangroves: continental drift to recent climate change. **Trees**, v. 16, p. 80–86.
- DONATO, D.C.; KAUFFMAN, J.B.; MURDIYARSO, D.; KARNIANTO, S.; STIDHAM, M.; KANNINEN, M. 2011. Mangroves among the most carbon-rich forests in the tropics. **Nature Geoscience**, v. 4, p. 293–297.
- DUKE, N.C. 1992. **Mangrove floristics and biogeography**. Tropical mangrove ecosystems, Coastal and estuarine series. American Geophysical Union, Washington. 63–100 pp.
- ELLISON, A.M. & FARNSWORTH, E.J. 2001. Mangrove communities. **Marine Community Ecology**. Sinauer Press, Sunderland, MA. 423–442 pp.
- FRANKHAM, R. 2005. Genetics and extinction. **Biological conservation**, v. 126, p. 131–140.
- GILMAN, E.L.; ELLISON, J.; DUKE, N.C.; FIELD, C. 2008. Threats to mangroves from climate change and adaptation options. **Aquatic Botany**, v. 89, p. 237–250.
- GIRI, C.; OCHIENG, E.; TIESZEN, L.L.; ZHU, Z.; SINGH, A.; LOVELAND, T.; MASEK, J.; DUKE, N. 2010. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, v. 20, n. 1, p. 154–159.
- HOFFMANN, W.A.; JACKSON, R.B. 2000. Vegetation–climate feedbacks in the conversion of tropical savanna to grassland. *Journal of Climate*. V. 13, n. 1593–1602.
- HOGARTH, P.J. 1999. **The biology of mangroves**. Oxford University Press Inc., New York, 2–9 pp.

JAGTAP, T.G.; NAGLE, V.L. 2007. Response and adaptability of mangrove habitats from the Indian subcontinent to changing climate. *Ambio*, v. 36, p. 328–334.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B.L. 2001. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, v. 40, p. 81–251.

KENNEDY, J.P.; PIL, M.W.; PROFFITT, C.E; BOEGER, W.A.; STANFORD, A.M.; DEVLIN, D.J. 2016. Postglacial expansion pathways of red mangrove, *Rhizophora mangle*, in the Caribbean Basin and Florida. **American Journal of Botany**, v. 103, n. 2, p. 260–276.

LO, E.Y.Y.; DUKE, N.C.; SUN, M. 2014. Phylogeographic pattern of *Rhizophora* (Rhizophoraceae) reveals the importance of both vicariance and long-distance oceanic dispersal to modern mangrove distribution. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 83, p. 1–15.

MORI, G.M.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P. 2015. Multiple-Geographic-Scale Genetic Structure of Two Mangrove Tree Species: The Roles of Mating System, Hybridization, Limited Dispersal and Extrinsic Factors. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–23.

LUTHER, D.A.; GREENBERG, R. 2009. Mangroves: a global perspective on the evolution and conservation of their terrestrial vertebrates. **BioScience**, v. 59, n. 7, p. 602–612.

PARIDA, A.K.; JHA, B. 2010. Salt tolerance mechanisms in mangroves: a review. **Trees**, v. 24, n. 199–217.

POLIDORO, B.A.; CARPENTER, K. E.; COLLINS, L.; DUKE, N. C.; ELLISON, A. M.; ELLISON, J. C. et al. 2010. The Loss of Species: Mangrove Extinction Risk and Geographic Areas of Global Concern. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10095.

READ, J.; SANSON, G.D. 2003. Characterizing sclerophylly: the mechanical properties of a diverse range of leaf types. **The Phytologist**, v. 160, p. 81–99.

SCHWARZBACH, A.E.; RICKLEFS, R.E. 2000. Systematic affinities of Rhizophoraceae and Anisophylleaceae, and intergeneric relationships within Rhizophoraceae, based on chloroplast DNA, nuclear ribosomal DNA, and morphology. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 4, p. 547–564.

SERENESKI-LIMA, C.; BOEGER, M.R.T.; CARVALHO, L.L.; PELOZO, A.; SOFFIATTI, P. 2013. Sclerophylly in mangrove tree species from South Brazil. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 84, n. 1159–1166.

SHI, S., HUANG, Y., ZENG, K., TAN, F., HE, H., HUANG, J., FU, Y. 2005. Molecular phylogenetic analysis of mangroves: independent evolutionary origins of vivipary and salt secretion. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 34, n. 1, 159–166.

SPALDING, M.; KAINUMA, M. & COLLINS, L. 2010. **World Atlas of Mangroves**. Earthscan, London/Washington, DC. 5-14 pp.

TRIEST, L. 2008. Molecular ecology and biogeography of mangrove trees towards conceptual insights on gene flow and barriers: A review. **Aquatic Botany**, v. 89, p. 138–154.

WANG, L.; MU, M.; LI, X.; LING, P.; WANG, W. 2010. Differentiation between true mangroves and mangrove associates based on leaf traits and salt contents. **Journal of Plant Ecology**, v. 4, n. 4, p. 292-301.

WOODWARD, F.I.; LOMAS, M.R.; KELLY, C.K. 2004. Global climate and the distribution of plant biomes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1450, p. 1465–1476.

WOODWARD, F.; WILLIAMS, B. 1987. Climate and plant distribution at global and local scales. **Vegetatio**, v. 69, n. 1/3, p. 189–197.

2 CAPÍTULO I

The influence of edaphic factors on the sclerophylly of mangrove tree species in southern Brazil

La influencia de los factores edáficos en la esclerofilia de especies de manglares del sur de Brasil

Carolina Sereneski de Lima^{*1}, Maria Regina Torres Boeger¹ and Leticia Larcher de Carvalho².

1. Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Caixa Postal 19031, 81531-990, Curitiba, PR, Brasil.

2. Instituto Homem Pantaneiro. Ladeira Jose Bonifácio, 171, 79300-010, Corumbá, MG, Brasil.

*Corresponding author: Carolina Sereneski de Lima. sereneskilima@gmail.com. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua Francisco H. dos Santos s/n, Jardim das Américas, CEP 81531-980, CP 19073, Curitiba, Paraná, Brazil. +55 41 33611765.

2.1 ABSTRACT. Mangroves are coastal ecosystems constituted by tree communities, which are subject to limiting environmental conditions and have adaptations to develop under such stress conditions. The sclerophylly is a response to environments with multiple stresses, as drought and low soil fertility, such as mangrove forests. The aim of the study was to establish if the degree of sclerophylly, expressed in leaf morphology and nutrient contents in tree species of mangroves, is associated with edaphic and salinity conditions. The study was performed in two mangroves in the state of Paraná, Brazil, where two areas were sampled (fringe and interior). Leaves of 15 individuals of *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* and *Rhizophora mangle*, were collected for chemical and morphological analysis, in addition to soil samples adjacent to each tree were collected to perform fertility analyses. The fringe soils samples present higher carbon and organic matter, C:P ratio, pore water salinity and sand predominance. The specific leaf area (SLA) showed that species have sclerophyllous leaves in different degrees: *L. racemosa* > *R. mangle* > *A. schaueriana*. Despite the fact that all three species of mangrove are subjected to similar environmental conditions, species-related and environmental zone-related factors were determinants of the morphological patterns and levels of sclerophylly observed. A unique pattern shared by the three species could not be established because they respond differently to similar environmental conditions.

Key-words: specific leaf area, nitrogen, phosphorus, soil, salinity.

2.2 RESUMEN. Los manglares son ecosistemas costeros integrados por comunidades de árboles, sujetas a condiciones ambientales limitantes y que presentan adaptaciones para desarrollarse bajo condiciones de estrés. La esclerofilia es definida como una respuesta no específica a ambientes con múltiples estrésés ambientales. El objetivo del estudio fue establecer el grado de esclerofilia de especies arbóreas de manglar en respuesta a las condiciones edáficas y a la salinidad, expresadas en los patrones morfológicos y nutrientes foliares. El estudio se realizó en dos manglares en el estado de Paraná, Brasil donde se muestrearon dos zonas (borde y transición). Hojas de 15 individuos por zona de *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* y *Rhizophora mangle*, fueron recolectadas para los análisis químicos y morfológicos, además de muestras de suelo para análisis de fertilidad. El borde tiene mayor concentración de carbono, materia orgánica, mayor

razón C:P, salinidad del agua intersticial y predominio de arena. Las tres especies tienen hojas esclerófilas en diferentes grados según el área específica foliar: *L. racemosa* < *R. mangle* < *A. schaueriana*. Aunque que las tres especies están sometidas a las mismas condiciones ambientales el factor intrínseco de cada especie es determinante en el grado de esclerofilia. No se pudo establecer un patrón único compartido por las tres especies ya que responden de manera diferente a condiciones ambientales similares.

Palabras-clave: área foliar específica, nitrógeno, fósforo, suelo, salinidad.

2.3 INTRODUCTION

Mangroves are ecosystems that grow along protected sedimentary shores of tropical and subtropical coastlines (Parida & Jha, 2010; Mitra, 2013). The most important features of mangrove forests are defined by the periodic inundation by the tidal regime and the influence of both terrestrial and marine conditions (Spalding et al., 2010). The soil of mangrove forests is permanently waterlogged, oligotrophic, unconsolidated, with fluctuating salinity, typically anoxic and rich in organic matter. Such environmental characteristics represent a stressful environment for the plant community and limit the development of mangrove forests (Hogarth, 1999; Schaeffer-Novelli et al., 2000). Although, mangrove tree species represent the most productive vegetal communities in world and are able to tolerate these limiting conditions by special adaptations, such as aerial roots, viviparous propagules, and sclerophyllous leaves (Alongi et al., 1992; Wang et al., 2010; Sereneski-Lima et al., 2013; Arrivabene et al., 2014). Thus, sclerophylly may have been a key adaptation to improve survival and allow high productivity in this environment.

Sclerophylly, by definition “hard-leaved”, characterizes a non-specific response that plants develop to survive in an environment with a wide range of stresses (Read et al., 2006). Sclerophyllous leaves are more resistant to herbivores, drought and low soil fertility, due to features such as high leaf thickness and density, and low specific leaf area (sclerophylly index) (Schimper, 1903; Loveless, 1962; Choong et al., 1992; Feller, 1996; Edwards et al., 2000; Boeger & Wisniewski, 2003; Read & Season, 2003; Hanley et al., 2007). Sclerophylly is also linked to low water

availability in xerophytic environments and (Read & Season, 2003), in mangroves, to conditions of high salinity (Naidoo, 2010). Salinity is one of the most challenging conditions in the mangrove habitat and the plant community possesses a variety of mechanisms and strategies for salt management. Highly saline habitats induce in plants the development of mechanisms to aid in water conservation, such as an increase in epidermal and mesophyll thickness, succulence, and a decrease in leaf area and stomata density (Ball, 2002; Parida & Das, 2005; Wang et al., 2010), all of which are linked to sclerophylly.

In mangroves, edaphic conditions are governed by the dynamics of inundation, tides, which results in a gradient among areas within these forests. This gradient creates a zonation pattern on regional and local scales, which is controlled by water balance, wave regime, salinity of the soil and fluctuating tides. Along the floodplain gradient, physiographic plant types may be distinguished, with different structural and functional responses to dominant local physical processes (Thom, 1967; Lugo & Snedaker, 1974; Cintron et al., 1978; Jiménez & Sauter, 1991; Twilley et al., 1998; Schaeffer-Novelli et al., 2000). Fringe, basin and interior mangroves frequently exhibit differences in species dominance, since a lower frequency of tidal flooding may result in a dominance of species with greater efficiencies of nutrient and water use (Lugo & Snedaker, 1974; Schaeffer-Novelli et al., 2000).

Fringes may be defined as mangroves that occur along seaward edges and experience the influence of regular flushing that maintains soil salinity close to that of seawater (Lugo & Snedaker, 1974; Schaeffer-Novelli et al., 2000). Interior mangroves, also called transition mangroves or basin forests, represent the mangrove forests that occur on salt flats where tidal flooding frequency reduced relative to the fringe (Lugo & Snedaker, 1974; Schaeffer-Novelli et al., 2000; Lovelock & Feller, 2003; Estrada et al., 2013). These differences among mangrove zones result in differences in forest structure and development. For example, trees on the fringe are generally taller with well-developed canopies (Naidoo, 2010; Schaeffer-Novelli et al., 2000), whereas trees in the interior are more scrub-like with dwarfed, small and sparse vegetation as a result of infrequent tidal inundation, which leads to a higher evaporation rate and higher salinities than in fringe mangroves (Naidoo, 2010).

Differences in forest structure also influence the degree of sediment saturation, which directly affects the availability of chemical elements for plants (Bernini et al., 2006). In addition to inundation dynamics and zonation, some studies have indicated that the availability of nutrients, especially nitrogen (N) and phosphorus (P), plays an important role in mangrove growth (Feller, 1995; Lovelock et al., 2006a), and is linked to morphological and anatomical differences among species in environments of high or low nutrient availability. For example, mangrove species that grow in oligotrophic soils possess mechanisms for retaining and recycling nutrients (Alongi et al., 1992), such as an increase in the sclerophylly of leaves over soils with low P (Reef et al., 2010).

Previous studies have shown that the three mangrove species in southern Brazil, *Avicennia schaueriana* Stapf and Leachman, *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn and *Rhizophora mangle* L., are sclerophyllous to different degrees (Sereneski-Lima et al., 2013). Since sclerophylly is a response to a range of environmental conditions to which leaf morphology can respond, the aim of our study was to evaluate if differences in the edaphic conditions between the fringe and the interior of mangrove forests can affect leaf morphology and consequently the degree of sclerophylly of these species. Our hypotheses are: (1) the degree of sclerophylly is altered by changes in edaphic factors induced by tidal inundation; (2) the degree of sclerophylly is greater in the fringe than in the interior of the mangrove forest.

2.4 MATERIALS AND METHODS

Study site: The study was performed on the southern coast of Brazil in Guaratuba Bay, State of Paraná (25°49' S and 48°35' W) (Figure 1). Guaratuba Bay encompasses about 48.73 km² of the coast (Madi et al., 2015) and has a subtropical mesothermic climate with hot summers and no dry season; it is classified as Cfa according Koopen's classification. The estimated average annual temperature varies between 20.8°C and 22.0°C and the annual precipitation is 2,520 mm (Simepar, 2016). Three typical mangrove tree species occur in the study area: *Avicennia schaueriana* (Acanthaceae), *Laguncularia racemosa* (Combretaceae) and *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae).

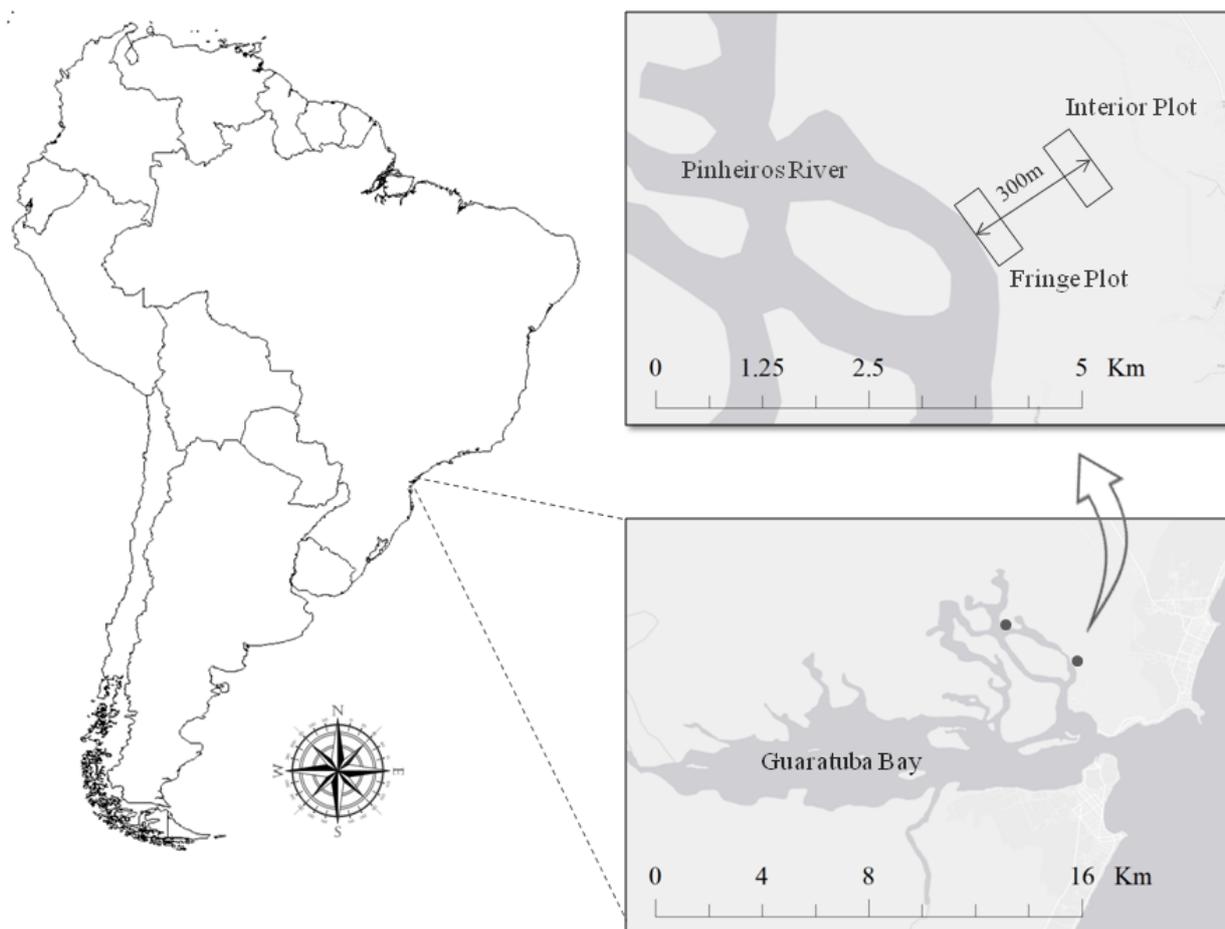


Figure 1. Location of studied site in southern Brazil along the shoreline of the Pinheiros River, Guaratuba Bay. The black points in the lower figure represent the two studied mangrove areas. The upper figure characterizes the sampling design and the arrangement of the transect extending from the fringe to the interior of the mangrove areas. Two plots were delimited in each transect, one representing the fringe and the other representing the interior plots.

Sampling design: We selected two mangrove areas along the shoreline of the Pinheiros River in Guaratuba Bay, and established a 300 m transect in each, extending from the fringe to the interior perpendicular to the shoreline (Figure 1). Two plots were delimited in each transect, one representing the fringe (F) and the other representing the interior (I) sections. Fifteen individuals of each species, between 8-15 meters high, were selected in each plot, for a total of 30 individuals of each species per area (transect). Twenty mature leaves were collected from each individual plant between the fourth and the sixth node from the apex and directly

exposed to the sunlight. Of the total 1,200 leaves collected for each species (20 leaves x 30 individuals x 2 areas), 600 were used for analysis of leaf morphology and 600 were used for chemical analysis.

Soil analysis: In each plot, pore-water salinity was measured 30 cm deep at low tide with a digital hydrometer (Akso AK83), in five randomly selected points. Also at low tide, in each plot, five soil samples 30 cm deep were collected with an auger for chemical content and particle-size distribution analysis. The pH, the Organic Matter, Carbon, and Phosphorus content were estimated using an atomic absorption spectrophotometer (AAS) (Rajj et al., 2001), while Nitrogen was estimated by the combustion method using an Elementar® model VARIO-EL-III analyzer. The distribution analysis of soil particle-size was performed by the pipette method. Soil samples were air-dried at room temperature and passed through a 2 mm sieve to obtain the air-dried fine soil fraction (< 2 mm). Triangle textural classes (IAC) were used for textural classification (Camargo et al., 2009).

Leaf morphological analysis: For each leaf collected we measured the following morphological parameters: leaf thickness (mm) measured in the median region of the lamina with a digital caliper; leaf dry weight (g), estimated with a digital analytical balance from previously dehydrated leaves; leaf area (cm²), estimated from images obtained with a flatbed scanner calibrated with Sigma Scan PRO software (version 5.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA); specific leaf area (cm².g⁻¹) and leaf density (specific leaf mass.1/thickness; mg.mm⁻³). The density of salt secretory structures (no.mm⁻²); and stomata density (no.mm⁻²) were estimated from imprints made with nail polish of the median region of the epidermal surfaces of the leaves and using a light microscope coupled to a camera lucida.

Leaf chemical analysis: Leaf samples were completely dried in a forced-air oven at 60°C until constant weight. Phosphorus (P) analyses were carried out by nitric-perchloric digestion (Martins & Reissmann, 2007) and argon plasma optical emission spectrometry (ICP OES). Nitrogen (N) and Carbon (C) were determined by the combustion method in an Elementar® model VARIO-EL-III analyzer. The NUE index was used to evaluate the efficiency of nitrogen use by each species (Sobrado, 2005).

Statistical analysis: Averages and respective standard deviations were calculated for all quantitative variables, and in all cases data were tested for homogeneity of variances. One-way ANOVA tested leaf traits and edaphic differences between fringe and interior. Two-way ANOVA analyzed differences among species and among plots, and interactions of these two factors, with leaf traits and leaf nutrients as response variables. One-way and Two-way ANOVA was performed with 5% of significance in the R environment (Project for Statistical Computing 3.1.3). A multivariate analysis of variance model was constructed using Distance Based Redundancy Analysis (dbRDA) using Gower distance with the function “capscale” of the “vegan” package in the R environment (Oksanen et al., 2006) to determine the most influential environmental variables (areas, plots and soil parameters: pore water salinity; clay, silt and sand content; organic matter content; pH; N, P and C soil content; and C:N, C:P and N:P ratios) and characteristics of leaf morphology (specific leaf area, leaf density, dry weight, leaf area and leaf thickness) (Legendre & Anderson, 1999). Soil parameters were standardized by standard deviation. We tested the significance of each predictor with 999 permutations through ANOVA.

2.5 RESULTS

The soil of the studied mangroves was classified as an isomorphic, sapric, salic-sodic gleysol with high electric conductivity and Na content. Though the content of silt, clay and sand did not differ significantly between plots, the fringe exhibited sediment with a predominance of sand fractions, while the interior exhibited a predominance of silt fractions. Fringe plots had C and OM content and C:P ratio twice as high as the interior plots, as well as higher pore water salinity. The content of P and N, and the N:P and C:N ratios did not differ among plots (Table 1).

