

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

**POLIPLOIDIA EM POPULAÇÕES DE BIRIBÁS (*Annona mucosa*  
JACQ.) NA AMAZÔNIA**

**GIULIA MELILLI SERBIN**

Manaus, Amazonas  
Dezembro, 2021

**GIULIA MELILLI SERBIN**

**POLIPLOIDIA EM POPULAÇÕES DE BIRIBÁS (*Annona mucosa*  
JACQ.) NA AMAZÔNIA**

Dr. Charles R. Clement  
Dr. Diego Sotero de Barros Pinangé

Dissertação apresentada ao Instituto  
Nacional de Pesquisas da Amazônia,  
como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em  
Botânica.

Manaus, Amazonas  
Dezembro, 2021



DIVISÃO DO CURSO  
DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BOTÂNICA

UNIDADE DE PESQUISA DO

MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



ATA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO  
DE Mestrado DISCENTE DO PROGRAMA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS (BOTÂNICA) DO INSTITUTO  
NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA.

Aos três dias do mês de dezembro de 2021 às 9horas, no ambiente virtual Google Meet, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Dr. Alberto Vicentini- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Dra. Priscila Ambrósio Moreira- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), e Dra. Eliana Regina Forni Martins- Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tendo como suplentes os seguintes membros: Dr. Michael John Gilbert Hopkins- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), e Dra. Eliana Feldberg- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, intitulada: "POLIPLOIDIA EM POPULAÇÕES DE BIRIBÁ (ANNONA MUCOSA JACQ.) NA AMAZÔNIA" da discente: **Giulia Melilli Serbin**, sob orientação: do professor Dr. Charles Roland Clement, e coorientação: Dr. Diego Sotero de Barros Pinangé. Após a exposição, dentro do tempo regulamentar, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final:

EXAMINADORES	PARECER	ASSINATURA
ALBERTO VICENTINI	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO <input type="checkbox"/> REPROVADO	
PRISCILA AMBRÓSIO MOREIRA	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO <input type="checkbox"/> REPROVADO	
ELIANA REGINA FORNI MARTINS	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO <input type="checkbox"/> REPROVADO	
MICHAEL JOHN GILBERT HOPKINS	<input type="checkbox"/> APROVADO <input type="checkbox"/> REPROVADO	

Manaus (AM), 3 de dezembro de 2021.

OBS: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

## Catalogação na Publicação (CIP-Brasil)

S482p Serbin, Giulia Melilli

Poliploidia em Populações de Biribás (*Annona Mucosa* Jacq.) na Amazônia / Giulia Melilli Serbin ; orientador Charles Roland Clement; coorientador Diego Sotero de Barros Pinangé. - Manaus:[s. l.], 2021.

1.3 MB

44 p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em Botânica.) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2021.

1. Evolução cromossômica. 2. Biribá. I. Clement, Charles Roland. II. Pinangé, Diego Sotero de Barros. III. Título

CDD 634.95

**Sinopse:** O presente estudo analisou a variação fenotípica encontrada em indivíduos domesticados de biribá (*Annona mucosa*) na Amazônia brasileira assim como a relação da domesticação com a poliploida presente na espécie.

*Amazônia e todos os seus seres.*

*Ao meu pai,*

*Dedico*

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha família que sempre me apoiou e me incentivou a nunca desistir dos meus sonhos. A minha mãe Giovanna Lo Monaco Melilli Serbin, que é meu grande exemplo de vida. A minha irmã Martina Melilli Serbin, que me ensina o que é superação todos os dias com o seu modo de viver. Ao meu pai Sergei Marçal Serbin, que mesmo não estando mais no nosso plano, foi e sempre será meu grande tutor na ciência e na vida. Ao meu companheiro Wynn Di Ponzio, que nesse último ano esteve ao meu lado.

A minha primeira orientadora, Dra. Eliana Regina Forni Martins, que desde o começo da graduação acreditou em mim e me ajudou até o final na academia. Ela me ensinou e me acompanhou nos primeiros passos acadêmicos. Ao Dr. Rafael Barbosa Pinto, que com dedicação me deu uma oportunidade para trabalhar com os Jatobás e a minha primeira visita à floresta Amazônica. A Dra. Raquel Moura Machado, que desde o começo da minha graduação me incentivou e guiou dentro da ciência. Qualquer hora era uma boa hora para fazer perguntas e discutir questões científicas. Raquel, seus elogios foram fundamentais para meu desempenho no laboratório.

Ao meu orientador de mestrado Dr. Charles R. Clement, por toda paciência e dedicação. Aprendi, ou estou aprendendo a ser mais clara na escrita. Mesmo com a pandemia não deixou de responder um e-mail e, o mais importante, me ensinou a buscar as respostas das minhas perguntas. Ao meu coorientador Dr. Diego Sotero de Barros Pinangé, que me ensinou a colocar os pés no chão. Se tivéssemos tempo e dinheiro teríamos reinventado a citogenética amazônica, mas com foco conseguimos atingir nossos objetivos.

Ao Dr. Santelmo Vasconcelos e o Instituto Tecnológico Vale, pela realização das análises de citometria de fluxo. Ao Dr. Bruno Sampaio Amorim, por todo auxílio nas análises filogenéticas e pelo apoio a novas ideias no projeto.

A banca avaliadora titular e suplente, Dra. Eliana Regina Forni Martins, Dr. Alberto Vicentini e Dra. Priscila Ambrósio Moreira, Dra. Eliana Feldberg e Dr. Michael John Gilbert Hopkins pela disponibilidade e sugestões ao trabalho.

As agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado (processo 88882.444398/2019-01). A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento do projeto universal “Relações entre pessoas, plantas e paisagens no Amazonas sob uma ótica interdisciplinar” no qual o trabalho se inclui (processo 062.00148/2020). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade do Dr. Charles R. Clement (processo 303477/2018-0), que financiou as atividades de campo.

Aos meus amigos por terem me ajudado e me aturado durante os momentos alegres e tristes. Aqueles que sempre me incentivaram e perguntaram sobre minha pesquisa, e tiveram um pouquinho do seu tempo para me dizerem que tudo daria certo.