All species in both plots were classified as sclerophyllous due to the low values for specific leaf area, which we used as sclerophylly index (Table 2). The most sclerophyllous species was *L. racemosa*, followed by *R. mangle* and *A. schaueriana*. Across species, *Rhizophora mangle* had higher leaf density, leaf area, and leaf dry weight. *Laguncularia racemosa* had larger leaf thickness and higher stomata density on the adaxial surface. *Avicennia schaueriana* exhibited the higher number of salt-

secreting structures per unit area on both sides of the leaves and higher stomata density on the abaxial surface (Table 2).

Table 1. Mean ratios and standard deviations of the chemical-physical aspects of the soil. Values in bold denote statistical differences among plots ($p < 0,05$).

Soil variables	Fringe	Interior	<i>f</i>	CV
P (g/kg)	0.30 ± 0.01	0.36 ± 0.15	0.571	0.31
N (g/kg)	4.21 ± 1.94	2.54 ± 0.99	2.328	0.50
C (g/kg)	119.80 ± 45.93	47.09 ± 8.16	7.284	0.59
N:P	11.97 ± 6.12	8.01 ± 1.77	1.167	0.46
C:N	24.81 ± 0.26	22.97 ± 3.77	0.706	0.11
C:P	399.32 ± 153.12	140.40 ± 43.39	7.94	0.64
OM (g/dm)	20.65 ± 7.91	8.11 ± 1.41	7.284	0.59
Clay (g/kg)	162 ± 70.71	189 ± 111.72	0.083	0.44
Silt (g/kg)	330.5 ± 95.46	513.5 ± 61.52	5.193	0.29
Sand (g/kg)	507.5 ± 166.17	297.5 ± 17324	1.531	0.46
pH	5.22 ± 0.39	5.25 ± 0.37	0.009	0.07
Pore water salinity	20.60 ± 0.29	16.87 ± 1.02	49.31	0.11

P = phosphorus, N = nitrogen, C = carbon, C:N = carbon nitrogen ratio, N:P = nitrogen phosphorus ratio, C:P = carbon phosphorus ratio, OM = organic matter, NUE = nitrogen use efficiency.

Table 2. Mean values and standard deviation of leaf morphological characteristics of the studied species.

Traits	<i>Avicennia schaueriana</i>		<i>Laguncularia racemosa</i>		<i>Rizophora mangle</i>	
	Fringe	Interior	Fringe	Interior	Fringe	Interior
SLA (cm ² .g ⁻¹)	53.56 ± 9.00	57.11 ± 6.00	38.29 ± 4.28	38.51 ± 4.92	47.23 ± 4.55	44.75 ± 3.85
LD (mg.mm ⁻³)	0.43 ± 0.12	0.39 ± 0.05	0.51 ± 0.06	0.51 ± 0.05	0.57 ± 0.06	0.53 ± 0.05
LA (cm ²)	20.39 ± 5.52	20.89 ± 4.44	23.20 ± 4.29	23.47 ± 3.77	31.89 ± 6.83	29.10 ± 6.97
LT (mm)	0.45 ± 0.04	0.44 ± 0.03	0.52 ± 0.06	0.51 ± 0.05	0.37 ± 0.03	0.42 ± 0.04
LDW (g)	0.39 ± 0.12	0.36 ± 0.09	0.61 ± 0.11	0.61 ± 0.12	0.67 ± 0.15	0.65 ± 0.14
SG-AB (n.mm ⁻²)	40.39 ± 16.35	31.35 ± 11.92	26.15 ± 5.28	25.62 ± 3.9	25.00 ± 1.01	26.78 ± 6.06
SG-AD (n.mm ⁻²)	116.00 ± 43.37	75.0 ± 23.19	33.22 ± 3.11	25.56 ± 3.76	nf	nf
SD-AB (n.mm ⁻²)	156.00 ± 44.55	166.87 ± 44.61	89.83 ± 31.20	127.00 ± 46.62	106.5 ± 32.05	109.67 ± 26.51
SD-AD (n.mm ⁻²)	nf	nf	149.16 ± 45.74	160.33 ± 64.90	nf	nf

SLA = specific leaf area. LD = leaf density. LA = leaf area. LT = leaf thickness. LDW = leaf dry weight. SG-AB = salt glands density on abaxial surface. SG-AD = salt glands density on adaxial surface. SD-AB = stomata density on abaxial surface. SD-AD = stomata density on adaxial surface. nf = not found. Values in bold denote statistical differences among plots ($p < 0,05$).

According to Two-way ANOVA, significant interaction factors were found among species, for all leaf traits, among plots for leaf density, leaf area, and leaf thickness (Table 3) and among the interaction of species and plot for all leaf traits, except leaf dry weight. These results implying that the three mangrove species responded differently to fringe and transition plots (Figure 2).

Table 3. Results of Two-way ANOVA on specific leaf area (SLA), leaf density (LD), leaf area (LA), leaf thickness (LT) and leaf dry weight (LDW) of mangrove tree species *A. schaueriana*, *L. racemosa* and *R. mangle*. *f* -values are given and significant effects are denoted as: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ probability level.

	Variation for Two-way ANOVA		
	Species (S)	Plot (P)	S x P
SLA	535,81***	0,03	17,41***
LT	424,15***	19,40***	22,06***
LD	234,09***	20,37***	4,27*
LA	237,71***	4,31*	7,68**
LDW	331,59***	1,99	1,74

Comparing the fringe and interior plots, *A. schaueriana* had lower specific leaf area in the fringe plots, whereas *R. mangle* had lower specific leaf area in the interior plots. The leaf density of *A. schaueriana* and *R. mangle* were higher in the fringe plots, and individuals of *A. schaueriana* in the fringe plots showed a greater number of salt-secreting structures per unit area of both surfaces. *Laguncularia racemosa* individuals in the fringe plots exhibit a greater density of salt-secreting structures per unit area of the adaxial surface. Individuals of *Laguncularia racemosa* in the interior plots had higher stomatal density on the abaxial surface (Table 2).

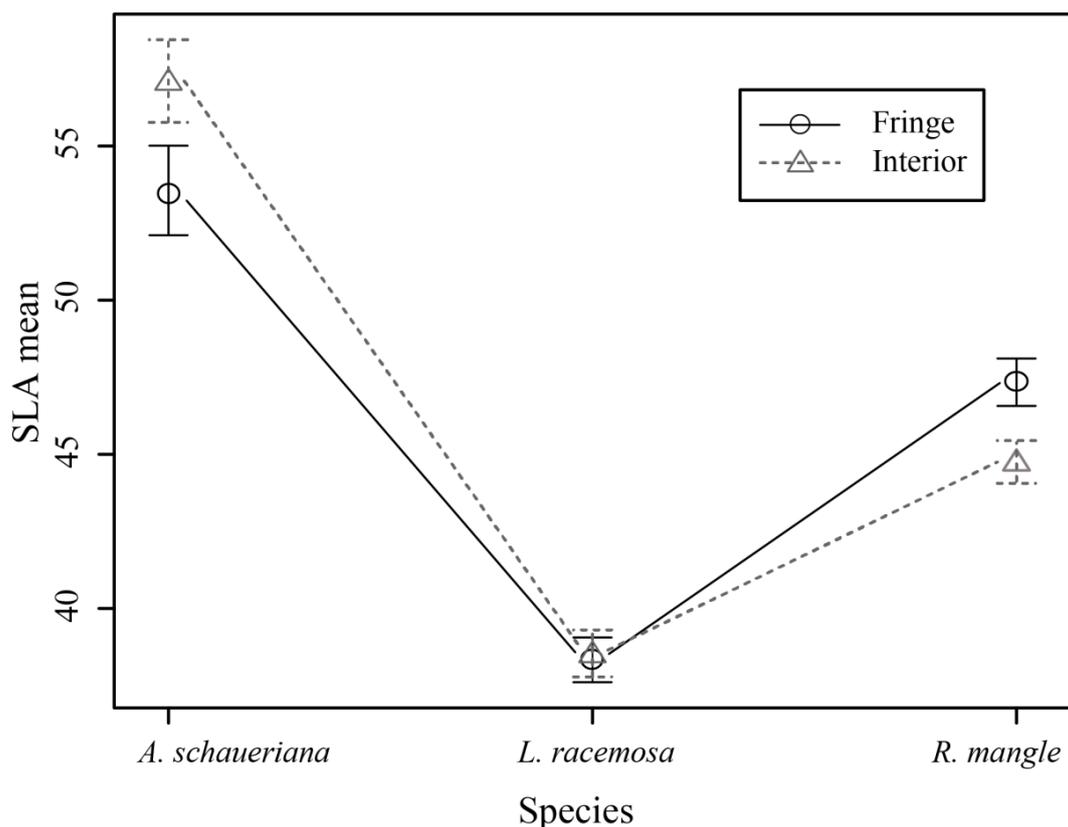


Figure 2. Average of specific leaf area and respective standard deviations of mangrove tree species (*Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* and *Rhizophora mangle*) in fringe and interior plots.

The three studied species exhibited differences in leaf nutrients (Table 4), where *A. schaueriana* had a higher content of P and N and a higher N:P ratio than *R. mangle* and *L. racemosa*. *Rhizophora mangle* had higher content of C and *L. racemosa* had higher C:N and C:P ratios and NUE than both *A. schaueriana* and *R. mangle*. The comparison of leaf nutrient content between plots, *A. schaueriana* presented higher C content and NUE in fringe plots. *Laguncularia racemosa* exhibited high levels of P and C and high N:P and C:P ratios in fringe plots, and high NUE in interior plots (Table 4).

Table 4. Mean values and standard deviations of foliar nutrient concentrations of the studied species.

Variables	<i>Avicennia schaueriana</i>		<i>Laguncularia racemosa</i>		<i>Rhizophora mangle</i>	
	Fringe	Interior	Fringe	Interior	Fringe	Interior
P (g/kg)	1.62 ± 0.14	1.61 ± 0.21	1.44 ± 0.35	1.15 ± 0.19	1.34 ± 0.14	1.39 ± 0.15
N (g/kg)	20.11 ± 1.68	21.11 ± 2.56	11.47 ± 0.75	10.98 ± 1.84	16.38 ± 1.20	15.91 ± 2.43
C (g/kg)	404.41 ± 9.95	394.33 ± 8.18	427.76 ± 7.57	441.86 ± 8.92	449.82 ± 4.53	454.97 ± 7.81
N:P	12.46 ± 1.04	13.16 ± 1.24	8.31 ± 1.56	9.55 ± 0.94	12.30 ± 0.78	11.51 ± 1.62
C:N	20.22 ± 1.70	18.94 ± 2.55	37.48 ± 3.04	41.41 ± 7.87	27.58 ± 1.98	29.22 ± 4.63
C:P	251.14 ± 21.50	248.26 ± 31.26	311.17 ± 61.89	393.73 ± 74.93	339.46 ± 33.86	331.68 ± 36.10
NUE	19 ± 0.1	16 ± 0.07	52 ± 0.2	70 ± 0.6	41 ± 0.3	42 ± 0.6

P = phosphorus, N = nitrogen, C = carbon, C:N = carbon nitrogen ratio, N:P = nitrogen phosphorus ratio, C:P = carbon phosphorus ratio, NUE = nitrogen use efficiency. Values in bold denote statistical differences among plots ($p < 0,05$).

The dbRDA based on model selection indicated that biological and environmental drivers shaped the leaf morphology of mangrove tree species in the studied mangroves (ANOVA, $F = 43.97$, $p = 0.001$, Figure 3). The first two constrained principal coordinates (dbRDA) were significant and explained 95% of the variance in leaf morphology. The dbRDA 1 explained 67% of the variance in leaf morphology and was related to leaf area (score 2.65) and specific leaf area (-score -1.88), while dbRDA 2 explained 30% of the variance and was related to leaf thickness (score 1.65) and leaf dry mass (score 1.80). Post-hoc tests also showed that the intrinsic variation among species (ANOVA, $F = 101.60$, $p < 0.0001$), along with P soil content (ANOVA, $F = 9.24$, $p < 0.0001$) and OM soil content (ANOVA, $F = 4.09$, $p < 0.001$), were the most significant factors affecting leaf morphology of mangrove tree species.

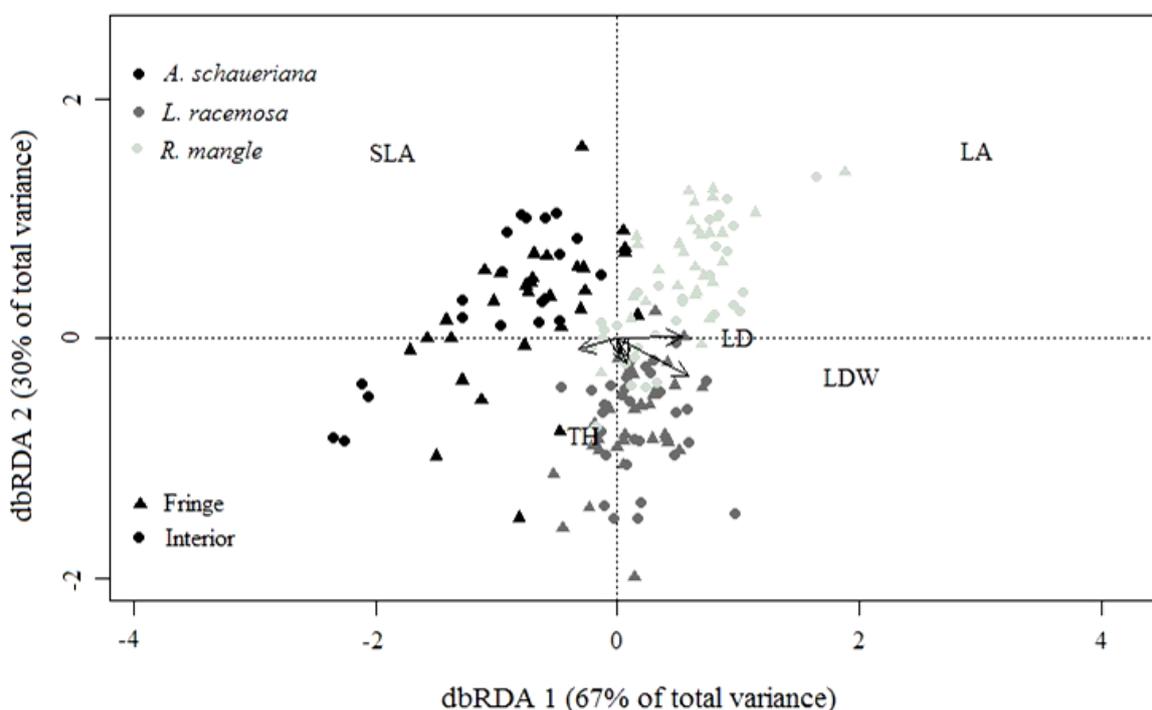


Figure 3. Biplot of the Distance-based Redundancy Analyses (dbRDA) showing the main environmental variables on the leaf morphology in *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* and *Rhizophora mangle*. SLA = specific leaf area, LA = leaf area, LD = leaf density, LDW = leaf dry weight, TH = leaf thickness.

2.6 DISCUSSION

The studied mangroves reflect an oligotrophic condition due to the low contents of N and P in the soil (Meziane & Shipley, 1999; Read & Sanson, 2003). Even though the soil content of P and N were similar to those reported previously for mangroves in Paraná (Madi et al., 2016a), and other Brazilian regions (Cuzzuol & Campos, 2001; Bernini et al., 2006). The contents of these nutrients are considered low and limiting in mangroves (Reich & Oleksyn, 2004; Lovelock et al., 2005; Lovelock et al., 2007). This oligotrophic condition was also confirmed by the N:P ratio in the interior and fringe plots, indicating that fringe and interior trees are especially limited by N (Koerselman & Meuleman, 1996).

Limitation in N and P was listed as one of the conditions that can induce sclerophylly in forests (Read & Season, 2003). Other condition that can induce sclerophylly was the high content of OM and C, and the high salinity observed in the fringe plots. This condition could increase the hardness of the leaves where the excess of carbon is converted into lignin in structural tissues (Wilson et al., 1999). Sclerophylly can also be linked to habitats with higher salinity (Reef et al., 2010), because the excess salt hinders the water absorption from the soil. For this reason, mangrove plants present characteristics of terrestrial xerophytes (Parida & Jha, 2010).

Specific leaf area reflects the influence of environmental conditions on the allocation of resources in plants (Read & Sanson, 2003). Leaves that exhibit high values of specific leaf area are more productive because they invested more in photosynthetic tissues (Vogelmann et al., 1996). On the other hand, leaves with low values of specific leaf area are less productive, although they have greater resistance to scarcity of resources in the soil. Individuals of *A. schaueriana* and *R. mangle* exhibited differences in the degree of sclerophylly among plots with significant differences in the sclerophylly index. However, leaf traits such as leaf area, leaf dry weight and leaf thickness showed no significant differences among plots. We had expected to find differences in these leaf traits because they are related with specific leaf area (Sclerophylly index). Therefore, the evaluation of sclerophylly in plants cannot be based just on indexes, but also must consider the foliar morphology and

nutrient content such as leaf thickness, presence of sub-epidermal layer, N and P contents (Sereneski-Lima et al., 2013).

The leaf nutrient contents found in this study are similar to those reported for subtropical mangroves (Sereneski-Lima et al., 2013; Madi et al., 2015) and other Brazilian mangroves (Cuzzuol & Campos, 2001; Bernini et al., 2006). The different patterns of leaf nutrient content among species are related to different strategies for the accumulation and utilization of nutrients. Despite being subjected to the same nutrient availability, the studied species have distinctively efficient methods of absorption (Madi et al., 2015).

The availability of nutrients, specifically N and P, can influence plant efficiency by altering the synthesis of enzymes for several photosynthetic processes (Krauss et al., 2008). However, this effect cannot be disconnected from salinity and fresh water balance under natural conditions (Medina et al., 2015). Salinity tolerance also embodies physiological and morphological traits (Lovelock & Ball, 2002) such as in *A. schaueriana*. The high N content in the leaves of *A. schaueriana* is probably the result of the accumulation of glycine betaine, a nitrogenized compound that works as a compatible solute in leaves of species of *Avicennia* and functions as a salt tolerance mechanism (Medina & Francisco, 1997; Soares et al., 2015).

Even with little variation in specific leaf area among individuals of *A. schaueriana* in fringe and interior plots, the greater sclerophylly observed in the fringe is probably related to the high tolerance and distinct physiological mechanisms of this species. Fringe regions seem to be directly impacted by tides, even of low amplitude, which may explain the higher salinity observed there (Feller et al., 2010). Many plant species respond to adverse environmental conditions, such as salinity, by increasing sclerophylly (Barcelar et al., 2004; Bussoti et al., 2002; Nevo et al., 2000). In a mangrove in Espirito Santo, Brazil, individuals of *A. schaueriana* showed a positive correlation with salinity, as revealed by dry mass per leaf area (LMA) (Arrivabene et al., 2014).

The sclerophylly index in *L. racemosa* was similar between fringe and interior plots. It is possible that the higher degree of sclerophylly found in *L. racemosa* is related to their adaptability to different abiotic conditions. Despite *L. racemosa* having the lowest N content, it had the highest NUE among the three

species. The NUE values indicate the degree of efficiency in obtaining N by plants (Alongi et al., 2005); as leaf nutrients decrease, the mechanism used to store this nutrient becomes more efficient, which may explain the low nitrogen content yet high NUE in *L. racemosa* (Feller et al., 1999).

Individuals of *Rhizophora mangle* located in the interior plots appeared as dwarf formations with short trees (~2 m), and twisted sclerophyllous leaves (Feller, 1995). It is probable that the higher degree of sclerophylly observed in the individuals of *R. mangle* in the interior plots was a consequence of environmental conditions. Dwarf formations are usually associated with low tidal variation, high evaporation and high elevation (Lovelock et al., 2006b; Naidoo, 2010), characteristics frequently observed in interior mangroves. The denser leaves found on the fringe can be linked to the high content of C, which may lead to an increase in structural tissues and the hardness of the leaves (Wilson et al., 1999).

The Distance Based Redundancy Analysis and Two-way ANOVA revealed that despite the similar environmental conditions that mangrove trees are submitted in fringe and interior plots, these species showed distinct morphological and physiological mechanisms to deal with the adverse conditions of either type of mangrove plot. Therefore, there isn't a single pattern for all plants located in fringe and interior plots, but a specific pattern for each species in each mangrove condition. Nevertheless, the intrinsic features of each species are apparently prevalent when compared to the environmental variables. Arrivabene et al. (2014) found that individuals of *A. schaueriana* could be considered appropriate bioindicators because they can indicate changes in environmental conditions. *Avicennia schaueriana* showed variation in dry mass per leaf area (LMA) that was positively correlated with salinity, manganese content and pH, and negatively correlated with phosphorus content.

Besides differences in leaf morphology and physiological strategies, the evaluated species exhibited another intrinsic species-specific pattern: distribution and zonation. In the same mangrove areas, Madi et al. (2016b) observed that *R. mangle* and *L. racemosa* tend to occupy plots with low salinity, whereas *A. schaueriana* exhibited a tendency to occupy plots with higher salinity.

Despite the different environmental conditions observed between fringe and transition plots the intrinsic factor of each species was determinant in the leaf morphological traits and sclerophylly observed. We could not establish a single pattern for the species in each plot, once each species responds differently to similar environmental conditions and exhibit distinct morphological, structural and physiological strategies.

2.7 ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for granted a scholarship to the first author and CNPq for providing fellowship to M.R.T.B. (301971/2013-7). We also would like to thank Carlos Bruno Reissmann for his assistance on the leaf and soil analysis and Sionara Eliasaro for Spanish version of the abstract. We thank anonymous reviewer's comments that improve the manuscript.

2.8 REFERENCES

- Alongi, D. M., Boto, K. G., & Robertson, A. I. (1992). Tropical mangroves ecosystems. Washington D.C.: American Geophysical Union.
- Alongi, D. M., Clough, B. F., & Robertson, A. I. (2005). Nutrient-use efficiency in arid-zone forests of the mangroves *Rhizophora stylosa* and *Avicennia marina*. *Aquatic Botany*, 82, 121-131.
- Arrivabene, H. P., Souza, I., C3, W. L. O., Rodella, R. A., Wunderlin, D. A., & Milanez, C. R. (2014). Functional traits of selected mangrove species in Brazil as biological indicators of different environmental conditions. *Science of The Environment*, 476, 496-504.
- Bacelar, E. A., Correia, M. C., Moutinho-Pereira, J. M., Gonçalves, B. C., Lopes, J. I., & Torres-Pereira, J. M. G. (2004). Sclerophylly and leaf anatomical traits of five field-grown olive cultivars growing under drought conditions. *Tree Physiology*, 24, 233-239.
- Ball, M. C. (2002). Interactive effects of salinity and irradiance on growth: implications for mangrove forest structure along salinity gradients. *Trees*, 16, 126-139.