## Poliploidia em populações de biribás (*Annona mucosa* Jacq.) na Amazônia

### Resumo

A duplicação total do genoma é um evento importante nas angiospermas e em plantas cultivadas, especialmente nas domesticadas; entretanto, a poliploidia tem sido pouco estudada na região Amazônica, onde existem numerosos cultivos domesticados. O biribá (*Annona mucosa* Jacq.) é uma árvore frutífera que tem sido domesticada desde o período pré-colombiano e apresenta populações poliploides bem como uma ampla variação fenotípica nas características do fruto, desde variabilidade no peso (100 g á 4 kg), até diferenças morfológicas, como nas saliências carpelares. São registrados dois citótipos na literatura ( $2n = 4x = 28$  e  $2n = 6x = 42$ ) e os registros do tamanho do genoma são divergentes ( $2C = 4.77, 5.42$  e  $6.00$  pg). Para decifrar o papel da poliploidia na domesticação do biribá, levantamos questões sobre a variação fenotípica da espécie estar relacionada ao número cromossômico e ao tamanho do genoma. Realizamos a contagem cromossômica de 31 indivíduos de biribá da Amazônia central e do médio e alto rio Solimões, assim como a estimativa do conteúdo de DNA por citometria de fluxo. Realizamos a reconstrução filogenética, análise de divergência de tempo e reconstruímos o número cromossômico ancestral para o gênero *Annona*. Observamos que: 1) a variação no tamanho dos frutos e morfotipos não está associada a variação citogenética (número cromossômico e tamanho do genoma); 2) o clado Rollinia, espécies que pertenciam ao gênero *Rollinia* como o biribá, apresenta alta taxa de poliploides com prováveis ancestrais poliploides 3) o ancestral comum mais recente de *Annona mucosa* é inferido como poliploide e se divergiu antes dos eventos de domesticação. Concluímos que, quando domesticado, o biribá já era poliploide e possivelmente populações naturais já apresentavam um genoma tetraploide.

**Palavras chave:** Evolução cromossômica, Conteúdo de DNA, Reconstrução de caráter ancestral



## Polyploidy in populations of biribás (*Annona mucosa* Jacq.) in the Amazon

### Abstract

Whole genome duplication is important in the angiosperms and cultivated plants, especially domesticated ones; however, polyploidy has been little studied in the Amazon region, where there are numerous domesticated crops. The biriba (*Annona mucosa* Jacq.) is a fruit tree that was domesticated by pre-Columbian populations and has polyploid populations, as well as wide phenotypic variability in fruit weight (100 g to 4 kg), as well as differences in fruit morphology. Two cytotypes are recorded in the literature ( $2n = 4x = 28$  and  $2n = 6x = 42$ ) and genome size records are divergent ( $2C = 4.77, 5.42$  and  $6.00$  pg). To decipher the role of polyploidy in the domestication of biriba, we raised questions about the phenotypic variation of the species being related to chromosome number and genome size. We performed the chromosome count of 31 individuals of biriba in central Amazonia and the middle and upper Solimões river, as well as an estimate of the DNA content with flow cytometry. We performed phylogenetic reconstruction, time divergence analysis and reconstructed the ancestral chromosome number for the genus *Annona*. We observed that: 1) the variation in fruit size and morphotype is not associated with cytogenetic variation (chromosomal number and genome size); 2) the Rollinia group, species that belonged to the Rollinia genus such as biriba, presented a high rate of polyploids, with probability of polyploid ancestors; 3) the most recent common ancestor of *Annona mucosa* is inferred to be polyploid and diverged before domestication events. We conclude that when biriba was domesticated it was already polyploid and possibly natural populations already had a tetraploid genome.

**Keywords:** Chromosomal evolution, DNA-C values, Ancestral character reconstruction

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. HIPÓTESES	11
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1. Coletas de biribá	11
4.2. Levantamento de dados do gênero <i>Annona</i>	12
4.3. Preparações cromossômicas	13
4.4. Coloração com fluorocromos base-específicos	13
4.5. Estimativa do conteúdo de DNA	13
4.6. Análises filogenéticas	14
4.7. Estimativas do tempo de divergência	15
4.8. Reconstrução do caráter ancestral	16
4.9. Relação estatística entre peso e morfotipos de frutos e tamanho de genoma	16
5. RESULTADOS	16
6. DISCUSSÃO	24
6.1. Eventos evolutivos e suas consequências nas variações fenotípicas de biribá	24
6.2. Eventos de poliploidização e o contexto evolutivo na domesticação do biribá	25
7. CONCLUSÕES	26
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
9. APÊNDICES	33

## 1. INTRODUÇÃO

A transição gradual da caça e coleta para o cultivo de plantas iniciou cerca de 12.000 anos atrás, entre o final do Pleistoceno e o início do Holoceno (Fuller et al. 2014). A domesticação envolve a seleção e o cultivo de plantas úteis pelos humanos (Clement et al. 2021). O resultado é um conjunto de características modificadas que os diferenciam de seus ancestrais silvestres (Pickersgill 2007, Meyer et al. 2012). Cerca de 30% das plantas cultivadas apresentam poliploidia (Salman-Minkov et al. 2016), que se refere à multiplicação de um conjunto cromossômico completo (Zhang et al. 2019). Esse processo pode ocorrer antes ou depois da domesticação, gerando alterações fenotípicas que muitas vezes são de interesse humano (Zhang et al. 2019). Vários centros de domesticação foram propostos nas Américas (Meyer et al. 2012). A Amazônia é considerada como um centro de diversidade genética de culturas (Clement 1989, Clement 1999), com pelo menos 85 espécies de árvores e palmeiras com algum grau de domesticação (Levis et al. 2017). Entretanto pouco se sabe sobre cultivos poliploides (Freitas et al. 2007, Rice et al. 2019). O biribá (*Annona mucosa* Jacq.) é uma das poucas espécies com estudos do cariótipo relatada como poliploide (Morawetz 1986a). Desta forma, o biribá se torna uma espécie modelo para analisar o papel da poliploidia no processo de domesticação na Amazônia.