- Bernini, E., Silva, M. A. B., Carmo, T. M., & Cuzzuol, G. R. (2006). Composição química do sedimento e de folhas das espécies do manguezal do estuário do Rio São Mateus, Espírito Santo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 26(4), 689-699.
- Boeger, M. R. T., & Wisniewski, C. (2003). Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estágios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 26, 61-72.
- Bussoti, F., Bettini, D., Grossoni, P., Mansuino, S., Nibbi, R. Soda, C., & Tani, C. (2002). Structural and functional traits of *Quercus ilex* in response to water availability. *Environmental & Experimental Botany*, 47, 11-23.
- Camargo, O. A., Moniz, A. C., Jorge, J. A., & Valadares, J. M. A. S. (2009). Métodos de análise química, mineralógica e física de solo do Instituto Agrônomo de Campinas. Boletim Técnico do Instituto Agrônomo de Campinas, São Paulo: Instituto Agrônomo de Campinas.
- Choong, M. F., Lucas, P. W., Ong, J. S. Y., Pereira, B., Tan, H. T. W., & Turner, I.M. (1992). Leaf fracture toughness and sclerophylly: their correlations and ecological implications. *New Phytologist*, 121, 597-610.
- Cintron, G., Lugo, A. E., Pool, D. J., & Morris, G. (1978). Mangroves of arid environments in Puerto Rico and adjacent islands. *Biotropica*, 10, 110-121.
- Cuzzuol, G. R. F., & Campos, A. (2001). Aspectos nutricionais na vegetação de manguezal do estuário do Rio Mucuri, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 24, 227-234.
- Edwards, C., Read, J., & Sanson, G. (2000). Characterizing sclerophylly: some mechanical properties of leaves from heath and forest. *Oecologia*, 123, 158-167.
- Estrada, G. C. D., Soares, M. L. G., Chaves, F. O., & Cavalcanti, V. F. (2013). Analysis of the structural variability of mangrove forests through the physiographic types approach. *Aquatic Botany*, 111, 135-143.
- Feller, I. C. (1995). Effects of nutrient enrichment on growth and herbivory of dwarf red mangrove (*Rhizophora mangle*). *Ecological Monographs*, 65, 477-505.
- Feller, I. C. (1996). Effects of nutrient enrichment on leaf anatomy of dwarf *Rhizophora mangle* L. (red mangrove). *Biotropica*, 28, 13-22.

- Feller, I. C., Lovelock, C. E., Berger, U., McKee, K. L., Joye, S. B., & Ball, M. C. (2010). Biocomplexity in mangrove ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, 2, 395-417.
- Feller, I. C., Whigham, D. F., O'Neill, J. P., & McKee, K. L. (1999). Effects of nutrient enrichment on within-stand cycling in a mangrove forest. *Ecology*, 80(7), 2193-2205.
- Hanley, M. E., Lamont, B. B., Fairbanks, M. M., & Rafferty, C.M. (2007). Plant structural traits and their role in anti-herbivore defense. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution & Systematics*, 8, 157-178.
- Hogarth, P. J. (1999). The biology of mangroves. New York: Oxford University Press Inc.
- Jimenez, J. A., & Sauter, K. (1991). Structure and dynamics of mangrove forests along a flooding gradient. *Estuaries*, 14, 49-56.
- Koerselman, W., & Meuleman, A. F. M. (1996). The vegetation N:P ratio: a new tool to detect the nature of nutrient limitation. *Journal of Applied Ecology*, 33, 1441-1450.
- Krauss, K. W., Lovelock, C. E., McKee, K.L., López-Hoffman, L., Ewe, S. M. L., & Sousa, W. P. (2008). Environmental drivers in mangrove establishment and early development: A review. *Aquatic Botany*, 89, 105-127.
- Legendre, P., & Anderson, M. J. (1999). Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs*, 69, 1-24.
- Loveless, A. R. (1962). Further evidences to support a nutritional interpretation of sclerophylly. *Annals of Botany*, 26, 549-561.
- Lovelock, C. E. & Feller, I. C. (2003). Photosynthetic performance and resource utilization of two mangrove species coexisting in a hypersaline scrub forest. *Oecologia*, 134, 455-462.
- Lovelock, C. E., Feller, I. C., McKee, K. L., & Thompson, R. (2005). Variation in Mangrove Forest Structure and Sediment Characteristics in Bocas del Toro Panama. *Caribbean Journal of Science*, 41(3), 456-464.
- Lovelock, C. E., & Ball, M. C. (2002). Influence of salinity on photosynthesis of halophytes. In A. Lauchli, & U. Luttge (Eds.), *Salinity: Environment - Plants - Molecules* (p. 315–339). New York: Kluwer Academic Publishers.

- Lovelock, C. E., Ball, M. C., Choat, B., Engelbrecht, B. M. J., Holbrook, N. M., & Feller, I.C. (2006b). Linking physiological processes with mangrove forest structure: phosphorus deficiency limits canopy development, hydraulic conductivity and photosynthetic carbon gain in dwarf *Rhizophora mangle*. *Plant, Cell & Environment*, 29, 793-802.
- Lovelock, C. E., Feller, I. C., Ball, M. C, Engelbrecht, B. M. J., & Ewe, M. L. (2006a). Differences in plant function in phosphorus and nitrogen limited mangrove ecosystems. *New Phytologist*, 172, 514-52.
- Lovelock, C. E., Feller, I. C., Ellis, J., Schwarz, A. M., Hancock, N., Nichols, P. & Sorrell, B. (2007). Mangrove growth in New Zealand estuaries: the role of nutrient enrichment at sites with contrasting rates of sedimentation. *Oecologia*, 153, 633-641.
- Lugo, A. E., & Snedaker, S. C. (1974). The ecology of mangroves. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5, 39-64.
- Madi, A. P. L. M., Boeger, M. R. T., & Reissmann, C. B. (2015). Composição química do solo e das folhas e eficiência do uso de nutrientes por espécies de manguezal. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 19(5), 433-438.
- Madi, A. P. L. M., Boeger, M. R. T., Carvalho, L. L., Pelozo, A., Sereneski-Lima, C., Reissmann, C. B., & Padial, A. A. (2016b). Estrutura do componente de regeneração natural e arbóreo de dois manguezais no estado do Paraná. *Ciência Florestal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Impresso*, 26, 159-170.
- Madi, A. P. L. M., Boeger, M. R. T., Reissmann, C. B., & Martins. K.G. (2016a). Soil-plant nutrient interactions in two mangrove areas at southern Brazil. *Acta Biológica Colombiana*, 21, 39-50.
- Martins, A. P. L. M., & Reissmann, C. B. (2007). Laboratory routine for chemical and analytical procedures on plant tissues. *Scientia Agraria*, 8(1), 1-17.
- Medina, E., & Francisco, M. (1997). Osmolality & $\delta^{13}\text{C}$ of leaf tissues of mangrove species from environments of contrasting rainfall and salinity. *Estuarine, Coastal & Shelf Science*, 45(3), 337-344.
- Medina, E., Fernandez, W., & Barboza S. (2015). Element uptake, accumulation, and resorption in leaves of mangrove species with different mechanisms of salt regulation. *Web Ecology*, 15, 3-13.

- Meziane, D., & Shipley, B. (1999). Plasticity in relative growth rate and its components following a change in irradiance. *Plant, Cell & Environment*, *22*, 447-459.
- Mitra, A. (2013). Sensitivity of Mangrove Ecosystem to Changing Climate. India: Springer.
- Naidoo, G. (2010). Ecophysiological differences between fringe and dwarf *Avicennia marina* mangroves. *Trees*, *24*, 667-673.
- Nevo, E., Bolshakova, M. A., Martyn, G. I., Musatenko, L. I., Sytnik, K., Pavlíček, T., & Beharav, A. (2000). Drought and light anatomical adaptive leaf strategies in three woody species caused by microclimatic selection at "Evolution Canyon," Israel. *Israel Journal of Plant Science*, *48*, 33-46.
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., & O'Hara, R. B. (2006). Vegan: Community Ecology Package. R package version 1.8-3. Retrieved on February 2nd, 2015. From: <http://CRAN.R-project.org/>.
- Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, *60*, 324-349.
- Parida, A. K., & Jha, B. (2010). Salt tolerance mechanisms in mangroves: a review. *Trees*, *24*, 199-217.
- R Development Core Team. (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Retrieved on February 2nd, 2015. From: <http://www.R-project.org/>.
- Raij, B. V., Andrade, J. C., Cantarella, H., & Quaggio, J. A. (2001). Análise química do solo para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Boletim do Instituto Agrônomo de Campinas, São Paulo: Instituto Agrônomo de Campinas.
- Read, J., & Sanson, G. D. (2003). Characterizing sclerophylly: the mechanical properties of a diverse range of leaf types. *The Phytologist*, *160*, 81-99.
- Read, J., Sanson, G. D., Garine-Wichatitsky, M., & Jaffré, T. (2006). Sclerophylly in two contrasting tropical environments: low nutrients vs. low rainfall. *American Journal of Botany*, *93*, 1601-1604.
- Reich, P. B., & Oleksyn J. (2004). Global patterns of plant leaf N and P in relation to temperature and latitude, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*, 11001-11006.
- Reef, R., Feller, I. C., & Lovelock, C. E. (2010). Nutrition of mangroves. *Tree Physiology*, *30*, 1148-1160.

- Sandrini-Neto, L. & Camargo, M. G. (2012). GAD: An R package for ANOVA designs from general principles. R package version 1.1.1. Retrieved on September 8th, 2014. From: <http://cran.r-project.org/package=GAD>.
- Schaeffer-Novelli, Y., Cintrón-Molero, G., Soares, M. L. G. & De-Rosa, T. (2000). Brazilian mangroves. *Aquatic Ecosystem Health Management*, 3, 561-570.
- Schimper, A. F. W. (1903). Plant-geography upon a physiological basis. Oxford, United Kingdom: Clarendon Press.
- Sereneski-Lima, C., Boeger, M. R. T., Carvalho, L. L., Pelozo, A. & Soffiatti, P. (2013). Sclerophylly in mangrove tree species from South Brazil. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, 1159-1166.
- Simepar - Sistema Meteorológico do Paraná/Brasil. (2016). Paraná: Brasil. Retrieved on October 22th, 2016. From: <http://www.simepar.br/>.
- Soares, M. L. G., Tognella, M. M. P., Cuevas, E., & Medina, E. (2015). Photosynthetic capacity and intrinsic water-use efficiency of *Rhizophora mangle* at its southernmost western Atlantic range. *Photosynthetica*, 53, 464-470.
- Sobrado, M. A. (2005). Leaf characteristics and gas exchange of the mangrove *Laguncularia racemosa* as affected by salinity. *Photosynthetica*, 43(2), 217-221.
- Spalding, M., Kainuma, M., & L. Collins. (2010). World Atlas of Mangroves. London/Washington: Earthscan.
- Thom, B. (1967). Mangrove ecology and deltaic morphology: Tabasco, Mexico. *Journal of Ecology*, 55, 301-343.
- Twilley, R. R., Rivera-Monroy, V. H., Chen, R. & Botero, L. (1998). Adapting an ecological mangrove model to simulate trajectories in restoration ecology. *Marine Pollution Bulletin*, 37, 404-419.
- Vogelmann, T.C., Nishio, J.N., & Smith, W.K. (1996). Leaves and light capture: light propagation and gradients of carbon fixation within leaves. *Trends in Plant Science*, 1, 65-70.
- Wang, L., Mu, M., Li, X., Ling, P., & Wang, W. (2010). Differentiation between true mangroves and mangrove associates based on leaf traits and salt contents. *Journal of Plant Ecology*, 4(4), 292-301.
- Wilson, P., Thompson, K., & Hodgson, J. (1999). Specific leaf area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *New Phytologist*, 143, 155-162.

3 CAPÍTULO II

**Adaptação ou *ecological fitting*? Compreendendo a origem de atributos
chave em linhagens de árvores de manguezais**

*Adaptation or ecological fitting? Understanding the evolution of key traits in
tree lineages of mangroves*

Carolina Sereneski-Lima^{a,*}, Maria Regina Torres Boeger^a & Walter A. Boeger^a

^aUniversidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Caixa Postal 19031, 81531-990 Curitiba, PR, Brasil.

* Corresponding author: Carolina Sereneski de Lima. sereneskilima@gmail.com. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Rua Francisco H. dos Santos s/n, Jardim das Américas, CEP 81531-980, CP 19073, Curitiba, Paraná, Brazil. +55 41 33611765.

3.1 RESUMO. As plantas de manguezais compreendem um grupo heterogêneo de linhagens filogeneticamente distintas. Para a sobrevivência em um habitat ecologicamente extremo as espécies necessitam de atributos que as permitam sobreviver sob essas condições. O objetivo do estudo foi investigar a origem de caracteres chave em linhagens de árvores de manguezais, considerados originalmente como adaptativos (representantes de Acanthaceae, Combretaceae e Rhizophoraceae), utilizando o protocolo de reconstrução de caracteres ancestrais sobre filogenias conhecidas. Essas reconstruções oferecem subsídios para a avaliação da importância de características adaptativas (resposta à pressão seletiva local) ou de processos de *ecological fitting* (atributos que já estavam presentes nas linhagens no momento em que ocorreu o encontro com os manguezais). A reconstrução de caracteres ancestrais indicou que as raízes aéreas e a viviparidade nas famílias Acanthaceae e Combretaceae representam atributos adaptativos. Adicionalmente, a presença de folhas anfiestomáticas em Combretaceae também representam adaptações putativas. Contudo, a presença de raízes aéreas é um atributo que precede a colonização dos manguezais em espécies de Rhizophoraceae. Para as glândulas de sal em Acanthaceae e Combretaceae foram encontrados indícios de exaptação, e para o porte arbóreo em Acanthaceae evidência de plasticidade fenotípica. A presença de atributos importantes para colonização das espécies de manguezais ocorreu por um mosaico de processos evolutivos, representados por adaptação e processos de *ecological fitting*.

Palavras-chave: filogenia, exaptação, conservatismo filogenético, plasticidade fenotípica.

3.2 ABSTRACT. The mangrove plants compound a heterogeneous group of phylogenetically distinct lineages. For the survival in a harsh ecological niche species have to developed traits considered adaptive. The aim of the study was to investigate the origin of key traits in mangrove tree lineages, originally considered as adaptive to the ecosystem (representatives of Acanthaceae, Combretaceae and Rhizophoraceae families) using the protocol of reconstruction of ancestral characters on known phylogenies. These reconstructions provide subsidies for the evaluation of the relative importance of adaptive traits (response to local selective pressure) or ecological fitting processes (traits that were already present in the lineages at the

time of the encounter with mangroves). The reconstruction of ancestral characters indicated that the aerial roots and viviparity in the Acanthaceae and Combretaceae represent adaptive trait. In addition, the presence of amphistomatic leaves in Combretaceae is another adaptive trait. However, the presence of aerial roots is a trait that precedes the colonization of mangroves in Rhizophoraceae species. Were found evidence of exaptation for the presence of salt glands in Acanthaceae and Combretaceae species. The presence of key traits in tree mangrove species occurred through a mosaic of evolutionary processes, represented by adaptation and ecological fitting processes.

Key-words: phylogeny, exaptation, phylogenetic conservatism, phenotypic plasticity.

3.3 INTRODUÇÃO

As florestas de manguezais se distribuem ao longo das zonas intertidais na interface entre o ambiente terrestre e marinho (Giri et al., 2010; Spalding et al., 2010). O ambiente físico dos manguezais é considerado limitante e caracterizado pela inundação regular das marés, que proporciona variações na salinidade, na consolidação do solo e teor de oxigênio (Alongi, 2009; Parida and Jha, 2010). Esse estresse ambiental é apontado como fator crucial no desenvolvimento e estabelecimento das comunidades de plantas (Alongi, 2009; Kathiresan and Bingham, 2001).

As plantas de manguezais compreendem um grupo heterogêneo de linhagens filogeneticamente independentes (Duke, 1992; Ellison et al., 1999; Schwarzbach and Ricklefs, 2000). A diversidade de espécies é relativamente baixa quando comparada com outras florestas tropicais. Mundialmente, existem cerca de 68 espécies arbóreas de manguezais distribuídas em 20 gêneros e 16 famílias (Spalding et al., 2010). Acanthaceae, Combretaceae e Rhizophoraceae estão entre as famílias mais representativas neste ecossistema (Spalding et al. 2010). Apesar da baixa diversidade, as espécies arbóreas de manguezais são altamente especializadas às condições desse ambiente, compartilhando distintos mecanismos morfológicos, fisiológicos e reprodutivos (Dodd and Rafii, 2002; Kathiresan and Bingham, 2001; Spalding et al., 2010).

De acordo com diversos autores, o desenvolvimento nesse ecossistema depende de atributos considerados adaptativos, decorrentes da elevada pressão seletiva do ambiente (Alongi, 2009; Duke, 1992; Hogarth, 1999; Kathiresan and Bingham, 2001; MacNae, 1968; Mori et al., 2015; Popp et al., 1993; Tomlinson, 1986; Yossef and Saenger, 1996). Entre os atributos considerados mais importantes para o estabelecimento nos manguezais estão as raízes aéreas, a viviparidade e mecanismos de eliminação de sal (Arrivabene et al., 2014; Shi et al., 2005; Wang et al., 2010). Apesar da grande informação disponível sobre atributos morfológicos, fisiológicos e ecológicos das espécies arbóreas de manguezais (eg., Arrivabene et al., 2014; Duke, 1992; Ellison, 2012; Feller et al., 1999; Jagtap and Nagle, 2007; Juncosa and Tomlinson, 1988; Madi et al., 2016; Medina et al., 2015; Naidoo, 2010; Parida and Jha, 2010), ainda não está totalmente esclarecido se os atributos relevantes para o desenvolvimento neste ambiente são, na sua totalidade, adaptativos.

O conceito de adaptação está intimamente relacionado com o ajuste funcional (*fit*) de atributos de um organismo sobre uma pressão seletiva específica (Brooks and McLennan, 1991). Adaptações são, portanto, novidades evolutivas geradas por mutações, que podem ser associadas diretamente à mudança de ambiente (Brooks and McLennan, 1991), nesse caso, à colonização dos manguezais. Entretanto, o ajuste funcional pode também ocorrer por outro processo, denominado *ecological fitting* (Janzen, 1985). Neste processo, os organismos possuem a capacidade de colonizar e persistir em novos ambientes, utilizar novos recursos, ou até mesmo de estabelecer novas interações com outras espécies, sendo resultado de características presentes na sua linhagem ancestral, no momento em que são expostos a uma nova condição ou recurso (Agosta and Klements, 2008).

Estudos prévios como o de Shi et al. (2005) revelaram que a viviparidade e a eliminação de sais apresentam origem evolutiva múltipla e independente em manguezais. Enquanto que, Sahu et al. (2016) encontraram o mesmo para pneumatóforos e exudação de sais. Sahu et al. (2016) postularam ainda que as raízes aéreas e viviparidade podem representar casos de evolução por exaptação, um dos mecanismos do processo de *ecological fitting*. A exaptação é um processo onde um atributo previamente moldado pela seleção natural para uma determinada finalidade é utilizado para uma nova função (Barve and Wagner, 2013; Gould and

Vrba, 1982). Apesar de informações sobre a origem evolutiva de atributos serem conhecidas, a relação destes com as condições ambientais e formações florestais ainda não foram totalmente explorados. Avaliar a putatividade das oportunidades das espécies em colonizar novos ambientes, através características herdadas pela linhagem ancestral, são importantes para esclarecer se essas características pré-existentes nas linhagens arbóreas de manguezais permitiram a mudança do ambiente ancestral. Dessa forma, permitindo que a seleção natural pudesse favorecer características, novas ou pré-existentes, que conferem maior ajuste funcional às condições ambientais. Esses são os atributos conhecidos por permitir o *ecological fit* às novas condições. Assim, o estudo teve como objetivo investigar a origem filogenética dos atributos considerados importantes para o desenvolvimento das espécies de três famílias representativas de manguezais. Para isso, utilizou-se a abordagem de reconstrução de caracteres ancestrais, para definir se tais atributos tem origem no processo adaptativo (origem simultânea ou subsequente à colonização) ou se existem atributos decorrentes por processos de *ecological fitting* (características pré-existentes nas linhagens arbóreas).

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas três famílias de espécies arbóreas de manguezais: Acanthaceae, Combretaceae e Rhizophoraceae, as quais estão entre as mais representativas nos manguezais, devido ao número de espécies que ocorrem nesse ambiente. Foram obtidas, por família, árvores filogenéticas conhecidas mais recentes e disponíveis na literatura (Tab. 01). De cada família, uma ou mais espécies por gênero foram selecionadas. O critério de seleção da espécie/gênero coincidiram com a disponibilidade de informações referentes aos atributos (Acanthaceae: dez gêneros e 14 espécies, sendo cinco representantes de manguezais; Combretaceae: oito gêneros e nove espécies, sendo quatro representantes de manguezais; Rhizophoraceae: dez gêneros e 11 espécies, sendo cinco representantes de manguezais, Tab. 01).

Com o objetivo de realizar a reconstrução de caracteres ancestrais, de cada espécie, foram escolhidos atributos hipoteticamente importantes para a colonização,

sobrevivência e desenvolvimento nos manguezais (eg. tipo de raiz, mecanismo de eliminação de sal, viviparidade). Além de outros atributos como forma da folha, posição do estômato, mecanismo de dispersão e forma de vida. Além dos atributos morfológicos/fisiológicos, informações relacionadas ao ambiente que cada espécie se desenvolve foram também obtidas (tipo de formação florestal, clima, presença de inundação, salinidade e textura do solo). A história das características morfológicas/fisiológicas e ecológicas das famílias estudadas foram reconstruídas sobre as respectivas filogenias utilizando-se o módulo de Parsimony Ancestral Character Reconstruction do software Mesquite 3.11(Maddison and Maddison, 2016).

O método de teste das hipóteses, quando há evidência de adaptação ou de processos de *ecological fitting*, foi relacionado à interpretação e comparação das árvores de reconstrução de caracteres e de fatores ambientais, sendo, (1) Adaptação: presença exclusiva do atributo na linhagem de espécies de manguezais, juntamente ou posteriormente a mudança de ambiente. Neste cenário há a evidência de adaptação relacionada à pressão seletiva; (2) *Ecological fitting*: presença do atributo, tanto nas linhagens de manguezais, quanto nas espécies filogeneticamente próximas, não necessariamente relacionadas ao fator ambiental ou mudança de ambiente. Neste caso, a presença de determinado atributo ocorre também na sua linhagem ancestral.