O biribá pertence à família Annonaceae, que inclui 107 gêneros (Guo et al. 2017), com 2400 espécies das quais muitas ocorrem na Amazônia (Mass et al. 2015, Guo et al. 2017). É uma família de origem há 99.4 Ma e a maioria das espécies tem origem anterior a 1.9 Ma (Li et al. 2017). Dentro da família, o gênero *Annona* se destaca por apresentar um grande número de espécies comestíveis em diferentes estágios de domesticação, como: cherimoya (*Annona cherimola* Mill.), pinha (*Annona squamosa* L.), graviola (*Annona muricata* L.), atemoia (um híbrido entre *A. cherimola* e *A. squamosa*), pinha (*Annona reticulata* L.), ilama (*Annona macrophyllata* Donn. Sm.), macieira (*Annona glabra* L.) (Larranaga et al. 2019, Araujo et al. 2021). Atualmente, o gênero apresenta 170 espécies, com distribuição Pantropical, formando um grupo monofilético que se divergiu há 52.5 Ma (Li et al. 2017, Guo et al. 2017). O monofiletismo do gênero dependeu da inclusão do gênero *Rollinia* (Rainer 2007, Chatrou et al. 2009), cuja as flores diferem das demais Annonas, por apresentam uma corola gamopétala composta por três lobos externos grandes e três lobos internos menores alternados (Maas et al. 1992). O

clado Rollinia inclui o biribá e outras 42 espécies (Rainer 2007) com distribuição Neotropical (Maas et al. 1992).

O biribá é uma árvore frutífera cultivada pelos povos pré-colombianos (Clement 1999, Clement et al. 2021), e até hoje é utilizada na alimentação e medicina popular (Cavalcante 2010). A distribuição de *A. mucosa* cultivada é ampla, desde a Mesoamérica, até o sul do Brasil (Maas et al. 1992). Populações selvagens foram mencionadas na Amazônia peruana (Patiño 2002) e no estado de Rondônia no Brasil (Cavalcante 2010). Estudos recentes identificaram populações selvagens no México (Segura et al. 2018, Escobedo-López et al. 2019). No Brasil, a espécie ocorre com maior frequência na região amazônica (Maas et al. 2015), onde foram relatadas variações morfológicas nos frutos. As populações domesticadas apresentaram diferentes saliências carpelares, assim como diferentes tamanhos (de 100 a 4000g), sendo os maiores encontrados na região do alto rio Solimões da Amazônia Brasileira (Clement 1989, Cavalcante 2010).

As variações morfológicas encontradas nos biribás amazônicos, podem ser um reflexo da seleção ou da poliploidia. Assim como a domesticação, a poliploidia gera mudanças genômicas. Por apresentar um maior número de cromossomos, a poliploidia oferece uma maior chance de recombinação gênica, afetando diretamente a expressão dos genes (Grant 1974, Guerra 1988, Hancock 2012). Para frutos cultivados como o morango (*Fragaria × ananassa* Duch.) e a carambola (*Averrhoa carambola* L.), o tamanho do fruto aumenta conforme o aumento do nível de ploidia do indivíduo (Bertioli 2019, Hu et al. 2021). Adicionalmente, para espécies do gênero *Brassica*, a poliploidia é associada à ampla variação morfológica (Cheng et al. 2014). Dessa forma, ainda não se sabe se determinadas populações foram selecionadas por serem poliploides ou se a poliploidia foi estabelecida após o processo de seleção.

O gênero *Annona* apresenta número cromossômico básico de  $x = 7$  (Morawetz 1986b). O biribá apresenta dois níveis de ploidia:  $2n = 4x = 28$  em populações no Peru (Maas et al. 1992) e  $2n = 6x = 42$  em populações domesticadas no Brasil (Morawetz 1986b, Lorenzoni 2016). A espécie também aparenta apresentar variabilidade cariotípica, evidenciada por meio de análises do conteúdo de DNA, que apresentam resultados distintos ( $2C = 4.77, 5.42$  e  $6.00$  pg) (Soares et al. 2014, Lorenzoni 2016, Leitch et al. 2019). Entretanto, os estudos citogenéticos e de conteúdo de DNA de biribá apresentam muitas lacunas, como por exemplo, a ausência de localidade exata de coleta e a falta de informações sobre o fenótipo dos frutos nos estudos publicados. Como a variação fenotípica ainda não foi associada aos diferentes citótipos e aos diferentes conteúdos de

DNA, associar essas informações pode nos trazer respostas sobre o papel da poliploidia na origem da diversidade fenotípica.

O gênero *Annona* não apresenta alta taxa de eventos poliploides, entretanto o clado Rollinia sim (Maas et al. 1992, Morawetz 1984). A alta frequência de poliploides dentro de um clado pode estar associada a eventos ancestrais de poliploidia (Rice et al. 2019, Sader et al. 2019). Para o guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Ducke), uma espécie Amazônica com populações domesticadas poliploides, a duplicação total do genoma é apontada como mecanismo de evolução cromossômica importante na divergência da espécie (Urdampilleta et al. 2020). Estudos filogenéticos permitem compreender a relação evolutiva entre as espécies e inferir o tempo e modo dos eventos de divergência (Sader et al. 2019) e sua relação com mudanças cariológicas. Portanto, por meio dessas análises é possível sugerir eventos ancestrais de poliploidia que poderiam explicar a alta frequência de poliploides em uma linhagem e estabelecer a relação espaço temporal entre domesticação e poliploidia (Moraes et al. 2020, Urdampilleta et al. 2020).

## **2. HIPÓTESES**

- (1) Quanto maior o nível de ploidia, maior o tamanho do fruto;
- (2) A poliploidia foi um evento anterior a domesticação do biribá.

## **3. OBJETIVOS**

Elucidar a relação entre os processos de poliploidia e domesticação no biribá (*Annona mucosa*).