Suporte adicional para testar a correlação entre características adaptativas putativas (raiz aérea, forma de vida, viviparidade, eliminação de sal e posição de estômato) foi realizado através do teste de correlação evolutiva de caracteres (Pagel, 1994) pelo software Mesquite 3.11(Maddison and Maddison, 2016). O método de análise de correlação evolutiva tem a capacidade de analisar a relação entre dois caracteres, mensurados em filogenias, através de estimativa de transições simultâneas em pares de caracteres. O método de Pagel (1994) utiliza o Modelo de Markov para caracterizar mudanças evolutivas ao longo de cada nó da árvore filogenética. O modelo tem como objetivo inferir os possíveis caminhos evolutivos que se mantiveram ao longo da história das espécies e que deu origem aos dados atuais observados. A partir da análise de *log Likelihood* (LR), os valores *log L(D)* com $p < 0.05$ indicam evolução dependente, já os valores *log L(I)* com $p < 0.05$ indicam evolução independente de caracteres.

Tabela 1 – Lista de espécies e filogenias utilizadas para o protocolo de reconstrução de caracter ancestral.

Família	Espécie	Filogenia
Acanthaceae	<i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f.) Nees	Li et al. (2016), Tripp and
	<i>Anisacanthus quadrifidus</i> (Vahl) Nees	McDade (2014) and,
	<i>Avicennia alba</i> Blume*	McDade (2008).
	<i>Avicennia bicolor</i> Standl.*	
	<i>Avicennia germinans</i> (L.) L.*	
	<i>Avicennia marina</i> (Forssk.) Vierh.*	
	<i>Avicennia schaueriana</i> Stapf & Leechm. ex Moldenke*	
	<i>Barleria cristata</i> L.	
	<i>Chlamydacanthus lindavianus</i> H.J.P.Winkl.	
	<i>Crossandra infundibuliformis</i> (L.) Nees	
	<i>Nelsonia canescens</i> (Lam.) Spreng.	
	<i>Neuracanthus africanus</i> S. Moore	
	<i>Ruellia simplex</i> C.Wright	
	<i>Thunbergia erecta</i> (Benth.) T.Anderson	
	Combretaceae	<i>Buchenavia tomentosa</i> Eichler
<i>Conocarpus erectus</i> L.**		Tan et al. (2012).
<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel.		
<i>Laguncularia racemosa</i> (L.) C.F.Gaertn.*		
<i>Lumnitzera racemosa</i> Willd.*		
<i>Lumnitzera littorea</i> (Jack) Voigt*		
<i>Macropteranthes leiocaulis</i> P.I.Forst.		
<i>Strephonema mannii</i> Hook.f.		
<i>Terminalia catappa</i> L.		
Rhizophoraceae	<i>Rhizophora mangle</i> L.*	Lo et al. (2014), Shi et al.
	<i>Rhizophora stylosa</i> Griff.*	(2002) and, Schwarzbach
	<i>Kandelia candel</i> (L.) Druce*	and Ricklefs (2000).
	<i>Ceriops tagal</i> (Perr.) C.B.Rob.*	
	<i>Bruguiera parviflora</i> (Roxb.) Wight & Arn. ex Griff.*	
	<i>Pellacalyx axillaris</i> Korth.	
	<i>Gynotroches axillaris</i> Blume	
	<i>Crossostylis biflora</i> J.R.Forst. & G.Forst.	
	<i>Carallia brachiata</i> (Lour.) Merr.	
	<i>Cassipourea malosana</i> (Baker) Alston	
<i>Sterigmapetalum obovatum</i> Kuhlms.		

(*) Indica espécies exclusivas de manguezais. (**) Indica espécies associadas aos manguezais.

3.5 RESULTADOS

Acanthaceae

Acanthaceae possui cerca de 3.000 espécies e pertence à ordem Lamiales, que apresenta alta diversidade de morfologia e habitats. De acordo com a reconstrução, a condição ambiental do 1da floresta do ancestral comum hipotético a todos os táxons da família foi clima quente, úmido (Fig. 1a), em solo consolidado (Fig. 1b) e com inundação por água doce (Fig.1c). O grupo monofilético das espécies de manguezais ocorre exclusivamente em ambiente com inundação por água salobra, a partir do ancestral que putativamente habitava ambientes inundáveis por água doce (Fig. 1c).

O ancestral comum hipotético a todos os membros da família teve origem em formações vegetais tropicais, de estepes e planícies de inundação (Fig. 1c). Posteriormente, houve irradiação para as mais diferentes formações vegetais. As cinco espécies do gênero *Avicennia* compõem o grupo monofilético exclusivo de manguezais. As espécies próximas aos táxons de manguezais habitam diversas formações vegetais, tais como *Crossandra infundibuliformis* – que habita exclusivamente floresta tropical, *Ruellia simplex* e *Anisacanthus quadrifidus* – que mantiveram o hábitat ancestral da família e *Anisacanthus quadrifidus* – que passou a habitar savanas (Fig 1c).

Folhas simples, com margem inteira, filotaxia oposta e de raiz do tipo axial representam simplesiomorfias na família. Raízes aéreas do tipo pneumatóforo (Fig. 1d), mecanismos de eliminação de sal (Fig. 1e), hidrocoria (Fig. 1f) e viviparidade (Fig. 1g) aparecem no ancestral comum hipotético às espécies de manguezais, representando apomorfias. Todavia, *Ruellia simplex*, táxon de ambientes alagados, pertencente ao grupo próximo das espécies de manguezais, também apresentou viviparidade (Fig. 1g), representando uma homoplasia (i.e. convergência evolutiva).

O ancestral comum hipotético às espécies de *Avicennia* possui os três mecanismos de tolerância à salinidade, os quais permaneceram em todas as espécies do gênero: (1) excludentes, eliminam o excesso de sais por um mecanismo de ultrafiltração pelas membranas das células nas raízes; (2) acumuladoras, depositam concentrações elevadas de sais nas células e tecidos das folhas e (3)

secretoras, regulam os níveis internos de sais através da secreção por glândulas nas folhas.

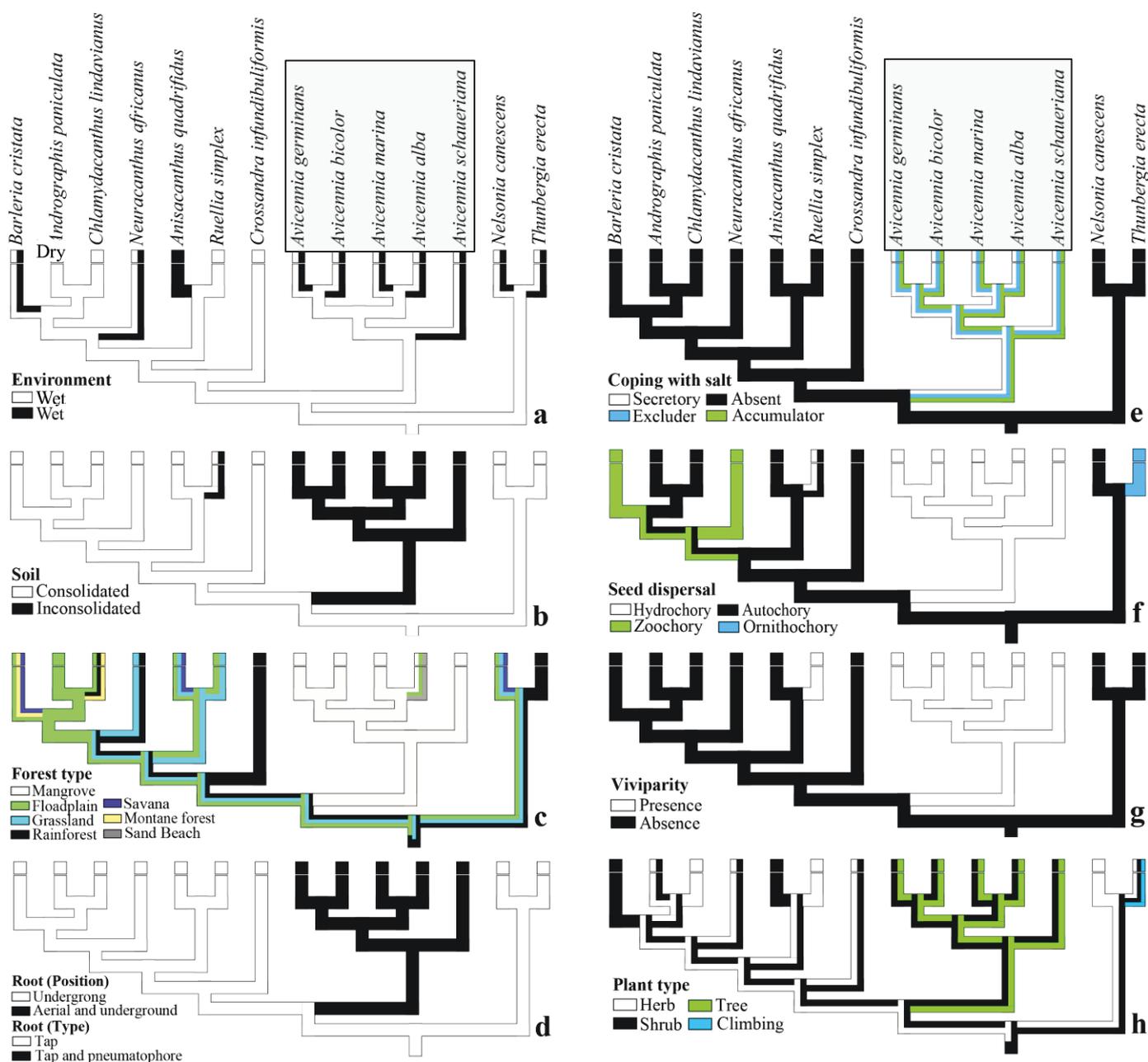


Figura 1 – Reconstrução histórica de atributos relevantes para a colonização dos manguezais, condições ambientais e tipo de floresta em Acanthaceae. (a) Ambiente (Clima), (b) Textura do solo, (c) Formação florestal, (d) Tipo (classificação) da raiz e posição da raiz no solo, (e) Mecanismo de tolerância à salinidade, (f) Síndrome de dispersão, (g) Viviparidade, (h) Forma de vida. Espécies indicadas no quadro cinza são exclusivas de manguezais.

O ancestral comum hipotético à família apresenta dispersão por autocoria e, secundariamente (e independentemente) todas as espécies de manguezais e *Ruellia simplex* incorporaram a dispersão por hidrocoria (Fig. 1f). A forma de vida ancestral nas espécies da família é herbácea e arbustiva. *Thunbergia erecta* é a única espécie avaliada que desenvolveu hábito trepador. A reconstrução dos caracteres ancestrais revelou que o porte arbóreo foi encontrado somente no ancestral hipotético das espécies de manguezais (Fig. 1h).

O teste de hipótese de evolução correlacionada de caracteres (Pagel, 1994) (Tab. 2, 3, 4 e 5) revelou correlação evolutiva significativa ($p < 0.05$) entre o tipo de formação vegetal e raízes aéreas, forma de vida e presença de viviparidade, indicando que a presença desses atributos é dependente e correlacionada com o tipo de floresta. A textura do solo (consolidado/inconsolidado) apresentou correlação significativa com viviparidade e glândulas de sal. A salinidade foi correlacionada com raízes aéreas, forma de vida e glândulas de sal.

Tabela 2 – Teste de evolução correlacionada (Pagel, 1994) de caracteres relevantes para a colonização de manguezais e o tipo de formação florestal.

Caracter	Acanthaceae			Combretaceae			Rhizophoraceae		
	<i>log</i> L(I)	<i>log</i> L(D)	<i>p</i>	<i>log</i> L(I)	<i>log</i> L(D)	<i>p</i>	<i>log</i> L(I)	<i>log</i> L(D)	<i>p</i>
Raiz aérea	-5.22	-3.23	0.01*	-6.02	-5.02	0.05*	-5.61	-4.06	0.0*
Forma de vida	-4.94	-3.10	0.0*	-7.88	-7.52	0.22	-2.46	-0.81	0.0*
Viviparidade	-8.22	-6.30	0.0*	-6.62	-6.82	1.0	-2.72	-0.92	0.09
Eliminação de sal	-4.86	-4.56	0.15	-5.66	-4.92	0.0*	-5.66	-4.89	0.11
Posição do estômato	-9.41	-9.25	0.36	-5.75	-4.93	0.15	-	-	-

Legenda: *log* L(I) = log Likelihood de evolução independente, *log* L(D) = log Likelihood de evolução dependente. (*) Indica diferença significativa ($p < 0.05$).

Combretaceae

A família possui cerca de 200 espécies e pertence à ordem Myrtales. O ancestral comum hipotético a todos os membros da família teve origem em florestas de clima quente, seco (Fig. 2a) e em solo consolidado (Fig. 2b). A capacidade de se desenvolver em ambiente com solo inconsolidado, inundado e salino (Fig. 2c)

ocorreu somente nos ancestrais das espécies de manguezais e no ancestral de *C. erectus*, constituindo linhagens que parecem ter tido a habilidade de colonizar ambientes alagados e inconsolidados a partir de ambientes secos e com solo consolidado.

O ancestral comum hipotético a todos os membros da família teve origem em savanas (Fig. 2c). *Buchenavia tomentosa* e *Macropteranthes leiocaulis* permaneceram no mesmo hábitat ancestral. Já *Conocarpus erectus* e *Terminalia catappa*, espécies filogeneticamente próximas a *B. tomentosa*, passaram a se desenvolver em praias arenosas. Além de praias arenosas, *Conocarpus erectus* tem a capacidade de habitar florestas tropicais e manguezais. *Strephonema manni* é encontrada em florestas tropicais, *Guiera senegalensis* em floresta montana seca e savanas e *Macropteranthes leiocaulis* em savanas. Essas três espécies precedem na filogenia o ramo composto pelas espécies de manguezais, *Lumnitzera littorea*, *Lumnitzera racemosa* e *Laguncularia racemosa* (Fig. 2c).

Tabela 3 – Teste de evolução correlacionada (Pagel, 1994) de caracteres relevantes para a colonização de manguezais e inundação.

Caracter	Acanthaceae			Combretaceae			Rhizophoraceae		
	<i>log L(I)</i>	<i>log L(D)</i>	<i>p</i>	<i>log L(I)</i>	<i>log L(D)</i>	<i>p</i>	<i>log L(I)</i>	<i>log L(D)</i>	<i>p</i>
Raiz aérea	-8.12	-7.66	0.13	-6.33	-4.94	0.02*	-6.60	-5.74	0.13
Forma de vida	-8.17	-7.59	0.30	-7.88	-7.52	0.22	-4.54	-4.39	0.01*
Viviparidade	-10.35	-9.57	0.19	-6.62	-6.69	1.0	-6.70	-5.36	0.0*
Eliminação de sal	-8.15	-7.68	0.09	-5.66	-4.92	0.18	-8.08	-7.85	0.4
Posição do estômato	-12.06	-11.97	0.72	-5.66	-4.92	0.19	-	-	-

Legenda: *log L(I)* = log Likelihood de evolução independente, *log L(D)* = log Likelihood de evolução dependente. (*) Indica diferença significativa ($p < 0.05$).

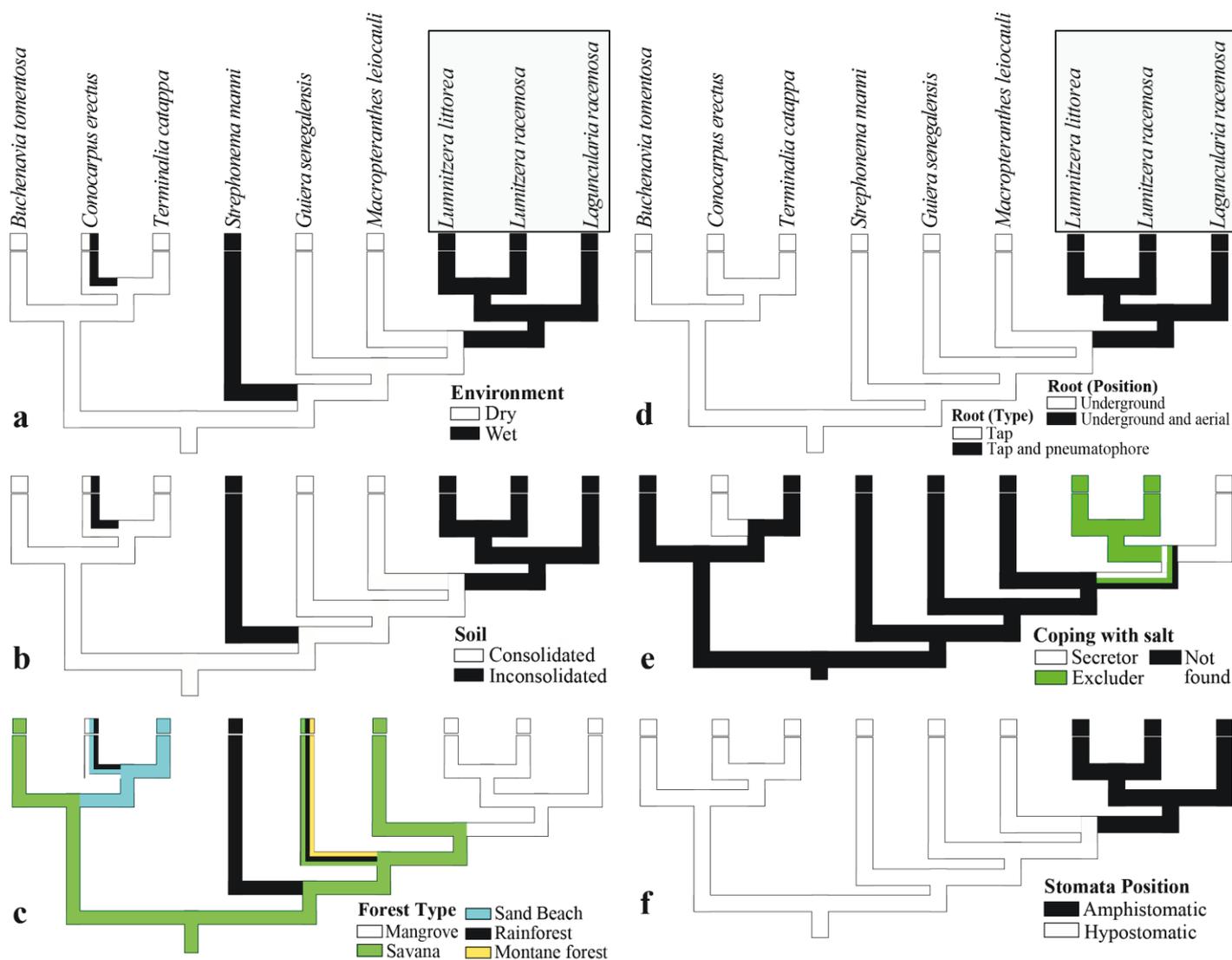


Figura 2 – Reconstrução histórica de atributos relevantes para a colonização dos manguezais, condições ambientais e tipo de floresta em Combretaceae. (a) Ambiente (Clima), (b) Textura do solo, (c) Formação florestal, (d) Tipo (classificação) da raiz e posição da raiz no solo, (e) Mecanismo de tolerância à salinidade e (f) Posição do estômato nas folhas. Mecanismo de tolerância à salinidade. Espécies indicadas no quadro cinza são exclusivas de manguezais.

Folhas simples, com margem inteira e sistema radicial subterrâneo axial são simplesiomorfias na família. Raízes aéreas do tipo pneumatóforos (Fig. 2d), mecanismos de tolerância a salinidade (Fig. 2e) e folhas anfiestomáticas (Fig. 2f) apareceram no ancestral hipotético das espécies de manguezais, representando apomorfias. A análise sugere que o ancestral comum às espécies de manguezais da família Combretaceae possuía mecanismos de exclusão e secreção de sais.

Entretanto, *Laguncularia racemosa* passou especificamente a realizar secreção de sais pelas folhas, enquanto *Lumnitzera racemosa* e *Lumnitzera litorea* passaram a realizar apenas exclusão de sais pelas raízes. *Conocarpus erectus* também apresentou mecanismo de tolerância à salinidade de forma homoplásica (i.e. convergência evolutiva, Fig. 2e).

O teste de hipótese de evolução correlacionada de caracteres (Pagel, 1994) (Tab. 2, 3, 4 e 5) revelou correlação evolutiva significativa ($p < 0.05$) entre manguezais e as raízes aéreas. A presença de inundação foi correlacionada com raízes aéreas. A textura do solo apresentou correlação significativa com raízes aéreas, glândulas de sal e a posição dos estômatos. Já a salinidade foi correlacionada com raízes aéreas.

Tabela 4 – Teste de evolução correlacionada de caracteres (Pagel, 1994) de atributos relevantes para a colonização de manguezais e textura do solo (Consolidado/Inconsolidado).

Caracter	Acanthaceae			Combretaceae			Rhizophoraceae		
	$\log L(I)$	$\log L(D)$	p	$\log L(I)$	$\log L(D)$	p	$\log L(I)$	$\log L(D)$	p
Raiz aérea	-3.74	-3.16	0.20	-3.53	-2.47	0.04*	-6.20	-5.75	0.45
Forma de vida	-3.44	-3.08	0.36	-7.85	-7.49	0.21	-4.79	-4.72	0.01*
Viviparidade	-6.70	-6.03	0.03*	-5.08	-4.66	0.19	-7.12	-5.53	0.01*
Eliminação de sal	-5.43	-4.47	0.0*	-4.25	-2.48	0.01*	-8.58	-8.17	0.33
Posição do estômato	-9.37	-9.20	0.21	-4.25	-2.46	0.0*	-	-	-

Legenda: $\log L(I)$ = log Likelihood de evolução independente, $\log L(D)$ = log Likelihood de evolução dependente. (*) Indica diferença significativa ($p < 0.05$).

Rhizophoraceae

A família pertence à ordem Malpighiales, com cerca de 160 espécies e representa o grupo taxonômico de manguezais mais difundido. O ancestral comum hipotético às espécies da família teve origem em ambiente quente e úmido (Fig. 3a). A reconstrução do substrato ancestral para a família sugere que ela basalmente poderia ocupar regiões tanto de solo inconsolidado quanto consolidado (Fig. 3b) e com a presença de inundação (Fig. 3c). A maioria das espécies da família se desenvolve atualmente em solos inundados, em planícies de inundação (Fig. 3c). O ancestral hipotético do clado composto por espécies de manguezais é o único a

habitar ambientes inundados por água salgada e salobra, a partir de um ancestral que habitava ambientes inundáveis por água doce (Fig. 3c).

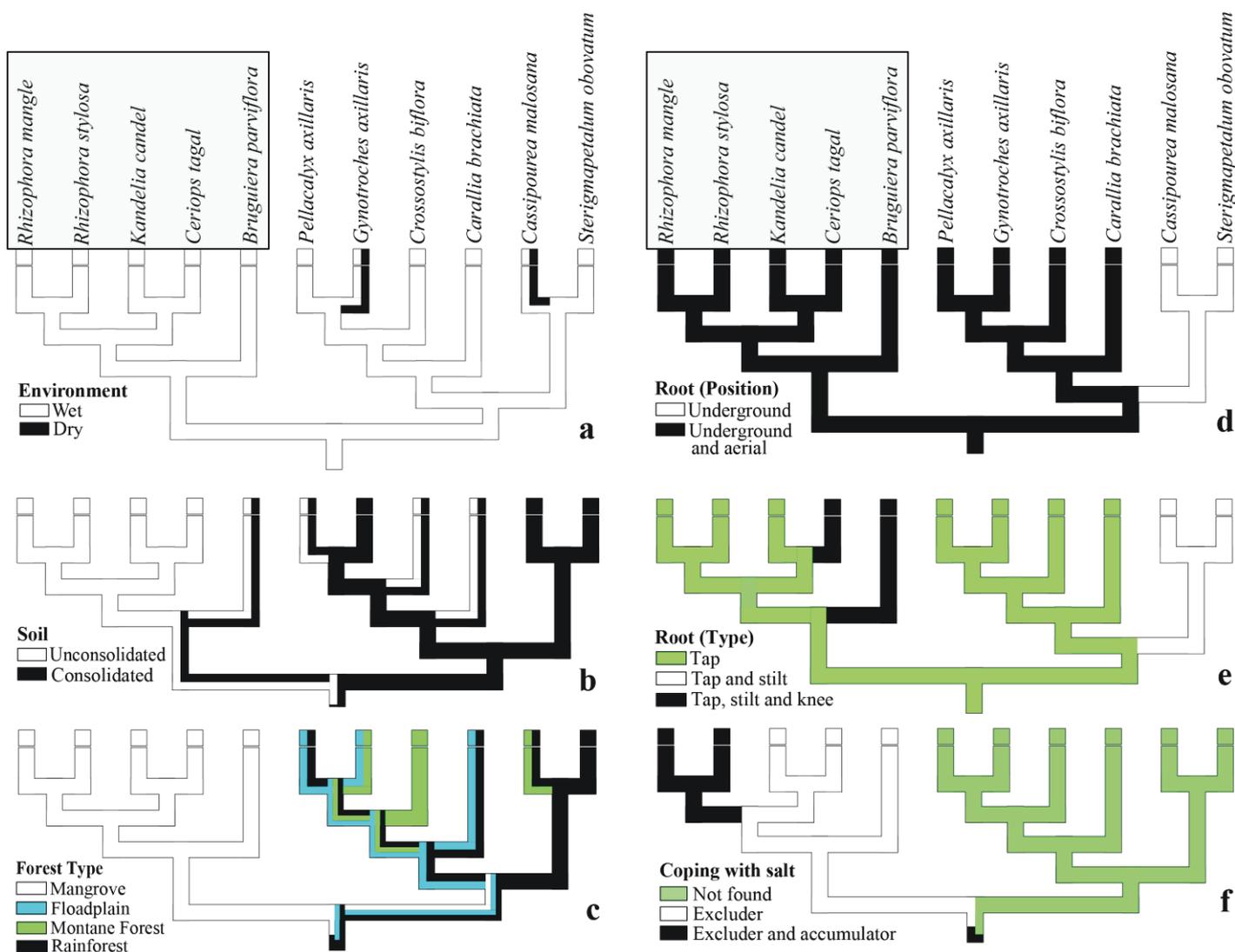


Figura 3 – Reconstrução histórica de atributos relevantes para a colonização dos manguezais, condições ambientais e tipo de floresta em Rhizophoraceae. (a) Ambiente (Clima), (b) Textura do solo, (c) Formação florestal, (d) Posição da raiz no solo, (e) Tipo (classificação) da raiz e (f) Mecanismo de tolerância à salinidade. Espécies indicadas no quadro cinza são exclusivas de manguezais.

Folhas simples, com filotaxia oposta e hipoestomáticas, e raiz subterrânea axial são caracteres hipoteticamente presentes no ancestral comum da família. A raiz aérea é também um atributo putativamente presente no ancestral comum desse táxon, tendo sido observado na maioria das espécies avaliadas (Fig. 3d). *Bruguiera parviflora* e *Ceriops tagal*, táxons integrantes do grupo das espécies de manguezais,

além de raízes escora apresentaram uma nova característica, as raízes “joelho” (*knee roots*) (Fig. 3e), caracterizando uma novidade evolutiva.

Os mecanismos de eliminação de sal e viviparidade são características exclusivas do clado composto por espécies de manguezais (Fig. 3f). As espécies mais basais do grupo de manguezais, *Kandelia candel*, *Ceriops tagal* e *Bruguiera parviflora*, conservaram o estado ancestral desse atributo, realizando exclusão do excesso de sais pelas raízes. Enquanto que, *Rhizophora mangle* e *Rhizophora stylosa* adicionaram a capacidade de acumular o excesso de sais nos vacúolos nas folhas, o que caracteriza uma novidade evolutiva dentro do clado (Fig. 3f).

Tabela 5 – Teste de evolução correlacionada de caracteres (Pagel, 1994) de atributos relevantes para a colonização de manguezais e salinidade.

Caracter	Acanthaceae			Combretaceae			Rhizophoraceae		
	<i>log L(I)</i>	<i>log L(D)</i>	<i>p</i>	<i>log L(I)</i>	<i>log L(D)</i>	<i>p</i>	<i>log L(I)</i>	<i>log L(D)</i>	<i>p</i>
Raiz aérea	-5.51	-3.17	0.0*	-6.33	-4.94	0.03*	-5.62	-3.97	0.01*
Forma de vida	-4.94	-3.16	0.03*	-7.87	-7.51	0.28	-2.46	-0.75	0.0*
Viviparidade	-6.42	-6.26	0.32	-6.62	-6.69	1.0	-2.48	-0.76	0.05*
Eliminação de sal	-5.22	-3.14	0.0*	-5.66	-4.92	0.18	-5.61	-4.72	0.08
Posição do estômato	-9.46	-9.30	0.21	-5.66	-4.92	0.22	-	-	-

Legenda: *log L(I)* = log Likelihood de evolução independente, *log L(D)* = log Likelihood de evolução dependente. (*) Indica diferença significativa ($p < 0.05$).

O teste de hipótese de evolução correlacionada de caracteres (Pagel, 1994) (Tab. 2, 3, 4 e 5) revelou correlação evolutiva significativa ($p < 0.05$) entre formação vegetal, raízes aéreas e a forma de vida. A inundação foi correlacionada significativamente com forma de vida. A textura do solo apresentou correlação com a forma de vida e viviparidade. Já a salinidade foi correlacionada com raízes aéreas, forma de vida e viviparidade.

3.6 DISCUSSÃO

A reconstrução dos caracteres ancestrais das espécies arbóreas de manguezais indicou que a origem de alguns atributos comumente associados à colonização dos manguezais está associada a ajustes funcionais (i.e. adaptação) à

pressão ambiental específica. Contudo, foi encontrado evidências de que processos de *ecological fitting* por conservatismo filogenético, plasticidade fenotípica e exaptação foram também importantes para o estabelecimento das linhagens estudadas nesse ambiente de transição.

As raízes aéreas do tipo pneumatóforo nas espécies de manguezais das famílias Acanthaceae e Combretaceae representam um processo de convergência evolutiva. A apomorfia das raízes aéreas nesses táxons sugere que esse atributo ocorreu historicamente por um ajuste funcional à pressão seletiva do ambiente, como já sugerido por outros autores (Hogart, 1999; Parida and Jha, 2010; Spalding, 2010; Tomlinson, 1986). O teste de evolução correlacionada de caracteres ofereceu suporte adicional ao encontrado nas reconstruções históricas. Onde o aparecimento das raízes aéreas foi correlacionado com a inundação e salinidade, facilitando o processo de *fit* ao ambiente. Entretanto, Sahu et al. (2016) observaram que raízes pneumatóforos em ambas famílias se deram por exaptação, uma vez que a reconstrução de caracteres ancestrais revelou múltiplas origens. Este atributo foi observado em espécies de manguezais e em grupos irmãos de outros ecossistemas. Contudo, no estudo de Sahu et al. (2016) as famílias agrupadas nos cladogramas são filogeneticamente distantes, muitas vezes pertencentes a ordens botânicas distintas, o que parece ter induzido aos autores a um erro do tipo II – onde foi aceita a hipótese de homologia de caracteres convergentes ao aproximar artificialmente clados filogeneticamente distantes.

Em Rhizophoraceae, as raízes aéreas representam um caráter presente no ancestral comum das espécies analisadas. Essa conclusão foi suportada pela análise de correlação evolutiva entre presença de raízes aéreas e tipo de floresta. Raízes aéreas, nesse caso, representam uma forte evidência de conservatismo filogenético. Conservatismo filogenético consiste na permanência de informações genéticas dentro da filogenia de uma linhagem (Prinzing et al., 2001). Dessa forma, quando ocorre o encontro com um recurso semelhante ao do passado, a espécie possui a capacidade de responder a esta nova condição (Agosta and Klements, 2008). Assim, a presença das raízes aéreas favoreceu a colonização das espécies no ecossistema manguezal por *ecological fitting*.

A tolerância a salinidade elevada é certamente um atributo fundamental para a sobrevivência em manguezais. Os mecanismos de excreção de sais reportados

para as linhagens estudadas variam entre mecanismos secretores por glândulas nas folhas, acumulação de sais nos tecidos foliares e exclusão de sais pelas raízes. Tais mecanismos se distribuem de maneira distinta nas três linhagens avaliadas e indicaram padrões contrastantes de tolerância à salinidade. A presença de características favoráveis pode tornar algumas linhagens mais propensas a se ajustarem ao aumento da salinidade do que outras (Bromham, 2015). *Conocarpus erectus*, espécie associada a manguezais da família Combretaceae, possui a capacidade de acumular grandes quantidades de sais em suas folhas (Medina, 1999; Saenger, 2002). A presença desse mecanismo indica a ocorrência de convergência evolutiva de *C. erectus* em relação às linhagens exclusivas de manguezais, que pertencem a grupos irmãos. O processo de convergência é considerado comum entre taxa de manguezais de diferentes famílias (Shi et al., 2005) e o presente estudo aponta que a convergência pode também ocorrer entre táxons da mesma família.

Foram encontradas evidências de que as glândulas de sal nas espécies de *Avicennia* e *Laguncularia racemosa* ocorreram por mecanismo de exaptação, quando um atributo previamente moldado pela seleção natural para uma determinada finalidade é utilizado para uma nova função (Barve and Wagner, 2013; Gould and Vrba, 1982). O observado nas reconstruções de caracteres, juntamente com as evidências anatômicas e fisiológicas, sugerem que as glândulas responsáveis por secretarem sais atualmente podem ter possuído outra função no passado. Apesar das glândulas de sal de *Avicennia* e *Laguncularia racemosa* serem multicelulares apresentam diferenças na estrutura anatômica. As espécies de *Avicennia* possuem glândulas cobertas por cutícula que formam uma câmara responsável por estocar sais (Campbell and Thomson, 1976; Naidoo, 2016). Já *L. racemosa* possui glândulas multicelulares localizadas em criptas epidérmicas na região adaxial da folha (Francisco et al., 2009). Outras espécies de Combretaceae, *Lumnitzera* e *Conocarpus*, possuem estruturas semelhantes às glândulas de *L. racemosa*. Contudo, não existem evidências de que estas glândulas atuem na secreção de sais (Parida and Jha, 2010). A estrutura das glândulas de sal das espécies de *Avicennia* e *L. racemosa* se assemelha a glândulas de outros táxons filogeneticamente relacionados. Entretanto, possuem funções distintas, como

secreção de compostos secundários, enzimas, mucilagem, néctar, entre outras (Dassanayake and Larkin, 2017).

As reconstruções indicaram que tanto a presença de viviparidade, assim como a hidrocoria, representaram sinapomorfias convergentes nas espécies de manguezais de Acanthaceae e Rhizophoraceae e em *Laguncularia racemosa* na família Combretaceae. Sugerindo que essas características representam, de fato, o resultado do processo de adaptação à pressão seletiva. Os resultados da análise de evolução correlacionada de caracteres reforçam o encontrado nas reconstruções de caracteres ancestrais – foi detectada uma correlação significativa entre a presença de viviparidade e o tipo de floresta em Acanthaceae e entre viviparidade, inundação e salinidade em Rhizophoraceae. *Ruellia simplex* (Acanthaceae) também apresenta viviparidade e dispersão por hidrocoria. A espécie é tipicamente encontrada em margens de lagos e lagoas, florestas de várzea e formações aluviais (Ezcurra and Daniel, 2007; Langeland et al., 2008). Apesar de *R. simplex* não habitar manguezais, essa espécie está submetida a mesma pressão seletiva, na qual o solo é periodicamente alagado e, em algumas situações, inconsolidado. A dispersão por hidrocoria e a viviparidade representam, portanto, exemplos de convergência adaptativa.

Foi observado na reconstrução dos caracteres ancestrais e proposto pela análise de correlação evolutiva que o ancestral comum de Acanthaceae possuía o hábito de vida herbáceo/arbustivo. Entre aproximadamente 3.000 espécies pertencentes à família Acanthaceae, o porte arbóreo é raro. As espécies de manguezais e *Trichanthera gigantea* (Bonpl.) Nees são as espécies que apresentam porte arbóreo na família. As espécies de *Avicennia* também possuem porte arbustivo (*dwarf formation*), caracterizados por florestas maduras nas quais o crescimento das árvores é atrofiado devido à escassez de nutrientes no solo (Lovelock et al., 2004; Lugo and Snedaker, 1974; Naidoo, 2010, 2006; Reef et al., 2010). As *dwarf formations* e a variação de *T. gigantea* (entre porte arbóreo e arbustivo) podem representar evidências de *ecological fitting* por plasticidade fenotípica, a qual representa a habilidade de um único genótipo gerar outros fenótipos em resposta a diferentes condições ambientais distintas, sem que haja uma novidade evolutiva ou mudança na frequência gênica do indivíduo (Fusco and Minelli, 2010; Pigliucci et al., 2006; West-Eberhard, 2003).

O processo adaptativo do porte arbóreo em *Avicennia* nos manguezais possivelmente está relacionado à maior resistência dessa forma de vida às intensas variações das marés, forte fluxo de ondas, ventos e, em alguns locais, ciclones, tsunamis e furacões (Baldwin et al., 2001; Kathiresan and Bingham, 2001; Spalding et al., 2010). O desenvolvimento e a sobrevivência de espécies arbóreas em diferentes condições ambientais estão intimamente relacionados à densidade da madeira e a sua força mecânica (Curran et al., 2008; Santini et al., 2013). O porte arbóreo fornece maior suporte no solo. Nos manguezais, o desenvolvimento do porte arbóreo, juntamente com raízes aéreas, garantem maior estabilidade e resistência, uma vez que o solo além de periodicamente inundado é na sua grande maioria inconsolidado.

As folhas hipoestomáticas foram herdadas do ancestral comum na família Combretaceae. Entretanto, as espécies exclusivas de manguezais nessa família, apresentaram apomorfia para esse atributo, pois possuem estômatos presentes em ambas as faces da folha (anfiestomáticas). O encontrado na reconstrução de caráter ancestral indicou que a posição dos estômatos nas espécies de manguezais foi também um atributo adaptativo em Combretaceae. Folhas anfiestomáticas são associadas a ambientes quentes e secos, muito comuns em xerófitas, proporcionando aumento na condutância estomática foliar para uma maior eficiência na captação de CO₂ (Mott et al., 1982). Apesar dos manguezais serem considerados ambientes úmidos e periodicamente alagados, a condição fisiológica do solo se assemelha a um ambiente xeromorfo, em decorrência do estresse gerado pela elevada salinidade (Parida and Jha, 2010). A capacidade de se ajustar a essa condição parece ter facilitado o ajuste dessas espécies ao ambiente dos manguezais, devido à pressão seletiva ser a mesma de um ambiente seco. Ainda, as folhas de *L. racemosa* e das espécies de *Lumnitzera* são espessas, esclerófilas e apresentam suculência (Parida and Jha, 2010; Sereneski-Lima et al., 2013). Dessa forma, a difusão de gases em mesófilos mais espessos pode ser mais lenta e até mesmo ineficiente se os estômatos estiverem presentes em apenas uma das faces da folha (Mott et al., 1982). A esclerofilia, quando associada à suculência da folha, é também considerada uma resposta adaptativa as condições ambientais neste ecossistema (Read and Season, 2003).

3.7 CONCLUSÕES

A reconstrução de caracteres ancestrais evidenciou que alguns dos atributos fundamentais para a colonização e o desenvolvimento de espécies arbóreas nos manguezais ocorreram por processo adaptativo (Tab. 6). A presença de folhas anfiestomáticas nas espécies de *Lumnitzera* e *Laguncularia racemosa* foram também atributos com indicativos de adaptação as condições ambientais encontradas nos manguezais. Embora tais atributos tenham passado pelo mesmo processo evolutivo de ajuste funcional a uma pressão seletiva específica, a origem dos atributos se deu historicamente de maneira distinta nas linhagens estudadas, uma vez que existem diferenças nas tolerâncias e mecanismos de cada táxon/linhagem (e.g. maior eficiência na tolerância a salinidade nas espécies de *Avicennia*).

Tabela 6 – Síntese dos resultados da reconstrução ancestral de atributos relevantes para a colonização e estabelecimento em manguezais.

	Acanthaceae	Combretaceae	Rhizophoraceae
Raiz aérea	Adaptação	Adaptação	Conservatismo filogenético
Tolerância à salinidade	Exaptação	Exaptação	Adaptação
Viviparidade	Adaptação	Adaptação	Adaptação
Folha hipoestomática	-	Adaptação	-
Forma de vida	Adaptação	-	-

Processos de *ecological fitting* foram também importantes no estabelecimento das espécies de manguezais. Em Rhizophoraceae as raízes aéreas do tipo escora consideradas originalmente como adaptativas, já estavam presentes no ancestral da família, muito antes da exposição das espécies a pressão seletiva imposta por esse tipo de floresta (Tab. 6). Outra evidência de processos de *ecological fitting* foi observada nas glândulas de sal nas espécies de *Avicennia* e *L. racemosa*, através do processo de exaptação, onde as glândulas que exerciam outras funções foram co-aptadas para eliminação de sais. Ainda, o porte arbóreo em espécies de

Acanthaceae, mesmo raro, apresentou plasticidade fenotípica para as espécies de *Avicennia*, que variam entre formações anãs a indivíduos arbóreos (Tab. 6).

Nossos dados permitiram inferir que o sucesso e estabelecimento das espécies arbóreas nos manguezais ocorreram de maneira distinta nas linhagens estudadas. E também através de um mosaico de processos evolutivos, representados por adaptação (i.e. convergência evolutiva), mas também por processos de *ecological fitting* (Conservatismo filogenético, plasticidade fenotípica e exaptação).

3.8 AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos para o primeiro autor e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq) pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa para M.R.T.B. e W.A.B.

3.9 REFERÊNCIAS

- Agosta, S.J., Klements, J.A., 2008. Ecological fitting by phenotypically flexible genotypes: implications for species associations, community assembly and evolution. *Ecol. Lett.* 11, 1123–1134.
- Alongi, D.M., 2009. *The energetics of mangrove forests*, Springer Science and Business, New York.
- Arrivabene, H.P., Souza, I., Có, W.L.O., Rodella, R.A., Wunderlin, D.A., Milanez C.R., 2014. Functional traits of selected mangrove species in Brazil as biological indicators of different environmental conditions. *Sci. Total Environ.* 476, 496–504.
- Baldwin, A.H., Egnotovitch, M., Ford, M., Platt, W.J., 2001. Regeneration in fringe mangrove forests damaged by Hurricane Andrew. *Plant Ecol.* 157, 149–162.
- Barve, A., Wagner, A., 2013. A latent capacity for evolutionary innovation through exaptation in metabolic systems. *Nature.* 500, 203–206.

- Bromham, L., 2015. Macroevolutionary patterns of salt tolerance in angiosperms. *Annals of Botany*. 115, 333–341.
- Brooks, D., McLennan, B.A., 1991. *Phylogeny, ecology and behavior. A research program in comparative biology*, The University of Chicago Press, Chicago.
- Brooks, D.R. McLennan, D.A. 2002. *The nature of diversity: an evolutionary voyage of discovery*, The University of Chicago Press, Chicago.
- Campbell, N., Thomson, W.W., 1976. The ultrastructure of *Frankenia* salt lands. *Ann. Bot.* 40, 681–686.
- Chave, J., Coomes, D., Jansen, S., Lewis, S., Swenson, N., Zanne, A., 2009. Towards a worldwide wood economics spectrum. *Ecol. Lett.* 12, 351–366.
- Curran, T.J., Gersbach, L.N., Edwards, W., Krockenberger, A.K., 2008. Wood density predicts plant damage and vegetative recovery rates caused by cyclone disturbance in tropical rainforest tree species of North Queensland, Australia. *Austral Ecol.* 33, 442–450.
- Dassanayake, M., Larkin, J.C., 2017. Making Plants Break a Sweat: the Structure, Function, and Evolution of Plant Salt Glands. *Front. Plant Sci.* 8, 406. doi:10.3389/fpls.2017.00406.
- Dodd, R.S., Rafii, Z.A., 2002. Evolutionary genetics of mangroves: continental drift to recent climate change. *Trees*. 16, 0–86.
- Duke, N.C., 1992. *Mangrove floristics and biogeography. Tropical mangrove ecosystems, Coastal and estuarine series*, American Geophysical Union, Washington.
- Ellison, A.M., Farnsworth, E.J., Merkt, E., 1999. Origins of mangrove ecosystems and the mangrove biodiversity anomaly. *Global Ecology and Biogeography*. 8, 95–115.
- Ellison, J.C., 2012. *Climate Change Vulnerability Assessment and Adaptation Planning for Mangrove System*, World Wildlife Fund (WWF), Washington, DC.
- Ezcurra, C., Daniel, T.F., 2007. *Ruellia simplex*, an older and overlooked name for *Ruellia tweediana* and *Ruellia coerulea* (Acanthaceae). *Darwiniana*. 45, 201–203.
- Feller, I.C., Whigham, D.F., O'Neill, J.P., McKee, K.L., 1999. Effects of nutrient enrichment on within-stand cycling in a mangrove forest. *Ecology*. 80(7), 2193–2205.