### **3.1. Objetivos específicos**

- (1) Testar se a variação no tamanho dos frutos de biribá está associada à diferentes níveis de ploidia;
- (2) Testar se a variação morfológica das saliências carpelares de biribá está associada ao conteúdo de DNA;
- (3) Avaliar se os eventos de poliploidização ocorreram antes do período de domesticação do biribá.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Coletas de biribá**

Os frutos foram comprados em feiras na região da Amazônia central (Manaus e Rio Preto da Eva), médio rio Solimões (Tefé) e alto rio Solimões (Benjamin Constant, Tabatinga e Atalaia do Norte) (Tabela 2, Figuras 1 e 2). Alguns indivíduos foram coletados e suas exsicatas depositados no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) (Tabela 2). Para esses indivíduos, mais de um fruto foi coletado por árvore. As sementes dos frutos foram plantadas para as análises citogenéticas. Classificamos os frutos encontrados em cinco diferentes morfotipos baseados no exocarpo, como feito para cherimoya (*A. cherimola* Mill.) (Vanhove 2008): Frutos lisos (Figura 3.A0); Frutos com pequenas depressões (Figura 3.B0); Frutos com saliências pequenas (Figura 3.C0); Frutos com saliências médias (Figura 3.D0) e Frutos com saliências grandes (Figura 3. E0).

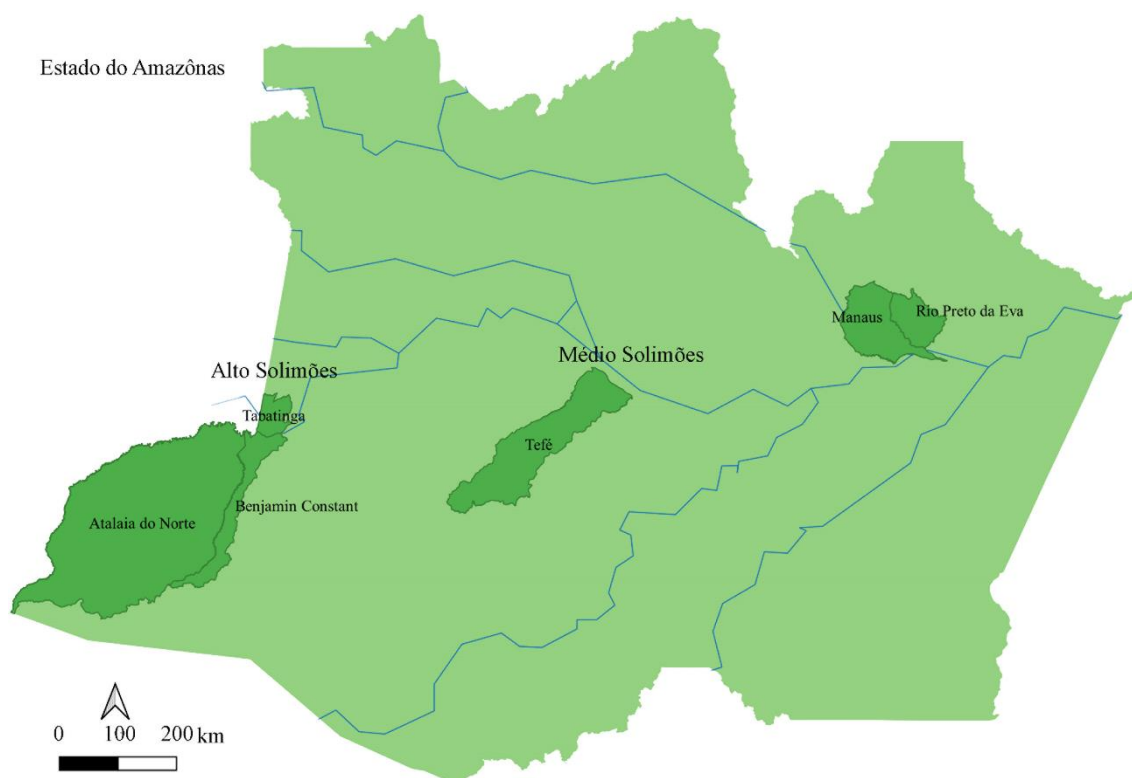


Figura 1. Mapa das cidades de coleta dos frutos de biribá.

#### 4.2. Levantamento de dados do gênero *Annona*

Realizamos um levantamento dos números cromossômicos, conteúdo de DNA e grau de domesticação de espécies no gênero *Annona*. Além da literatura, utilizamos bancos de dados: The Chromosome Counts Database – CCDB (Rice et al. 2015); Index to Plant

Chromosome Numbers - IPCN (Goldblatt and Johnson 1994); e Plant DNA C-values Database (Leitch et al. 2019) (Apêndice A).

### **4.3. Preparações cromossômicas**

As preparações cromossômicas foram realizadas segundo Guerra e Souza (2002), com adaptações para biribá. As sementes foram germinadas e os ápices radiculares pré-tratados com 8-hidroxiquinolina (8 HQ) 0,002 M por 24 h em geladeira. A fixação das raízes foi feita em Carnoy (álcool etílico: ácido acético, 3:1) por cerca de 24h em temperatura ambiente e posteriormente estocagem em freezer (-20 °C). A elaboração de lâminas foi realizada com digestão enzimática (1 % macerozima, 2 % celulase e 20 % pectinase) por 40 min a 37 °C.

### **4.4. Coloração com fluorocromos base-específicos**

Após o envelhecimento das lâminas por cinco dias, realizamos o bandeamento seguindo o protocolo de Schweizer (1976) com modificações. O fluorocromo cromomicina A<sub>3</sub> (CMA) marcou as regiões ricas em GC e o 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) marcou regiões ricas em AT. As lâminas foram cobertas com 12 µL de CMA (0,5 mg/ml) e lamínula em câmara escura por uma hora. Posteriormente as lâminas foram lavadas com água destilada e cobertas com 12 µL de DAPI (2 mg/ml) e lamínula em câmara escura por 30 min. Por fim, foram montadas com 12 µL do meio de montagem glicerol/McIlvaine/MgCl<sub>2</sub> e coberta com lamínula. As lâminas foram então estocadas por, pelo menos, três dias até a observação em microscópio Olympus BX51. As imagens foram capturadas utilizando o programa Olympus Cell View (Olympus Corporation). O programa Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, Inc.) foi utilizado para auxiliar no balanceamento uniforme de cores, contraste e brilho, e montagem da prancha cromossômica.