- Francisco, A.M., Diaz, M., Romano, M., Sanchez, F., 2009. Morphoanatomical description of leaves glands types in the white mangrove *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn (f.). *Acta Microsc.* 18, 237–252.
- Fusco, G., Minelli, A., 2010. Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 365(1540), 547–556.
- Gere, J., Yessoufou, K., Daru, B.H., Maurin, O., 2015. African continent a likely origin of family Combretaceae (Myrtales). A biogeographical view. *Annu Res Rev Biol.* 8(5), 1–20.
- Giri, C., Ochieng, E., Tieszen, L.L., Zhu, Z., Singh, A., Loveland, T., Masek, J., Duke, N., 2010. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 20(1), 154–159.
- Gould, S.J., Vrba, E.S., 1982 'Exaptation – A Missing Term in the Science of Form. *Paleobiology.* 8(1), 4–15.
- Hogarth, P.J. 1999. *The biology of mangroves*, Oxford University Press Inc., New York.
- Jagtap, T.G., Nagle, V.L., 2007. Response and adaptability of mangrove habitats from the Indian subcontinent to changing climate. *Ambio.* 36, 328–334.
- Janzen, D., 1985. On ecological fitting. *Oikos.* 45, 308–310.
- Juncosa, A.M., Tomlinson, P.B., 1988. Systematic comparison and some biological characteristics of Rhizophoraceae and Anisophylleaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 75, 1296–1318.
- Kathiresan, K., Bingham, B.L., 2001. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Adv Mar Biol.* 40, 81–251.
- Langeland, K.A., Cherry, H.M., McCormick, C.M., Craddock Burks, K.A., 2008. *Identification and Biology of Non-native Plants in Florida's Natural Areas, USA: University of Florida IFAS Extension, Gainesville, Florida.*
- Li, X., Duke, N.C., Yang, Y., Huang, L., Zhu, Y., Zhang, Z., Zhou, R., Zhong, C., Huang, Y., Shi, S., 2016. Re-Evaluation of Phylogenetic Relationships among Species of the Mangrove Genus *Avicennia* from Indo-West Pacific Based on Multilocus Analyses. *PLoS ONE.* 11(10), 1–14.
- Lo, E.Y.Y., Duke, N.C., Sun, M., 2014. Phylogeographic pattern of *Rhizophora* (Rhizophoraceae) reveals the importance of both vicariance and long-distance oceanic dispersal to modern mangrove distribution. *BMC Evol Biol.* 14(83), 1–15.

- Lovelock, C.E., Feller, I.C., Mckee, K.L., Engelbrecht, B.M.J., Ball, M.C., 2004. The effect of nutrient enrichment on growth, photosynthesis and hydraulic conductance of dwarf mangroves in Panama. *Funct. Ecol.* 18, 25–33.
- Lugo, A.E., Snedaker, S.C., 1974. The Ecology of Mangroves. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 5, 39–64.
- MacNae, W., 1968. A General Account of the Fauna and Flora of Mangrove Swamps and Forests in the Indo-West-Pacific Region. *Adv Mar Biol.* 6, 73–270.
- Maddison, W.P., Maddison, D.R., 2016. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.11 < <http://mesquiteproject.org> >.
- Madi, A.P.L.M., Boeger, M.R.T., Reissmann, C.B., Martins, K.G., 2016. Soil-plant nutrient interactions in two mangrove areas at southern Brazil. *Acta Biolo Colomb.* 21, 39–50.
- McDade, L., Daniel, T., Kiel, C., 2008. Towards a comprehensive understanding of phylogenetic relationships among lineages of Acanthaceae s.l. (Lamiales). *Am. J. Bot.* 95(9), 1136–52.
- Medina, E., 1999. Mangrove physiology: the challenge of salt, heat, and light stress under recurrent flooding. *Ecosistemas de Manglar en América Tropical*, Instituto de Ecología AC México, Costa Rica.
- Medina, E., Fernandez, W., Barboza, S., 2015. Element uptake, accumulation, and resorption in leaves of mangrove species with different mechanisms of salt regulation. *Web Ecol.* 15, 3–13.
- Mori, G.M., Zucchi, M.I., Souza, A.P., 2015. Multiple-Geographic-Scale Genetic Structure of Two Mangrove Tree Species: The Roles of Mating System, Hybridization, Limited Dispersal and Extrinsic Factors. *PLoS ONE*, 10(2), 1–23.
- Mott, K.A., Gibson, A.C., O'Leary, J.W., 1982. The adaptative significance of amphistomatic leaves. *Plant Cell Environ.* 5, 455–460.
- Naidoo, G., 2006. Factors contributing to dwarfing in the mangrove *Avicennia marina*. *Ann. Bot.* 97, 1095–1101.
- Naidoo, G., 2010. Ecophysiological differences between fringe and dwarf *Avicennia marina* mangroves. *Trees.* 24, 667–673.
- Naidoo, G., 2016. The mangroves of South Africa: an ecophysiological review. *S. Afr. J. Bot.* 107101–113.

- Pagel, M., 1994. Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proc. R. Soc. London B.* 255,37–45.
- Parida, A.K., Jha, B., 2010. Salt tolerance mechanisms in mangroves: a review. *Trees.* 24, 199–217.
- Pigliucci, M., Murren, C.J., Schlichting, C.D., 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J Exp Biol.* 209(12), 2362–2367.
- Popp, M., Polania, J., Weiper, M., 1993. Physiological Adaptations to Different Salinity Levels in Mangrove. In: Lieth, H., Al Masoom, A., (Eds.), *Towards the Rational Use of High Salinity Tolerant Plants.* Springer, Dordrecht, pp. 217–224.
- Prinzing, A., Durka, W., Klotz, S., Brandl, R., 2001. The niche of higher plants: evidence for phylogenetic conservatism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 268(1483), 2383–2389.
- Read, J., Sanson, G.D., 2003. Characterizing sclerophylly: the mechanical properties of a diverse range of leaf types. *The Phytol.* 160, 81–99.
- Reef, R., Feller, I. C., Lovelock, C.E., 2010. Nutrition of mangroves. *Tree Physiol.* 30, 1148–1160.
- Saenger, P., 2002. *Mangrove ecology, silvaculture and conservation,* Kluwer, Dordrecht.
- Sahu, S.K., Singh, R., Kathiresan, K., 2016. Multi-gene phylogenetic analysis reveals the multiple origin and evolution of mangrove physiological traits through exaptation. *Estuar Coast Shelf Sci.* 183, 41–51.
- Santini, N.S., Nele, S., Vicki, B., Lovelock, C.E., 2013. The anatomical basis of the link between density and mechanical strength in mangrove branches. *Funct. Plant Biol.* 40, 400–408.
- Schwarzbach, A.E., Ricklefs, R.E., 2000. Systematic affinities of Rhizophoraceae and Anisophylleaceae, and intergeneric relationships within Rhizophoraceae, based on chloroplast DNA, nuclear ribosomal DNA, and morphology. *Am. J. Bot.* 87(4), 547–564.
- Sereneski-Lima, C., Boeger, M.R.T., Carvalho, L.L., Pelozo, A., Soffiatti, P., 2013. Sclerophylly in mangrove tree species from South Brazil. *Rev Mex Biodivers.* 84, 1159–1166.

- Shi, S., Huang, Y., Zeng, K., Tan, F., He, H., Huang, J., Fu, Y., 2005. Molecular phylogenetic analysis of mangroves: independent evolutionary origins of vivipary and salt secretion. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34(1), 159–166.
- Shi, S.H., Zhong, Y., Huang, Y.L., Du, Y., Qiu, X., Chang, H., 2002. Phylogenetic relationships of the Rhizophoraceae in China based on sequences of the chloroplast gene *matK* and the internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA and combined data set. *Biochem. Syst. Ecol.* 30, 309–319.
- Spalding, M., Kainuma, M., Collins, L., 2010. *World Atlas of Mangroves*, Earthscan, London/Washington, DC.
- Tan, F., Shi, S., Zhong, Y., Gong, X., Wang Y., 2002. Phylogenetic relationships of combretoidae (Combretaceae) inferred from plastid, nuclear gene and spacer sequences. *Int J Plant Sci.* 115, 475–481.
- Tomlinson, P.B., 1986. *The botany of mangroves*, Cambridge University Press, New York.
- Tripp, E.A., McDade, L.A., 2014. A rich fossil record yields calibrated phylogeny for Acanthaceae (Lamiales) and evidence for marked biases in timing and directionality of intercontinental disjunctions. *Syst. Biol.* 63(5), 660–684.
- Wang, L., Mu, M., Li, X., Ling, P., Wang, W., 2010. Differentiation between true mangroves and mangrove associates based on leaf traits and salt contents. *J. Plant Ecol.* 4(4), 292-301.
- West-Eberhard, M. J., 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*, Oxford University Press, New York.
- Youssef, T., Saenger, P., 1996. Anatomical Adaptive Strategies to Flooding and Rhizosphere Oxidation in Mangrove Seedlings. *Aust. J. Bot.* 44, 297–313.

4 CAPÍTULO III

**Efeitos históricos e recentes na diversidade e estruturação genética de
Laguncularia racemosa (L.) Gaertn em estuários da costa Leste
Neotropical**

Historical and late effects on the genetic diversity and structure of
Laguncularia racemosa (L.) Gaertn in the Neotropical East coast estuaries

Carolina Sereneski-Lima^{1*}, Rafael Antunes Baggio¹, Maria Regina Torres Boeger¹ &
Walter A. Boeger¹

1. Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e
Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Caixa Postal 19031, 81531-990,
Curitiba, PR, Brasil.

*Corresponding author: Carolina Sereneski de Lima. sereneskilima@gmail.com.
Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Rua Francisco H.
dos Santos s/n, Jardim das Américas, CEP 81531-980, CP 19073, Curitiba, Paraná,
Brazil. +55 41 33611765.

4.1 RESUMO. *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn (Combretaceae) está entre as oito espécies arbóreas que compõe os manguezais da região Atlântico-Caribe-Leste Pacífica (AEP). Esta espécie tem sua distribuição nas Américas, Caribe e costa ocidental da África. A compreensão da estrutura genética permite elucidar os principais mecanismos históricos e contemporâneos que influenciaram a distribuição de populações atuais. Informações referentes à diversidade genética e fluxo gênico de *L. racemosa* ainda são escassos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade e a estruturação genética em oito populações de *L. racemosa* da costa Leste ocidental. Sete regiões de microssatélites nucleares foram utilizadas para genotipar 103 indivíduos de oito populações de *L. racemosa*. As populações foram consideradas geneticamente estruturadas, resultado da influência de correntes oceânicas e climatológicas. Os resultados revelaram baixa variabilidade genética nas regiões equatoriais e maior diversidade nas populações equatoriais. Tais diferenças estão possivelmente relacionadas à última glaciação, onde a formação de refúgios na região equatorial permitiu uma maior diversidade genética nestas populações. Enquanto que, a menor diversidade observada nas regiões subtropicais se relacionada a tais populações serem mais novas, resultado da colonização posterior ao aquecimento após a última glaciação.

Palavras-chave: filogeografia, diversidade genética, microssatélites, manguezais, glaciações.

4.2 ABSTRACT. *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn (Combretaceae) is one of the eight tree mangrove species of the Atlantic-Caribbean-Eastern Pacific region (AEP). This species is widely distributed throughout the Americas, Caribbean and the West Coast of Africa. Understanding the genetic structure allows elucidating the main historical and contemporary mechanisms that influenced the distribution of natural populations. Studies regarding the genetic diversity and gene flow of *L. racemosa* are still scarce. The aim of the present study was to evaluate the genetic diversity and genetic structure in populations of *L. racemosa* in the western Atlantic. Seven *loci* of nuclear microsatellites were used to genotype 103 individuals in eight populations of *L. racemosa*. *Laguncularia racemosa* populations were considered genetically structured as a result of oceanic and climatological currents. The results showed low genetic variability in the tropical and subtropical regions and greater genetic diversity in the equatorial populations. Such differences are possibly related to the last

glaciation, where the formation of refuges in the equatorial region allowed a high genetic diversity in these populations. The lowest diversity observed in the subtropical populations probably is related to these populations being younger, a result of colonization after warming at the end of the last glaciation.

Key-words: phylogeography, genetic diversity, microsatellites, mangrove, glaciations.

4.3 INTRODUÇÃO

As comunidades arbóreas de manguezais abrangem aproximadamente 137.700 km² de florestas em regiões costeiras tropicais e subtropicais (Spalding *et al.*, 2010; Giri *et al.*, 2011). Suas espécies compreendem diferentes linhagens com características morfológicas e fisiológicas que as permitem sobreviver na transição entre o ambiente continental e o marinho (Kathiresan and Bingham, 2001; Alongi, 2009). Mundialmente, cerca de 68 espécies arbóreas de manguezais são encontradas em duas regiões biogeográficas distintas: a região Indo-Oeste Pacífica (IWP) e a região Atlântico-Caribe-Leste Pacífica (AEP) (Ellison *et al.*, 1999; Luther and Greenberg, 2009; Lo *et al.*, 2014). Enquanto na primeira (IWP) manguezais apresentam uma grande riqueza, com aproximadamente 45 espécies de plantas arbóreas, a outra (AEP) é caracterizada pela presença de apenas oito espécies, pertencentes a três gêneros, *Avicennia* L., *Rhizophora* L. e *Laguncularia* C. F. Gaertn (Duke *et al.*, 1998; Hogarth, 1999; Spalding *et al.*, 2010).

O padrão de distribuição de espécies arbóreas de manguezais e de suas populações é influenciado por fatores bióticos, tais como capacidade de dispersão, flutuação, tolerância à salinidade e sobrevivência dos propágulos (Clarke *et al.*, 2001; Duke *et al.*, 2002); fatores abióticos, incluindo topografia, correntes, clima e condições de solo; e fatores históricos, como alterações climáticas, geomorfológicas e efeitos vicariantes (Dodd *et al.*, 2002; Triest, 2008; Kennedy *et al.*, 2016). Dessa forma, avaliar a estrutura genética e os padrões de dispersão de populações permite elucidar os principais mecanismos que influenciaram a distribuição atual e como o fluxo gênico de populações afeta a diversificação atual das espécies (Barbier *et al.*, 2011).

Na região AEP, a distribuição da diversidade genética foi descrita para as espécies de *Avicennia* e *Rhizophora*. *Avicennia germinans* (L.) L. e *A. schaueriana* Stapf & Leachman apresentaram estruturação genética entre as populações das regiões norte e sul da costa brasileira, influenciada pelas correntes marítimas superficiais e limitação de dispersão de pólen e propágulos (Cerón-Souza *et al.*, 2012; Mori *et al.*, 2015; Hodel *et al.*, 2016; Francisco *et al.*, 2018). Um padrão semelhante foi encontrado para *R. mangle*, que apresentou estruturação populacional, além de evidências de expansão sentido norte-sul após a última glaciação (Pil *et al.*, 2011; Sandoval-Castro *et al.*, 2012; Takayama *et al.*, 2013; Kennedy *et al.*, 2016, 2017). Apesar de diferenças estruturais, morfológicas e de história de vida entre *Rhizophora* e *Avicennia*, os padrões de diversidade genética descritos para a região da costa Leste ocidental são semelhantes (e.g. Pil *et al.*, 2011, Cerón-Souza *et al.*, 2010, 2012; Mori *et al.*, 2015).

Laguncularia racemosa C. F. Gaertn habita manguezais das Américas, Caribe e costa ocidental da África (Luther and Greenberg, 2009; Lo *et al.*, 2014) e é a única representante da família Combretaceae na região AEP. Os padrões de estruturação e distribuição da diversidade genética para *L. racemosa* tem sido pouco estudado, considerando sua ampla distribuição. Apenas um estudo foi realizado em escala espacial local. Lira-Medeiros *et al.* (2015) encontraram baixa diversidade e ausência de estruturação genética em duas populações de *L. racemosa* com condições ambientais distintas na Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil.

Dessa forma, o presente estudo foi idealizado de maneira a: a) avaliar a distribuição da diversidade genética e o padrão de fluxo gênico entre populações de *L. racemosa* ao longo de oito manguezais da costa Leste Ocidental; b) compreender como processos históricos, alterações climáticas e oceanográficas influenciaram o padrão de diferenciação das populações de *L. racemosa* na costa Leste Ocidental; e c) entender os padrões de dispersão e colonização da espécie. A adição de conhecimento sobre a história de *L. racemosa* na costa Leste Ocidental deverá ampliar a compreensão sobre processos históricos que influenciaram a distribuição dos manguezais na região. Esse conhecimento torna-se fundamental para compreender como as mudanças climáticas podem influenciar na dinâmica temporal, espacial e de distribuição de *L. racemosa* nesse ecossistema (Frankham, 2005; Chen *et al.*, 2011; Pil *et al.*, 2011; Bellard *et al.*, 2012).

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal – Folhas de 103 indivíduos de *L. racemosa* foram coletadas em oito populações distribuídas ao longo na costa Leste Ocidental (Fig. 1, Tab. 1): Little Cockroach (Flórida); Saint Kitts e Nevis (Caribe); Pará, Pernambuco, Sergipe, Paraná e Santa Catarina (Brasil). As folhas coletadas foram desidratadas em sílica gel e posteriormente pulverizadas com nitrogênio líquido. O DNA foi extraído segundo o protocolo padrão do kit DNeasy Plant Mini® (Qiagen) e posteriormente armazenados a -20°C em tampão AE.



Figura 1 – Mapa de localização das oito populações de *Laguncularia racemosa* amostradas ao longo de oito estuários da região Leste Ocidental. As populações de *Laguncularia racemosa* se distribuem na região do sudeste dos Estados Unidos, na América Central até o Sul do Brasil.

Tabela 1 – Localização, coordenadas geográficas aproximadas e número de indivíduos analisados em cada população de *Laguncularia racemosa* ao longo na costa Leste Ocidental.

Local	Sigla População	Coordenada geográfica	Nº de indivíduos
Little Coackroach, Flórida	LC	27°42'N 82°30'W	12
Saint Kitts, Caribe	SK	17°22'N 62°45'W	15
Nevis, Caribe	NE	17°09' N 62°35'W	12
Pará, Brasil	PA	00°50'S 46°36'W	7
Pernambuco, Brasil	PE	8°14'S 34°56'W	15
Sergipe, Brasil	SE	11°05'S 37°11'W	12
Paraná, Brasil	PR	25°32'S 48°18'W	15
Santa Catarina, Brasil	SC	27°49'S 48°37'W	15

Análise de microssatélites – A variabilidade e a estrutura genética das populações de *L. racemosa* foram analisadas por meio da genotipagem de sete regiões de microssatélites nucleares (LR101, LR17, LR22, LR38, LR39, LR42 e LR08) desenvolvidos especificamente para esta espécie por Nettel *et al.* (2008). A amplificação foi realizada com um volume total de 20µL, contendo 5 ng de DNA, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 25 mg/mL de BSA, 250 mM de cada iniciador (senso e anti-senso). O oligonucleotídeo iniciador foi marcado com 250 nM de CAG (50FAM) com fluorescência e 1 unidade de Taq Polymerase Platinum (Invitrogen). As condições de amplificação da PCR compuseram um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, seguido de 5 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 60°C, 1 min a 72°C. O *touchdown* consistiu em 20 ciclos de 30s a 95°C, 30s de temperatura de anelamento (diminuindo 0,5°C por ciclo) e 1 min a 72°C; seguido de 20 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 50°C e 1 min a 72°C; e extensão final a 72°C por 5 min. O produto do PCR foi genotipado em sequenciador automático de DNA ABI 3130 (Applied Biosystems). Posteriormente os alelos de cada indivíduo foram mapeados no software Geneious® 10.2.2 (Kearse *et al.*, 2012).

Análise de dados – A presença de alelos nulos e erros de genotipagem foram testados utilizando o software Micro-Checker 2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004). As

análises de diversidade genética (número de alelos, diversidade genotípica), equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação e estruturação genética (FST e AMOVA) foram realizadas no software Arlequin 3.5 (Excofier *et al.*, 2010). A riqueza alélica foi estimada utilizando o software Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2001). Para os testes com múltiplas comparações, o nível de significância foi corrigido através do método B-Y (Narum, 2006).

O teste de Mantel (1967) foi utilizado para testar isolamento por distância entre as populações através da correlação entre as distâncias genéticas (FST) e geográficas das populações de *L. racemosa* através do programa Arlequin 3.5. As distâncias geográficas utilizadas foram estimadas entre os pontos amostrados, margeando a costa Leste Ocidental no Google Earth Pro (2017) (Tab. 3).

A análise de agrupamento foi utilizada para determinar o número real de populações e a alocação dos indivíduos dentro destas populações por meio do programa Structure 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000). Foram realizadas 3 corridas independentes com 5 milhões de réplicas (500 mil de *burn-in*), com K variando entre 1 e 9. O método *ad hoc* de Evanno *et al.* (2005) foi utilizado para definir o número mais provável de populações através da ferramenta online Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2012).

Coalescência é um método importante para avaliar processos históricos e demográficos que influenciaram os padrões de distribuição atuais de indivíduos e populações. Esse método permite adicionar dimensão temporal nas análises. Dessa forma, a coalescência se torna mais robusta do que análises que utilizam apenas distribuição atual e padrões de diversidade genética (Frankham *et al.*, 2004). Embora seja conveniente analisar as relações históricas de migração entre todas as populações, análises preliminares sugeriram que uma estimativa robusta não seria possível entre todas as populações amostradas. Portanto, foi analisada a relação entre as quatro populações reveladas pela análise diferenciação genética (FST) (FL = população da Flórida, CA = populações do Caribe, BR = populações do Brasil (exceto Santa Catarina), SC = população de Santa Catarina/Brasil). O tamanho efetivo populacional e as taxas históricas de migração em longo prazo entre as populações foram estimadas no software Migrate 3.1.6 (Beerli, 2006, 2009) por inferência bayesiana. Os parâmetros foram realizados em duas corridas com três

cadeias repetidas, registrando 2 milhões de gerações cada, três cadeias de Markov de 1, 1.5, 3 e 10.000 e 10% de *burn-in*.

4.5 RESULTADOS

A presença de alelos nulos, erros de genotipagem e desequilíbrio de Hardy-Weinberg não foram recorrentes entre as populações e os *loci* avaliados. Os números de alelos por *loci* variaram entre 1 a 4 e a média de riqueza alélica por *loci* variou entre 1.17 e 2.85. As populações de Pernambuco, Pará e Paraná apresentaram as maiores médias de números de alelos ($N_a = 2.57, 2.27$ e 2.29 , respectivamente), enquanto que as populações do Pará e de Pernambuco apresentaram as maiores diversidades genéticas ($H = 0.67$ e $H = 0.45$, respectivamente) (Tab. 2). As populações do Caribe (NE e SK) foram as que apresentaram a menor diversidade genética ($H = 0.00$ e $H = 0.01$, respectivamente), assim com Sergipe e Santa Catarina no Brasil ($H = 0.00$ e $H = 0.03$, respectivamente). O coeficiente de endocruzamento (F_{is}) variou entre 0.00 (SK, PE e SC) a 0.80 (PA), sendo F_{is} significativo somente para Pará.