### **4.5. Estimativa do conteúdo de DNA**

Folhas jovens de 15 indivíduos de biribá foram coletadas e usadas para medições de tamanho do genoma por citometria de fluxo. Aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de tecido foliar jovem de cada indivíduo foi picado com material foliar fresco de um padrão interno (*Petroselinum crispum* (Mill.), Apiaceae, 2C = 4.50 pg). As suspensões nucleares foram

preparadas de acordo com Doležal et al. (2007). Cerca de 1 mL de tampão WPB (*woody plant buffer*) foi adicionado ao extrato de núcleos, e então 1 mL da suspensão nuclear foi filtrada através de um filtro de náilon de 30 µm. A suspensão nuclear foi corada com 50 µL de iodeto de propídio 1 mg/mL, incubado por pelo menos 10 min e analisado por citometria de fluxo. Pelo menos 5.000 núcleos de três repetições foram analisados para cada amostra usando um citômetro CyFlow Ploidy Analyser (Sysmex). Cada conjunto de histogramas das análises de citometria de fluxo (FCM) foi analisado usando o Flowing Software v2.5.1 by Perttu Terho (Turku Centre for Biotechnology, University of Turku, Turku, Finland).

#### 4.6. Análises filogenéticas

Sequências de DNA de 50 espécies de *Annona* foram obtidas do GenBank (Benson et al. 2012), o que representa 29 % das espécies aceitas do gênero (Apêndice B). O clado Rollinia foi 38% amostrado. A espécie *Asimina incana* (W. Bartram) Exell. foi usada como grupo externo. O espaçador intergênico plastidial *psbA-trnH* e os genes plastidiais *matK*, *ndhF*, *rbcL* e *trnL* foram usados, totalizando 161 sequências (Apêndice B). As sequências de DNA foram alinhadas usando MUSCLE (Edgar 2004) como uma extensão do Geneious v.7.1.9 (Kearse et al. 2012). Posteriormente, as sequências dos marcadores para cada uma das espécies foram concatenadas para as análises, assim como feito por Guo et al. (2017), na maior filogenia para a família Annonaceae.

Usamos jModelTest v.2.1.6 para avaliar o melhor modelo de substituição de DNA para cada marcador individual (Darriba et al. 2012) por meio do Akaike Information Criterion (Akaike 1974) (Tabela 1). As relações filogenéticas foram inferidas usando a abordagem de Inferência Bayesiana com 10.000.000 gerações, implementada no MrBayes v.3.2.6 (Ronquist et al. 2012). A análise foi avaliada no TRACER v.1.6 (Rambaut e Drummond 2013) para determinar se o tamanho da amostra estimado (ESS) era superior a 200, aplicando um burn-in de 25 %. A árvore de consenso foi visualizada e editada no FigTree v.1.4.2. (Rambaut 2009). Todas as análises, excluindo o ESS, foram realizadas no CIPRES Science Gateway (Miller et al. 2011).

Tabela 1. Estatísticas dos marcadores utilizados nas análises filogenéticas de 50 espécies de *Annona*. Para cada marcador é apresentado o número de espécies com informação, o



número de caracteres alinhados em pares de base (pb), a porcentagem de caracteres conservados e o modelo de substituição evolutiva.

	<i>rbcL</i>	<i>trnL</i>	<i>matK</i>	<i>Ndhf</i>	<i>psbA-trnH</i>
Número de espécies	47	36	33	19	26
Comprimento do alinhamento (pb)	470	232	880	445	172
Caracteres conservados (%)	91.1	75.9	84	84.3	65.1
Modelo de substituição	K80+I	HKY+I	TPM1uF+G	HKY+I	HKY+G

#### 4.7. Estimativas do tempo de divergência

Para os 20 táxons com informações cromossômicas, repetimos as análises filogenéticas seguindo a mesma metodologia descrita acima. Estimamos o tempo de divergência entre as espécies no BEAST v.1.8.3., com a preparação do input pelo BEAUti (Drummond and Rambaut 2007, Drummond et al. 2012) O "Relaxed Clock: Uncorrelated Lognormal" foi aplicado (Drummond and Rambaut 2007) e o modelo de especificação "Yule" foi usado (Gernhard 2008). Duas execuções independentes de 200.000.000 gerações foram realizadas, sendo amostradas a cada 10.000 gerações. Para verificar a amostragem efetiva dos parâmetros e avaliar a convergência das cadeias independentes, examinamos a distribuição posterior no TRACER v.1.6. (Rambaut and Drummond 2013). A amostragem MCMC foi considerada suficiente em tamanhos de amostragem efetivos (ESS) maiores que 200. Depois de remover 10.000 amostras como burn-in, as execuções independentes foram combinadas e uma árvore de credibilidade máxima do clado (MCC) construída usando TreeAnnotator v.1.8.2. (Drummond et al. 2012). As análises do BEAST foram realizadas no CIPRES Science Gateway (Miller et al. 2011). A calibração da árvore utilizou calibrações secundárias, baseadas no trabalho de Li et al. (2017), para o nó do gênero monofilético *Annona* (29 milhões de anos atrás - Ma), aplicando um desvio padrão de 2, e o nó do grupo *Annonae* (53.3 Ma), aplicando um desvio padrão de 2 (Apêndice D).

#### **4.8. Reconstrução do caráter ancestral**

Para os 20 táxons com informações cromossômicas, também realizamos a reconstrução do caráter ancestral em uma filogenia. As sequências e números de cromossomos haploides foram usados para reconstruir o número de cromossomos básicos ancestrais na árvore filogenética usando duas abordagens de máxima verossimilhança. A primeira análise foi feita pelo pacote Phytools (Revell 2012) no programa R v.3.2.1 (R Core Team 2014), considerando dois tipos de caracteres discretos: binário, com os estados diploide e poliploide (Figura 4), e não binário, considerando o número haploide das espécies ( $x = 7, 14, 21$  e  $28$ ) (Figura 4.A). Para ambas as análises, os caracteres foram reconstruídos usando a função “ace” do pacote Ape (Paradis et al. 2004) com o modelo EqualRates.

Posteriormente à análise com caracteres não binários foi repetida usando o programa ChromEvol (Glick and Mayrose 2014) (Figura 4.B). Os modelos foram ajustados aos dados, cada um com 10.000 simulações, e o modelo melhor ajustado foi selecionado usando o critério de informação de Akaike (AIC). Além do critério de AIC, testamos a adequação de modelo para modelos probabilísticos de evolução do número de cromossomos segundo Rice e Mayrose (2021).

#### **4.9. Relação estatística entre peso e morfotipos de frutos e tamanho de genoma**

Para testar se as amostras se originaram de uma mesma distribuição e analisar a relação entre tamanho de genoma, morfotipo e peso dos frutos dos indivíduos de biribá realizamos o teste de Kruskal-Wallis (McKight and Najab 2010), uma ANOVA não paramétrica, no pacote MultNonParam (Kolassa and Jankowski 2014) na linguagem R v.3.2.1 (R Core Team 2014).

### **5. RESULTADOS**

As massas dos frutos de biribá encontradas variaram entre 100 e 1850 g (Tabela 2). Os maiores frutos foram encontrados na região do alto rio Solimões. Os morfotipos apresentam uma ampla variação dentro da classificação das saliências carpelares (Figura 2). O morfotipo mais frequente na região de Manaus foi com as saliências carpelares pequenas (58 %), enquanto na região do alto rio Solimões o morfotipo mais frequente foi o com saliências carpelares grandes (89 %). Os morfotipos sem saliência e com pequenas

depressões, respectivamente, foram raros, com uma pequena amostragem (Tabela 2, Figura 3). Na análise de Kruskal-Wallis não houve relação significativa entre tamanho do fruto e morfotipo, apenas uma tendência de ocorrência de maiores saliências em frutos maiores ( $p = 0.0646$ ).

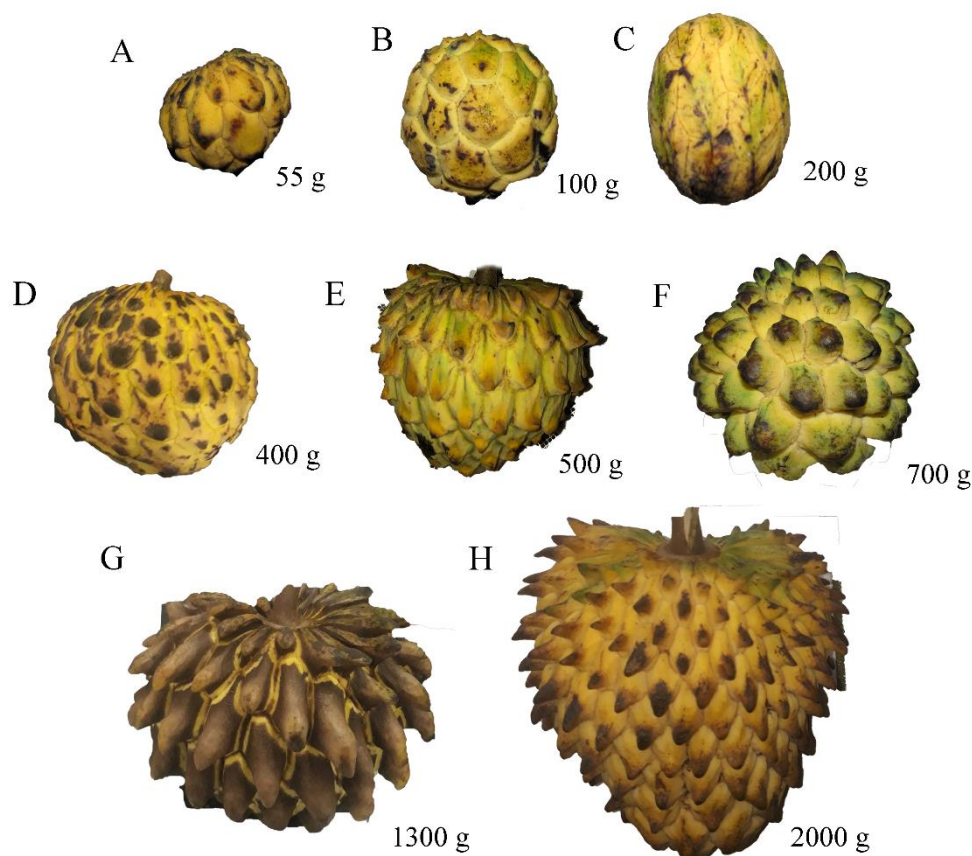


Figura 3- Variação fenotípica encontrada em *Annona mucosa*. Ordem de tamanho, com seus respectivos pesos associados. A. Frutos com saliências pequenas; B. Frutos com pequenas depressões; C. Frutos lisos; D. Frutos com saliências pequenas; E. Frutos com saliências médias; F. Frutos com saliências grandes; G. Frutos com saliências grandes e H. Frutos com saliências médias.

Tabela 2. Frutos de *Annona mucosa* usados no estudo, com o município de coleta no Estado do Amazonas, Brasil, número cromossômico ( $2n$ ), números de pares de bandas CMA<sup>+</sup>, tamanho do genoma ( $2C$ ) em picogramas (média (desvio padrão)), coeficiente de variação (CV), morfotipo dos frutos de biribá baseado nas saliências carpelares (Morfo), seguindo Vanhove (2008), e o voucher de coleta.

No	Município	Peso	$2n$	CMA <sup>+</sup>	$2C$	CV	Morfo	Voucher
----	-----------	------	------	------------------	------	----	-------	---------

1	Manaus	100	6x = 42	5	-		Pequena -
2	Rio Preto da Eva	165	6x = 42	5	5.32 (0.13)	3.73	Pequena -
3	Rio Preto da Eva	235	6x = 42	5	5.30 (0.06)	2.94	Liso -
4	Manaus	300	6x = 42	5	5.23 (0.02)	3.23	Pequena -
5	Manaus	350	6x = 42	5	-		Pequena -
6	Manaus	350, 450, 550, 650, 750, 1050	6x = 42	5	-		Pequena GMS11
7	Manaus	350	6x = 42	-	-	-	Média -
8	Manaus	400	6x = 42	5	-	-	Pequena -
9	Tabatinga	400	-	-	5.41 (0.07)	3.26	Grande GMS37
10	Manaus	450	6x = 42	5	-	-	Média -
11	Manaus	450	6x = 42	5	-	-	Pequena -
12	Manaus	450, 700	6x = 42	5	5.26 (0.08)	2.94	Pequena GMS12
13	Manaus	450	6x = 42	5	5.23 (0.04)	3.24	Pequena -
14	Tefé	500	6x = 42	5	5.32 (0.06)	3.37	Depressões -
15	Tefé	500	6x = 42	5	-		Pequena -
16	Tefé	500	6x = 42	5	5.65 (0.07)	3.72	Média -
17	Benjamin Constant	650	6x = 42	5	5.28 (0.23)	3.42	Grande -
18	Manaus	700	6x = 42	5	-	-	Média -