Tabela 2 – Número total (N) de indivíduos de *L. racemosa* amostrados, diversidade genotípica (H), coeficiente de endocruzamento (F_{is}) e número de alelos (N_a) de cada um dos sete *loci* de microssatélites avaliados (LR101, LR17, LR22, LR38, LR39, LR42 e LR08). Números de F_{is} em negrito indicam valores significativos ($p < 0.05$) e o número de alelos em negrito representam desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.017$ após a correção de Narum). *População monomórfica.

População	N	H	F_{is}	LR22	LR38	LR39	LR41	LR101	LR08	LR17	N_a
Little Coackroach, Flórida	12	0.16	1.00	2	1	1	1	1	3	2	1.57
Saint Kitts, Caribe	15	0.01	0.00	2	1	1	1	1	1	2	1.27
Nevis, Caribe	12	0.00	*	1	1	1	1	1	1	1	1.00
Pará, Brasil	7	0.67	0.80	3	2	1	3	3	3	1	2.27
Pernambuco, Brasil	11	0.45	0.00	2	1	1	3	3	4	4	2.57
Sergipe, Brasil	15	0.00	-0.40	2	2	1	3	2	3	1	2.00
Paraná, Brasil	15	0.09	-0.07	2	1	1	3	4	4	1	2.29
Santa Catarina, Brasil	15	0.03	0.00	2	1	1	3	2	1	1	1.57

As análises de estruturação genética (AMOVA e F_{st}) suportaram a presença de diferenciação e a existência de populações geograficamente estruturadas. Cerca de 60% da diversidade genética total foi decorrente de diferenças entre populações, 33% foi decorrente de variações dentro de indivíduos e 6% da variação entre indivíduos dentro de populações (F_{ST} global = 0.597, $p < 0.000$).

Tabela 3 – Na diagonal abaixo estão os valores de diferenciação genética (F_{ST}) entre populações de *L. racemosa*, com base em oito *loci* de microssatélites. Números de F_{ST} em negrito indicam valores significativos ($p < 0.013$ após correção de B-Y). Na diagonal acima está a distância geográfica (Km) entre as populações de *L. racemosa* da costa Leste Ocidental.

Population	LC	SK	NE	PA	PE	SE	PR	SC
LC	*	2530	2560	5717	7515	7952	10237	10525
SK	0.87817	*	27	3180	4978	5416	7703	7992
		-						
NE	0.91304	0.00767	*	3153	4947	5389	7676	7965
PA	0.24366	0.58023	0.61665	*	1794	2236	4523	4812
PE	0.1229	0.64188	0.67735	0.01581	*	442	2729	3018
SE	0.08088	0.70443	0.73754	0.04136	-0.03671	*	2287	2576
PR	-0.03724	0.85523	0.88588	0.2339	0.10703	0.06404	*	289
SC	-0.01449	0.92874	0.96168	0.37238	0.23899	0.18719	0.00181	*

As análises pareadas de estruturação genética (F_{ST}) suportaram a formação de quatro grupos, com diferenciação genética não significativa dentro dos grupos e diferenciação significativa entre os grupos de: 1) Little Coackroach; 2) Saint Kitts e Nevis; 3) Pará, Pernambuco, Sergipe e Paraná e 4) Santa Catarina ($p < 0.013$, após correção de B-Y, Narum) (Tab. 3). A população da Flórida (Little Coackroach) é geneticamente diferente das demais. As populações do Caribe (Saint Kitts e Nevis) foram semelhantes entre si e diferentes da população da Flórida e das populações do Brasil. As populações brasileiras do Pará, Pernambuco, Sergipe e Paraná foram semelhantes entre si. Já a população de Santa Catarina foi diferente das demais populações do Brasil. O teste de Mantel não suporta a hipótese de que a distância

genética é decorrente da distância geográfica entre as populações de *L. racemosa* da costa Leste Ocidental ($R^2 = 0.22$, $p = 0.11$).

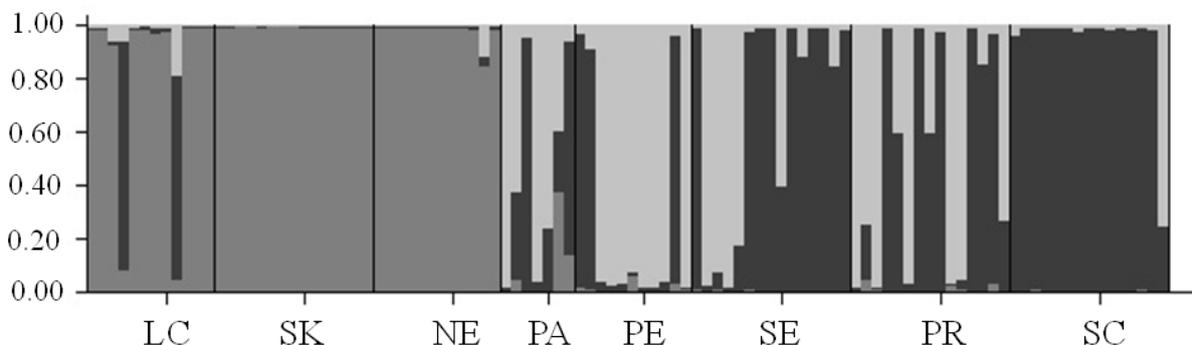


Figura 2 – Análise de agrupamento das populações de *L. racemosa* da costa Leste Ocidental (K = 3). Cada linha vertical representa um indivíduo e cada cor representa um agrupamento.

A análise de agrupamento dos indivíduos realizada por meio de inferência bayesiana e do método *ad hoc* descrito por Evanno *et al.* (2005) evidenciou que o número de agrupamentos (K) mais adequado para o grupo de dados genéticos analisados é 3. Nessa análise, as populações de Little Cockroach (Flórida) e do Caribe (Saint Kitts e Nevis) foram agrupadas como uma única população. Entretanto, LC possui dois indivíduos com genótipo alocado como similar aquele das populações brasileiras. Populações do Brasil (Pará, Pernambuco, Sergipe e Paraná) foram também alocadas como uma única população com a presença de indivíduos pertencentes ao grupo correspondente à população de Santa Catarina (Fig. 2).

A análise de coalescência das taxas de migração e tamanho efetivo populacional indicaram que existe migração entre diferentes populações de *L. racemosa* (Tab. 4). Foram encontradas as maiores taxas históricas de migração entre as populações do Brasil → Caribe, entre as populações do Caribe → Brasil, entre as populações de Santa Catarina → Caribe e Santa Catarina → Brasil, (Tab. 4; Fig. 3). Além disso, esta análise sugeriu alta variação do tamanho efetivo da populacional (Valor de Theta, θ), em que a população de Santa Catarina apresentou o maior valor ($\theta = 1.0815$, 95% HPD = 0.262 - 2.800), enquanto a população da Flórida apresentou o menor valor ($\theta = 0.2527$, 95% HPD = 0.000 - 1.667).

Tabela 4 – Médias e intervalo de confiança (25% - 95%) das taxas de migração entre as populações de *L. racemosa* ao longo da costa Leste Ocidental. FL = população da Flórida, CA = populações do Caribe, BR = populações do Brasil (exceto Santa Catarina), SC = população de Santa Catarina/Brasil.

	Taxa de Migração	
	Média	Intervalo de Confiança (%)
FL → CA	238.2	46.7 – 580.0
FL → BR	52.1	0.0 – 226.7
FL → SC	113.9	46.7 – 286.7
CA → FL	67.9	6.7 – 246.7
CA → BR	367.2	266.7 – 620.0
CA → SC	241.5	60.0 – 553.3
BR → FL	74.6	6.7 – 260.0
BR → CA	723.9	433.3 – 833.3
BR → SC	59.6	0.0 – 233.3
SC → FL	77.1	13.3 – 260.0
SC → CA	352.0	200.0 – 680.0
SC → BR	268.2	186.7 – 466.7

4.6 DISCUSSÃO

A metapopulação de *L. racemosa* da costa Leste Ocidental foi considerada geneticamente estruturada formando três e quatro grupos, de acordo com as análises de F_{ST} e Structure, respectivamente. Segundo a análise com o Structure, as populações da América do Norte e as populações do Caribe (LC, SK e NE) foram consideradas panmíticas, assim como as populações brasileiras do PA, PE, SE e PR; e por conseguinte a população de SC como uma terceira população estruturada. Outras espécies de manguezais da família Combretaceae, *Lumnitzera racemosa* Wild e *Lumnitzera littorea* (Jack.) Voigt, também apresentaram estruturação genética na região IWP. Os principais fatores responsáveis pela estruturação encontrada nessas duas espécies foram isolamento geográfico e a capacidade de dispersão (Su *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2007). Contudo, o teste de Mantel não suportou estruturação genética correlacionada com isolamento geográfico, ao contrário do esperado. Esse resultado sugere que outros fatores influenciam a estruturação observada entre as subpopulações. Segundo Hamrick *et al.* (1992), a distribuição atual da estrutura genética de populações é influenciada por fatores históricos, como isolamento

geográfico. Entretanto, fatores contemporâneos como correntes oceânicas e climatológicas (e.g. Pil *et al.*, 2011; Kennedy *et al.*, 2016, 2017; Francisco *et al.*, 2018) e características biológicas da espécie (Su *et al.*, 2006) também devem ser considerados.

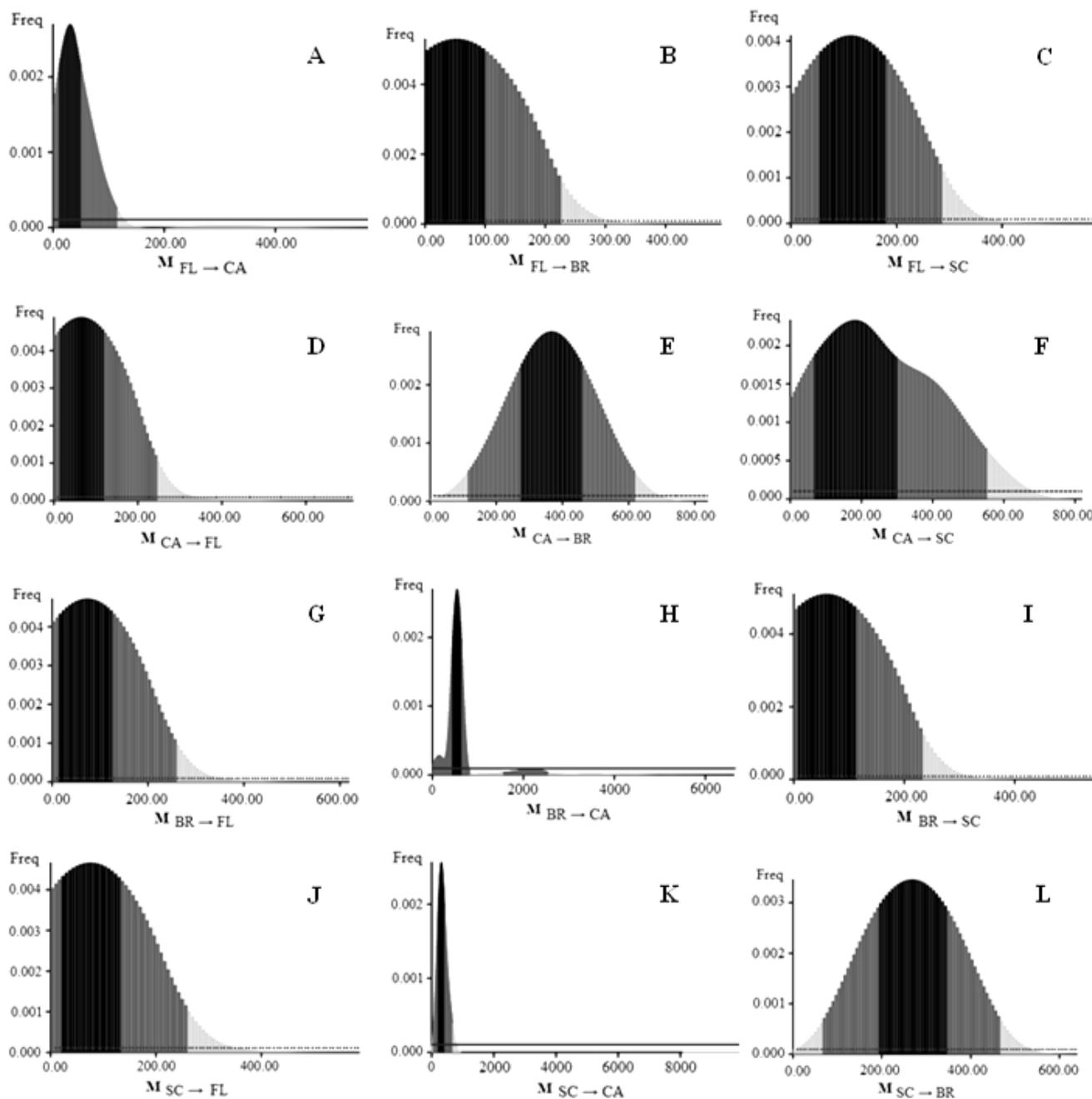


Figura 3 – Distribuição posterior (Freq) de todos os *loci* e fluxo gênico baseado em análise Bayesiana da população da Florida para: as populações do Caribe ($M_{FL \rightarrow CA}$, A), para as populações do Brasil, exceto Santa Catarina ($M_{FL \rightarrow BR}$, B) e para

a população de Santa Catarina (M FL → SC, C). Fluxo gênico das populações do Caribe para: população da Florida (M CA → FL, D); para as populações do Brasil, exceto Santa Catarina (M CA → BR, E) e para a população de Santa Catarina (M FL → SC, F). Fluxo gênico das populações do Brasil, exceto Santa Catarina para: população da Florida (M BR → FL, G); para as populações do Caribe (M BR → CA, H) e para a população de Santa Catarina (M BR → SC, I). Fluxo gênico da população de Santa Catarina para: população da Florida (M SC → FL, J); para as populações do Caribe (M SC → CA, K) e para as populações do Brasil, exceto Santa Catarina (M SC → BR, L). Escala de cinza indica, do mais claro ao mais escuro, distribuição em porcentagens do HPD (2.5%, 25%, 75% e 95%).

Estudos de estruturação populacional de espécies arbóreas de manguezais da região AEP indicaram que correntes climatológicas (Pil *et al.*, 2011), grandes correntes oceânicas (Mori *et al.*, 2015; Kennedy *et al.*, 2016) e capacidade de estabelecimento da espécie (Woodroffe and Grindrod, 1991) estão entre os fatores mais relevantes para esta região. Evidências de estruturação genética relacionadas à dispersão através de correntes oceânicas foram também observadas em outras espécies da região AEP, em *R. mangle* (Pil *et al.*, 2011; Takayama *et al.*, 2013; Cerón-Souza *et al.*, 2015; Hodel *et al.*, 2016; Francisco *et al.*, 2018), *A. schaueriana* (Mori *et al.*, 2015) e *A. germinans* (Nettel and Dodd, 2007; Cerón-Souza *et al.*, 2015; Mori *et al.*, 2015; Hodel *et al.*, 2016).

Laguncularia racemosa é a única representante de manguezais de Combretaceae com propágulos cripto-vivíparos, cuja germinação ocorre ainda na planta mãe, mas o embrião permanece no interior do fruto. Os propágulos de *L. racemosa* podem sobreviver por tempo relativamente longo em água salgada e por serem pequenos e leves, são facilmente carregados por correntes oceânicas e climáticas (Tomlinson, 1986).

A estruturação populacional observada no presente estudo corrobora com a direção de correntes oceânicas da costa Leste Ocidental. A corrente oceânica Sul Equatorial tem origem na África e atinge a costa do Brasil próximo aos estados do Pará e Maranhão. Esta, ao chegar à costa brasileira se divide em duas correntes, com sentidos opostos: uma corrente sentido norte (Corrente das Guianas) e outra

sentido sul (Corrente do Brasil; Stramma and England, 1999). A separação da corrente das Guianas e do Brasil é apontada como o principal responsável pelo movimento de dispersão de propágulos entre as regiões Norte e Sul. Nesse cenário, os propágulos de *L. racemosa* são provavelmente carregados no sentido norte pela corrente das Guianas e sentido sul pela corrente do Brasil. Esse padrão oceanográfico corrobora parcialmente, portanto, com a estruturação e padrões de migração observados nas populações de *L. racemosa* da América do Norte e Central e nas populações do Brasil. Exceção para a população de Santa Catarina, onde o padrão de migração ocorreu no sentido contrário, sul-norte. Na região de Santa Catarina as grandes correntes oceânicas correm sentido Norte-Sul. Entretanto, segundo “Atlantic Oceanographic and Meteorological Laboratory” (www.aoml.noaa.gov), as correntes climatológicas vão ao sentido contrário, na direção sul-norte. Dessa forma, os propágulos podem fazer o movimento contrário, indo no sentido sul-norte levados pelos ventos, o que explica do padrão observado na população de Santa Catarina.

Outro fator relevante à estruturação populacional de espécies marinhas da região AEP são as correntes climatológicas (Pil *et al.*, 2011), as quais são resultantes da interação entre correntes oceânicas e a direção dos ventos prevalentes. Os propágulos por serem leves são potencialmente dispersos a longas distâncias por correntes oceânicas. Quando próximos à costa, são também influenciados pela movimentação das correntes climatológicas. Devido às oscilações dos ventos e aos fluxos locais e regionais, as correntes climatológicas mudam de direção em diferentes épocas do ano (Mori *et al.*, 2015). Logo, a dispersão dos propágulos é influenciada pelo padrão de deslocamento de água da temporada, gerando dispersão em diferentes sentidos ao longo do ano. A variação do padrão de deslocamento é consistente com o alto fluxo gênico postulado entre as populações de PA, PE, SE e PR, gerando uma grande população panmítica nesse trecho costeiro Leste Ocidental.

Mais ao sul, a população de SC foi considerada como uma população distinta, tanto pelo valor de F_{ST} como pela análise do Structure, apesar da sua proximidade espacial às populações do PR. Existe outro caso reconhecido de estruturação entre populações de árvores de manguezais espacialmente próximas no litoral brasileiro. Duas populações de *A. germinans*, apesar de próximas espacialmente, são

geneticamente distintas em manguezais de Bragança/PA (Mori *et al.* 2015). Segundo esse estudo, as correntes locais compreendem um importante papel na distribuição da diversidade genética dessa espécie; as marés de baixa frequência agem como uma importante barreira de dispersão. Igualmente, Lira-Medeiros *et al.* (2015) postularam diferenciação genética moderada entre populações de *A. schaueriana* em dois manguezais geograficamente próximos, mas sob condições ambientais distintas (*salt marsh* e *riverine*). Consequentemente, existem evidências de que correntes locais podem influenciar a estrutura e diversidade genética mesmo em pequenas escalas (Mori *et al.*, 2015).

Os resultados de diversidade genética foram distintos dos observados pelos testes de estruturação, pois a diversidade genética foi heterogeneamente distribuída ao longo das populações da costa Leste Ocidental. Os menores valores de diversidade genética foram observados tanto em populações tropicais (SK, NE e SE), quanto em populações subtropicais (FL, PR e SC), devido baixo número de alelos (1 e 4) e baixa diversidade genotípica ($H = 0.00$ a $H = 0.16$). Similarmente, baixo número de alelos (2 a 4) foram encontrados no estudo de Nettel *et al.* (2008), para cinco populações de *L. racemosa* da costa do Pacífico (México e Costa Rica). Lira-Medeiros *et al.* (2015) observaram alto polimorfismo em marcadores dominantes AFLP e baixa diversidade genética (0.32 a 0.35) em duas populações de *L. racemosa* expostas a maior e menor salinidade na Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. Padrões semelhantes de baixa diversidade genotípica têm sido descritos em regiões tropicais e subtropicais para outras espécies arbóreas de manguezais da costa Leste Ocidental. Populações de *R. mangle* da Florida ($H_o = 0.31$, Kennedy *et al.*, 2017), do Caribe ($H_o = 0.31$, Cerón-Souza *et al.*, 2012) e no nordeste e sul do Brasil [variando entre: $H_o = 0.00$ em Santa Catarina a $H_o = 0.16$ no Sergipe (Pil *et al.*, 2011)] também apresentaram diversidades genéticas baixas.

A maior diversidade genotípica de *L. racemosa* foi observada nas populações localizadas na região equatorial, nas populações de PA e PE ($H = 0.67$ e $H = 0.45$, respectivamente). Padrões semelhantes ao encontrado no presente estudo foram descritos por Cerón-Souza *et al.* (2012) em populações de *Avicennia germinans* no Caribe ($H_e = 0.73$) e de *R. mangle* na costa Pacífica do Panamá ($H_e = 0.65$). Apesar da baixa diversidade encontrada em populações brasileiras de *R. mangle* por Pil *et al.* (2011), as populações equatoriais do Pará e Maranhão apresentaram valores de

H_0 significativamente mais elevados que as populações localizadas mais ao sul do Brasil ($H_0 = 0.35$ e $H_0 = 0.28$, Pará e Maranhão, respectivamente).

Segundo Pil *et al.* (2011), as maiores diversidades de populações de *R. mangle* encontradas na região do Pará e Maranhão podem estar relacionadas às mudanças climáticas dos últimos milhares de anos. Desde o pleistoceno ocorreram oscilações climáticas globais, caracterizadas por glaciações que consistiram de resfriamentos e aquecimentos (Hewitt, 2004), sendo a última glaciação máxima relatada cerca de 18.000 a 22.000 anos atrás (Hewitt, 2000; Yokoyama *et al.*, 2001). Durante estas oscilações, as plataformas polares se expandiram consideravelmente. As latitudes mais altas foram cobertas por gelo ou *permafrost*. Já os ecossistemas terrestres e marinhos de regiões tropicais ficaram restritos a regiões equatoriais. Tais mudanças climáticas acarretaram em grandes alterações na distribuição de espécies e populações, com extinções locais em latitudes maiores e prevalência de espécies em refúgios próximos à linha equatorial (Bennet, 1997; Williams *et al.*, 1998; Hewitt, 2001, 2004).

Os manguezais por possuírem a sua distribuição limitada principalmente por temperatura e latitude (Tomlinson, 1986), ficaram restritos a regiões equatoriais durante a última glaciação. Isso sugere que as populações localizadas próximo ao equador prevaleceram nestes refúgios. Dessa forma, há indícios de que as populações equatoriais de *L. racemosa* de PA e PE são mais antigas, o que pode ter possibilitado maior tempo para diversificação e conseqüente maior diversidade genética de *L. racemosa* nas populações equatoriais. Outra hipótese está relacionada às extinções locais em regiões tropicais, que após o final da última glaciação acabaram sendo recolonizadas por populações remanescentes dos refúgios equatoriais, revelando o efeito fundador, como já proposto por outros autores (Pil *et al.*, 2011; Cerón-Souza *et al.*, 2015; Kennedy *et al.*, 2016).

Posteriormente, ao final do último período glacial, parte das linhagens descendentes de populações conservadas nos refúgios glaciais equatoriais teve a oportunidade de dispersar em direção às regiões tropicais e subtropicais. Uma vez que o aumento gradativo da temperatura possibilitou condições mais favoráveis para o seu desenvolvimento. Este fato corrobora com a diminuição progressiva da diversidade genética com aumento da latitude (Triest, 2008), observado nas populações subtropicais brasileiras, com diversidade de $H = 0.09$ e $H = 0.01$, para

PR e SC, respectivamente. Pil *et al.* (2011) observaram que as populações do sul do Brasil são mais recentes, resultado de eventos fundadores sucessivos juntamente com dispersão no modelo *stepping-stone* subsequente ao final da última glaciação.

O mesmo padrão para o Brasil não foi observado nas populações de *L. racemosa* nas Américas Central e Norte, com diversidade genética maior na Florida ($H = 0.16$) e menor nas ilhas do Caribe ($H = 0.01$ e 0.00 , SK e NE, respectivamente). Há indícios de que a região do Caribe também tenha atuado como refúgio durante o último período glacial. Geralmente, os refúgios glaciais apresentam maior diversidade do que áreas colonizadas após a última glaciação (Hewitt, 2000). Entretanto, Kennedy *et al.* (2016) não encontraram relação significativa da diminuição da diversidade genética com aumento da latitude em populações de *R. mangle* da Flórida e Caribe. Neste estudo, foi observada alta diversidade genética de *R. mangle* em latitudes de 23°N nas Bahamas e 27°N na Flórida. Contudo, há indícios de que a maior diversidade em baixas latitudes esteja relacionada a manguezais continentais, o que corrobora com a maior diversidade encontrada em *L. racemosa* na Florida. Uma das explicações potenciais para a baixa diversidade encontrada nas populações de *L. racemosa* nas ilhas do Caribe se relacionam ao tamanho das florestas de manguezais. Segundo Frankham *et al.* (2002), populações de ilhas geralmente possuem menor diversidade genética devido à limitação espacial, a qual parece reduzir o acúmulo de diversidade genética. A área continental do Caribe e Florida são maiores que as Ilhas do Caribe, o que gera potencial para maior diversidade genética, mesmo estando localizadas em latitudes maiores.

O presente estudo revelou que a diversidade genética e a estruturação populacional de *L. racemosa* da costa Leste Ocidental assemelham-se ao padrão encontrado para outras espécies da região. Apesar das espécies de manguezais da região AEP possuírem estruturas morfológicas, fisiológicas, estratégias e padrões distintos de história de vida, a ação de eventos históricos e recentes são responsáveis por promover padrões convergentes de estrutura e diversidade genética em diferentes linhagens de manguezais.

4.7 AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer à Maria Wihelmina Pil pela amostras, à Coordenação a Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos para o primeiro autor e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq) pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa para M.R.T.B. e W.A.B.

4.8 REFERÊNCIAS

- Alongi, D.M., 2009. **The energetics of mangrove forests**. Springer Science and Business, New York.
- Barbier , E. B., Hacker, S. D., Kennedy, C., Koch E.W., Stier, A.C., Silliman, B.R., 2011. The value of estuarine and coastal ecosystem services. **Ecological Monographs**, 81:169–193.
- Beerli, P., 2006. Comparison of Bayesian and maximum likelihood inference of population genetic parameters. **Bioinformatics**, 22(3):341–345.
- Beerli, P., 2009. How to use migrate or why are markov chain monte carlo programs difficult to use? In Bertorelle, G.; Bruford, M. W. ; Hauffe, H. C. ; Rizzoli, A. & C. Vernesi. 2009. **Population genetics for animal conservation**. Conservation Biology. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 42–79 p.
- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W., Courchamp, F., 2012. Impacts of climate change on the future of biodiversity. **Ecology Letters**, 15:365–377.
- Bennett, K. 1997. **Evolution and ecology: the pace of life**. Cambridge University Press.
- Cerón-Souza , I., Bermingham, E., McMillan, W.O., Jones, F.A., 2012 .Comparative genetic structure of two mangrove species in Caribbean and Pacific estuaries of Panama. **BMC Evolutionary Biology**, 12:205.
- Cerón-Souza, I., Gonzalez, E.G., Schwarzbach, A.E., Salas-Leiva, D.E., Rivera-Ocasio, E., Toro-Perea, N., Bermingham, E., McMillan, W.O., 2015.

- Contrasting demographic history and gene flow patterns of two mangrove species on either side of the Central American Isthmus. **Ecology and Evolution**, 5(16):3486-3499.
- Cerón-Souza, I., Rivera-Ocasio, E., Medina, E., Jiménez, J.A., McMillan, W.O., Bermingham, E., 2010. Hybridization and introgression in New World red mangroves, *Rhizophora* (Rhizophoraceae). **American Journal of Botany**, 97: 945–957.
- Chen, I.C., Hill, J.K., Ohlemüller, R., Roy, D.B., Thomas, C.D. 2011. Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. **Science**, 333:1024–1026.
- Clarke, P. J., Kerrigan, R.A., Westphal, C.J., 2001. Dispersal potential and early growth in 14 tropical mangroves: do early life history traits correlate with patterns of adult distribution? **Journal of Ecology**, 89:648–659.
- Dodd, R.S., Rafii, Z.A., 2002. Evolutionary genetics of mangroves: continental drift to recent climate change. **Trees** 16:80–86.
- Duke N.C., Ball, M.C., Ellison, J.C., 1998. Factors influencing biodiversity and distributional gradients in mangroves. **Global Ecology and Biogeography Letters**, 7:27–47.
- Duke, N.C., Lo, E.Y.Y., Sun, M., 2002. Global distribution and genetic discontinuities of mangroves – emerging patterns in the evolution of *Rhizophora*. **Trees**, 16:65–79.
- Earl, D.A., vonHoldt, B.M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, 4(2):359–361.
- Ellison, A.M., Farnsworth, E.J., Merkt, E. 1999. Origins of mangrove ecosystems and the mangrove biodiversity anomaly. **Global Ecology and Biogeography**, 8:95–115.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, 14(8):2611–2620.

- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, 10(3):564–567.
- Francisco, P.M., Mori, G.M., Alves, F.M., Tambarussi, E., Souza, A.P., 2018. Population genetic structure, introgression, and hybridization in the genus *Rhizophora* along the Brazilian coast. **Ecology and Evolution**, 00:1–14.
- Frankham, R., 2005. Genetics and extinction. **Biological conservation**, 126:131–140.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., 2002. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2004. **A primer of conservation genetics**. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Giri, C., Ochieng, E., Tieszen, L.L., Zhu, Z., Singh, A., Loveland, T., Masek, J., Duke, N., 2011. Status and distribution of mangrove forests os the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, 20(1):154–159.
- Google . 2017. Google Earth Pro. Google, Mountain View, California, USA. Website: <https://www.google.com/earth/>.
- Goudet, J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., Sherman-Broyles, S., 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forests**, 6:95–124.
- Hewitt, G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. **Nature**, 405:908–913.
- Hewitt, G., 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 359:183–195.
- Hewitt, G., 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. **Molecular Ecology**, 10(3):537–549.

- Hodel, R.G.J., Corteza, M.B.S., Soltis, P.S., Soltis, D.E., 2016. Comparative phylogeography of black mangroves (*Avicennia germinans*) and red mangroves (*Rhizophora mangle*) in Florida: Testing the maritime discontinuity in coastal plants. **American Journal of Botany**, 103(4):1–10.
- Hogarth, P.J., 1999. **The biology of mangroves**. Oxford University Press Inc., New York, 2-9 pp.
- Kathiresan, K., Bingham, B.L., 2001. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, 40:81–251.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, 28(12):1647–1649.
- Kennedy, J.P., Garavelli, L., Truelove, N.K., Devlin, D.J., Box, S.J., Chérubin, L.M., Feller, I.C., 2017. Contrasting genetic effects of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) range expansion along West and East Florida. **Journal of Biogeography**, 44:335–347.
- Kennedy, J.P., Pil, M.W., Proffitt, C.E., Boeger, W.A., Stanford, A.M., Devlin, D.J., 2016. Postglacial expansion pathways of red mangrove, *Rhizophora mangle*, in the Caribbean Basin and Florida. **American Journal of Botany**, 103(2): 260–276.
- Lira-Medeiros, C.F., Cardoso, M.A., Fernandes, R. A., Ferreira, P.C.G., 2015. Analysis of genetic diversity of two mangrove species with morphological alterations in a natural environment. **Diversity**, 7:105–117.
- Lo, E.Y.Y., Duke, N.C., Sun, M., 2014. Phylogeographic pattern of *Rhizophora* (Rhizophoraceae) reveals the importance of both vicariance and long-distance oceanic dispersal to modern mangrove distribution. **BMC Evolutionary Biology**, 14(83):1–15.
- Luther, D.A., Greenberg, R., 2009. Mangroves: a global perspective on the evolution and conservation of their terrestrial vertebrates. **BioScience**, 59(7):602–612.

- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, 27:209–220.
- Mori, G.M., Zucchi, M.I., Souza, A.P., 2015. Multiple-Geographic-Scale Genetic Structure of Two Mangrove Tree Species: The Roles of Mating System, Hybridization, Limited Dispersal and Extrinsic Factors. **PLoS ONE**, 10(2):1–23.
- Narum, S.R., 2006. Beyond Bonferroni: Less conservative analyses for conservation genetics. **Conservation Genetics**, 7(5):783–787.
- Nettel, A., Dodd, R., 2007. Drifting propagules and receding swamps: genetic footprints of mangrove recolonization and dispersal along tropical coasts. *Evolution*, 61: 958-971.
- Nettel, A., Dodd, R.S., Cid-Becerra, J.A., Rosa-Velez, J.D.L., 2008. Development of microsatellite markers for the White mangrove (*Laguncularia racemosa* C.F. Gaertn., Combretaceae). **Conservation Genetics**, 9:1037.
- Pil, M. W., Boeger, M.R.T., Muschner, V.C., Pie, M.R., Ostrensky, A., Boeger, W.A., 2011. Postglacial north–south expansion of populations of *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) along the Brazilian coast revealed by microsatellite analysis. **American Journal of Botany**, 98(6):1031–1039.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155:945–959.
- Sandoval-Castro, E., Muñiz-Salazar, R., Enríquez-Paredes, L.M., Riosmena-Rodríguez, R., Dodd, R.S., Tovilla-Hernández, S., Arredondo-García, M.C., 2012. Genetic population structure of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) along the northwestern coast of Mexico. **Aquatic Botany**, 99:20–26.
- Spalding, M.; Kainuma, M., Collins, L., 2010. **World Atlas of Mangroves**. Earthscan, London/Washington, DC.
- Stramma, L., England, M., 1999. On the water masses and mean circulation of the South Atlantic Ocean. **Journal of Geophysical Research**, 104(C9):20863–20883.

- Su, G., Huang, Y., Tan, F., Ni, X., Tang, T., Shi, S., 2007. Conservation genetics of *Lumnitzera littorea* (Combretaceae), an endangered mangrove, from the Indo-West Pacific. **Marine Biology**, 150:321–328.
- Su, G., Huang, Y., Tan, F., Ni, X., Tang, T., Shi, S. 2006. Genetic variation in *Lumnitzera racemosa*, a mangrove species from the Indo-West Pacific. **Aquatic Botany**, 84:341–346.
- Takayama, K., Tamura, M., Tateishi, Y., Webb, E.L., Kajita, T., 2013. Strong genetic structure over the American continents and transoceanic dispersal in the mangrove genus *Rhizophora* (Rhizophoraceae) revealed by broad-scale nuclear and chloroplast DNA analysis. **American Journal of Botany**, 100(6):1191–1201.
- Tomlinson, P.B., 1986. **The botany of mangroves**. Cambridge University Press, Cambridge. 411-415 pp.
- Triest, L., 2008. Molecular ecology and biogeography of mangrove trees towards conceptual insights on gene flow and barriers: A review. **Aquatic Botany**, 89:138–154.
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, 4:535–538.
- Williams, S.L., Orth, R.J., 1998. Genetic diversity and structure of natural and transplanted eelgrass populations in the Chesapeake and Chincoteague Bays. **Estuaries**, 21:118–128.
- Woodroffe, C.D., Grindrod, J., 1991. Mangrove biogeography: the role of Quaternary environmental and sea-level change. **Journal of Biogeography**, 18: 479–492.
- Yokoyama, Y., De Deckker, P., Lambeck, K., Johnston, P., Fifield, L.K., 2001. Sea level at the Last Glacial Maximum: Evidence from northwestern Australia to constrain ice volumes for oxygen isotope stage 2. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, 165:281–297.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As comunidades arbóreas que constituem os manguezais estão submetidas a condições ambientais limitantes (Spalding *et al.*, 2010). Consequentemente apresentam estratégias morfológicas e fisiológicas para se desenvolverem em condições de estresse (Gilman *et al.*, 2008). Suas espécies compreendem diferentes linhagens com características morfológicas e fisiológicas comuns, as quais permitem sobreviver na transição entre o ambiente terrestre e marinho (Schwarzbach & Ricklefs, 2001; Alongi, 2009; Giri *et al.*, 2010; Mori *et al.*, 2015).

O regime das marés gera variações de salinidade, solo inconsolidado, alagado e com baixa concentração de nutrientes, constituindo um nicho ecológico considerado severo (Parida & Jha, 2010). Uma vez que a esclerofilia é definida como uma resposta não específica a ambientes estressantes (Read & Sanson, 2003), as espécies podem apresentar folhas esclerófilas como reflexo das condições encontradas nos manguezais. Evidências anteriores ao presente estudo indicaram que as espécies arbóreas de manguezais são esclerófilas em diferentes níveis (Sereneski-Lima *et al.*, 2013). A esclerofilia é uma estratégia importante para o desenvolvimento neste ambiente e as espécies respondem de maneira distinta a estas condições. Dessa forma, o **Capítulo I** estabeleceu, a nível local, o grau de esclerofilia de *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle* e como as espécies respondem as distintas condições edáficas e de salinidade, em padrões morfológicos e nutrientes foliares, em duas zonas de manguezais (borda e interior). A borda apresentou maior concentração de carbono, matéria orgânica, maior razão C:P, salinidade da água intersticial e predomínio de areia. A área específica foliar (AEF) revelou que as três espécies possuem folhas esclerófilas em diferentes graus. A espécie mais esclerófila foi *L. racemosa*, seguida de *R. mangle* e *A. schaueriana*. *Avicennia schaueriana* apresentou folhas mais esclerófilas na borda, enquanto que *R. mangle* apresentou folhas mais esclerófilas no interior e *L. racemosa* manteve folhas com valor de AFE semelhantes entre as zonas.

As três espécies estão submetidas sobre as mesmas condições ambientais na borda, assim como no interior dos manguezais. Entretanto, o estudo revelou que o fator intrínseco de cada espécie é importante para o grau de esclerofilia. Dessa

forma, não se pode inferir um padrão geral para a esclerofilia em manguezais. Assim como, também não se pode afirmar qual a variável ambiental é o fator chave que influencia em maior ou menor o grau de esclerofilia. A esclerofilia é uma estratégia utilizada de maneira distinta por cada espécie, para amenizar as condições ambientais limitantes dos manguezais. Cada espécie em conjunto com o mosaico complexo de condições ambientais são determinantes na esclerofilia em manguezais subtropicais.

Uma das propostas iniciais desse estudo foi avaliar a importância da esclerofilia como atributo que permitiu a colonização dos manguezais, e ainda, se a esclerofilia foi precedente ou não a colonização dos manguezais. Entretanto, devido à dependência de dados secundários disponíveis na literatura, não foi possível identificar o momento em que as folhas esclerófilas surgiram nas linhagens de manguezais. Devido à carência de informações sobre a esclerofilia de espécies de manguezais e de grupos filogeneticamente relacionados, não foi possível identificar a origem da esclerofilia em manguezais. Dessa forma, estudos que avaliem este atributo se fazem necessários para preencher esta lacuna do conhecimento, que apesar de muito importante ainda é pouco explorado. A esclerofilia está entre as principais estratégias para auxiliar na tolerância ao estresse do ambiente. Ainda é fator relevante no processo histórico e evolutivo de distribuição e colonização das famílias, espécies e populações de manguezais.

Acanthaceae, Combretaceae e Rhizophoraceae estão entre as famílias mais representativas nos manguezais. As arbóreas exclusivas de manguezais são altamente especializadas às condições desse ambiente, compartilhando distintos mecanismos morfológicos, fisiológicos e reprodutivos. Apesar de estratégias semelhantes, as plantas de manguezais compreendem um grupo heterogêneo de linhagens filogeneticamente distintas. O **Capítulo II** investigou a origem de caracteres chave considerados originalmente como adaptativos em manguezais. O protocolo de reconstrução de caracteres ancestrais permitiu avaliar se as características são realmente adaptativas ou se ocorreram por processos de *ecological fitting*.

Muitas espécies dentro das principais famílias de representantes de manguezais ainda são pouco exploradas. Logo, a reconstruções dos caracteres ancestrais foi ajustada devido à limitação do número de espécies e informações

disponíveis sobre as mesmas. A reconstrução de caracteres ancestrais evidenciou que as raízes aéreas e a viviparidade em Acanthaceae e Combretaceae representam atributos adaptativos. Adicionalmente, a presença de folhas anfiestomáticas em Combretaceae também representam adaptações putativas. Contudo, houve evidências de que raiz aérea foi um atributo que precede a colonização dos manguezais em espécies de Rhizophoraceae. Para as glândulas de sal em Acanthaceae e Combretaceae foram encontrados indícios de exaptação, e para o porte arbóreo em Acanthaceae evidência de plasticidade fenotípica.

O sucesso, estabelecimento e desenvolvimento das espécies arbóreas nos manguezais ocorreram de maneira distinta nas linhagens de Acanthaceae, Combretaceae e Rhizophoraceae, por um mosaico ecológico e de processos evolutivos. Representados por adaptações a pressão seletiva (i.e. convergência evolutiva), mas também por processos de *ecological fitting* (conservatismo filogenético, plasticidade fenotípica e exaptação). As estratégias importantes para a colonização dos manguezais caracterizam a capacidade inerente de espécies e/ou linhagem. Contudo, as oportunidades das espécies em colonizar novos ambientes, juntamente com eventos históricos, resultam nos padrões filogeográficos observados atualmente.

O padrão de distribuição genética e processos históricos de colonização de *Laguncularia racemosa* (Combretaceae) ainda são pouco conhecidos, ao contrário de outras espécies já muito exploradas (e.g. *Rhizophora*, *Avicennia*). *Laguncularia racemosa* está entre as oito espécies de arbóreas que compõe os manguezais da região da costa Leste Ocidental. Essa espécie tem sua distribuição nas Américas, Caribe e costa ocidental da África. Com o objetivo de compreender como processos históricos, alterações climáticas e oceanográficas influenciaram os padrões filogeográficos de *L. racemosa*, o **Capítulo III** revelou, a nível regional, a estrutura genética de populações atuais de *L. racemosa*. Sete regiões de microssatélites nucleares foram utilizadas para genotipar 103 indivíduos de oito populações de *L. racemosa*.

As populações de *L. racemosa* da costa Leste Ocidental foram consideradas geneticamente estruturadas, formando quatro populações panmíticas (Flórida, Caribe, Brasil – exceto Santa Catarina e Santa Catarina). Há evidências de que os padrões de estruturação genética observados são resultado da influência de

correntes oceânicas e climatológicas. Os resultados revelaram baixa variabilidade genética nas regiões tropicais e subtropicais e maior diversidade nas populações equatoriais. Tais diferenças estão possivelmente relacionadas à última glaciação, quando a formação de refúgios na região equatorial permitiu uma maior diversidade genética nestas populações. Já a menor diversidade observada nas regiões tropicais e subtropicais esteja relacionada a essas populações serem mais recentes, resultado da colonização posterior ao aquecimento após a última glaciação.

No presente estudo, os padrões ecológicos, processos históricos, evolutivos e de colonização de espécies arbóreas de manguezais foram abordados em diferentes níveis. Apesar de muito exploradas, as dinâmicas envolvendo os manguezais ainda não foram totalmente elucidadas, principalmente devido a gama ecológica complexa. Os resultados permitiram ampliar a compreensão acerca de processos ecológicos e evolutivos no ecossistema, sendo essenciais para melhor entendimento das dinâmicas que geram a biodiversidade, para a realização de predições de processos evolutivos e desenvolvimento de estratégias de conservação de manguezais.

REFERÊNCIAS

ALONGI, D.M. 2009. **The energetics of mangrove forests**. Springer Science and Business, New York.

GILMAN, E.L.; ELLISON, J.; DUKE, N.C.; FIELD, C. 2008. Threats to mangroves from climate change and adaptation options. **Aquatic Botany**, v. 89, p. 237–250.

GIRI, C.; OCHIENG, E.; TIESZEN, L.L.; ZHU, Z.; SINGH, A.; LOVELAND, T.; MASEK, J.; DUKE, N. 2010. Status and distribution of mangrove forests os the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeograpfy**, v. 20, n. 1, p. 154–159.

MORI, G.M.; ZUCCHI, M.I. & SOUZ, A.P. 2015. Multiple-Geographic-Scale Genetic Structure of Two Mangrove Tree Species: The Roles of Mating System, Hybridization, Limited Dispersal and Extrinsic Factors. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1-23.

PARIDA, A.K.; JHA, B. 2010. Salt tolerance mechanisms in mangroves: a review. **Trees**, 24:199–217.

READ, J.; SANSON, G.D. 2003. Characterizing sclerophylly: the mechanical properties of a diverse range of leaf types. **The Phytologist**, v. 160, p. 81–99.

SCHWARZBACH, A.E.; RICKLEFS, R.E. 2000. Systematic affinities of Rhizophoraceae and Anisophylleaceae, and intergeneric relationships within Rhizophoraceae, based on chloroplast DNA, nuclear ribosomal DNA, and morphology. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 4, p. 547–564.

SERENESKI-LIMA, C.; BOEGER, M.R.T.; CARVALHO, L.L.; PELOZO, A.; SOFFIATTI, P. 2013. Sclerophylly in mangrove tree species from South Brazil. **Revista Mexicana de Biodiversiversidad**, v. 84, n. 1159–1166.

SPALDING, M.; KAINUMA, M. & COLLINS, L. 2010. **World Atlas of Mangroves**. Earthscan, London/Washington, DC. 5-14 pp.