19	Manaus	700	6x = 42	5	-	-	Pequena	-
20	Manaus	700	6x = 42	5	5.28	3.25	Média	-
					(0.05)			
21	Manaus	1020	6x = 42	-	-		Grande	GMS13
22	Manaus	1200	6x = 42	5	5.31	3.15	Grande	-
					(0.03)			
23	Tabatinga	1200	6x = 42	5	5.33	3.19	Grande	-
					(0.07)			
24	Atalaia do Norte	1300	6x = 42	5	5.27	3.33	Grande	-
					(0.12)			
25	Benjamin Constant	1600	6x = 42	-	5.21	3.19	Média	-
					(0.06)			
26	Benjamin Constant	1850	6x = 42	5	5.26	3.49	Grande	-
					(0.06)			

---

*\*As medições do conteúdo de DNA pela análise de citometria de fluxo foram realizadas com apenas duas execuções.*

No total, foi realizada a contagem cromossômica de 31 frutos e todos apresentaram o mesmo número cromossômico de  $2n = 6x = 42$  (Tabela 2, Figura 3). A distribuição da heterocromatina constitutiva (HC) foi analisada quantitativamente. Foram observados cinco pares de bandas com um sinal forte de CMA+/DAPI-, três na região próxima ao centrômero (pericentromérica) e dois no braço curto dos cromossomos (com distensão). Por meio da distribuição da HC não foi possível observar um padrão de diferença entre os tamanhos e morfotipos dos frutos.

O conteúdo C de DNA dos 15 indivíduos de biribá analisados revelou pouca variação e sem diferenças significativas entre os indivíduos ( $2C$  média =  $5.31 \pm 0.12$ , mínimo = 5.21 pg, máximo = 5.65 pg). O conteúdo de DNA não está relacionado ao tamanho dos frutos ( $p = 0.2267$ ) e ou variação dos morfotipos ( $p = 0.6437$ ).

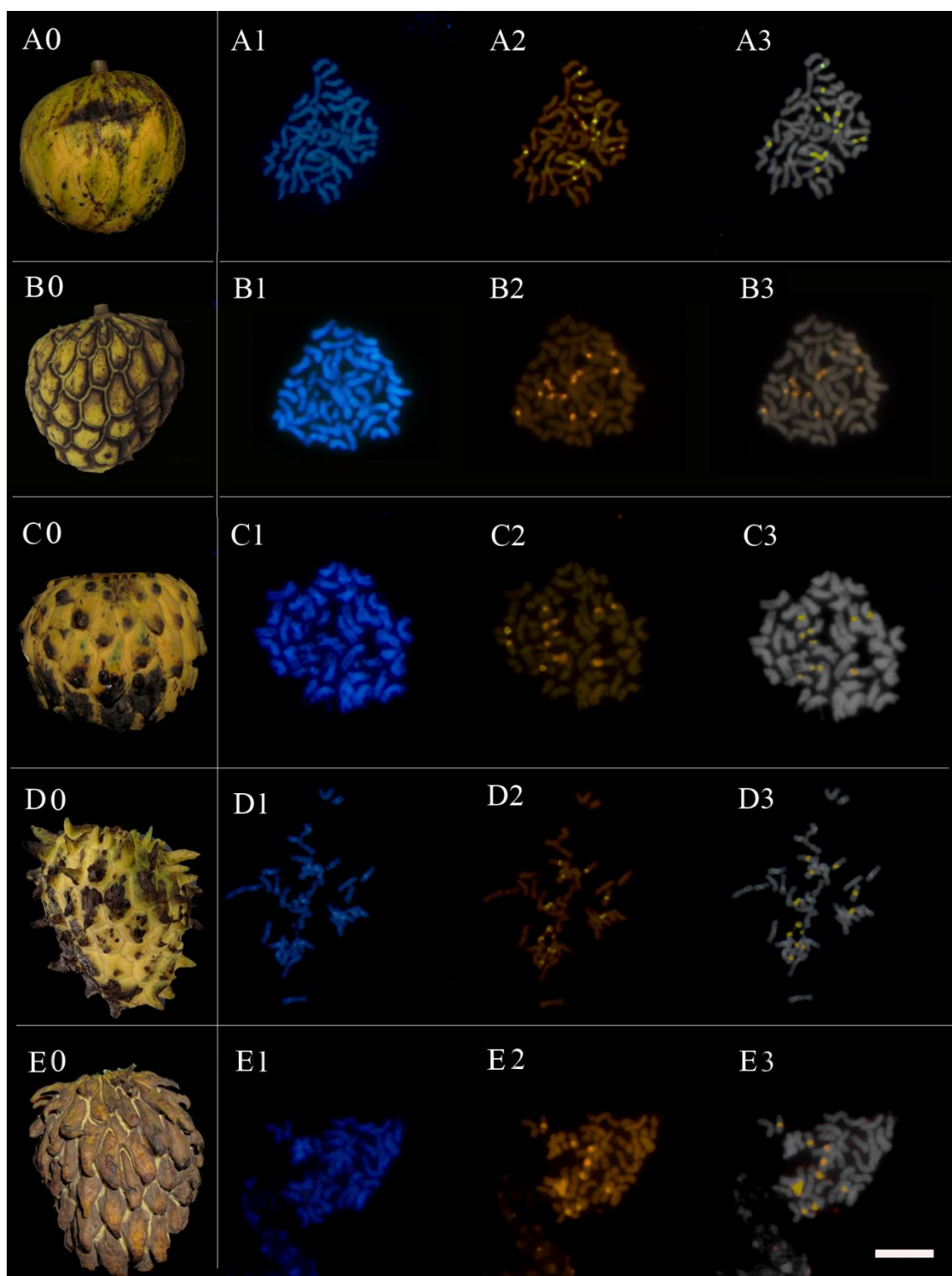


Figura 3. Morfotipos de *Annona mucosa* e suas respectivas células metafásicas. A0. Frutos lisos; B0. Frutos com leves depressões; C0. Frutos com saliências pequenas; D0. Frutos com saliências médias; E0. Frutos com saliências grandes; A2 – E2. Metáfases coradas em DAPI; A3 – E3, Metáfases coradas em CMA; A3 – E3. Sobreposição das imagens CMA-DAPI. Barra de escala 20  $\mu$ m.

Na análise filogenética com maior amostragem de *Annona* (Apêndice C), as probabilidades posteriores foram diferentes em relação a filogenia com menor amostragem com espécies com informações citogenéticas (Figura 4 e 5). A topologia das árvores foi similar e em ambas as filogenias *A. mucosa* e *A. cuspidata* compartilharam o mesmo ancestral comum mais recente no Plioceno (Figura 3 e Apêndice C). O tempo de divergência do gênero *Annona* foi no Paleoceno, mas sua diversificação aparenta ter se iniciado no Oligoceno quando os três grupos maiores divergiram (veja intervalos de confiança no Apêndice D). Durante o Mioceno, o clado Rollinia começou a se diversificar.

Na reconstrução dos estados diploide e poliploide, o clado Rollinia apresentou uma pequena probabilidade de um ancestral poliploide na sua origem (Figura 5). Após a divergência da espécie *A. papilionella* (Diels) H. Rainer durante o Mioceno (16 Ma) a probabilidade de um ancestral poliploide aumenta. A probabilidade de o estado poliploide estar presente no ancestral comum mais recente de *A. mucosa* também é alta (Figura 2).

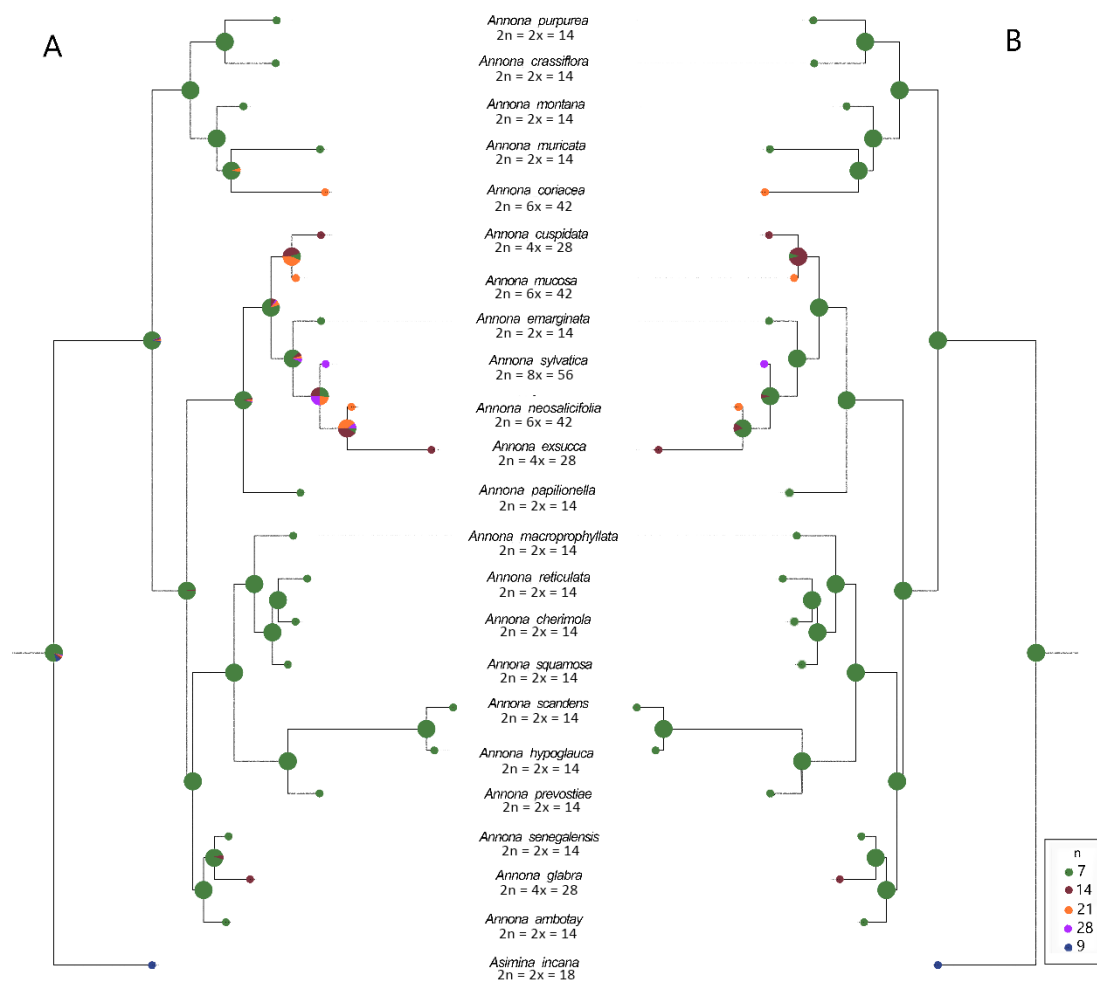


Figura 4. Reconstrução do número cromossômico no gênero *Annona*. A. Reconstrução de máxima verossimilhança da evolução do conteúdo do número cromossômico usando o pacote ape na linguagem R. B. Reconstrução usando o ChromEvol com o modelo Base\_Number\_No\_Dupl, que considera eventos de multiplicação do número base (x). A soma total das taxas em todos os ramos foi *gain* ( $\lambda = 0.397903$ ), *base number transition* ( $v = 0.471815$ ) e *base number* ( $\beta = 7$ ). Círculos próximos aos nomes das espécies representam a ploidia de cada espécie. Círculos nos nós da filogenia representam a probabilidade do número cromossômico ancestral.



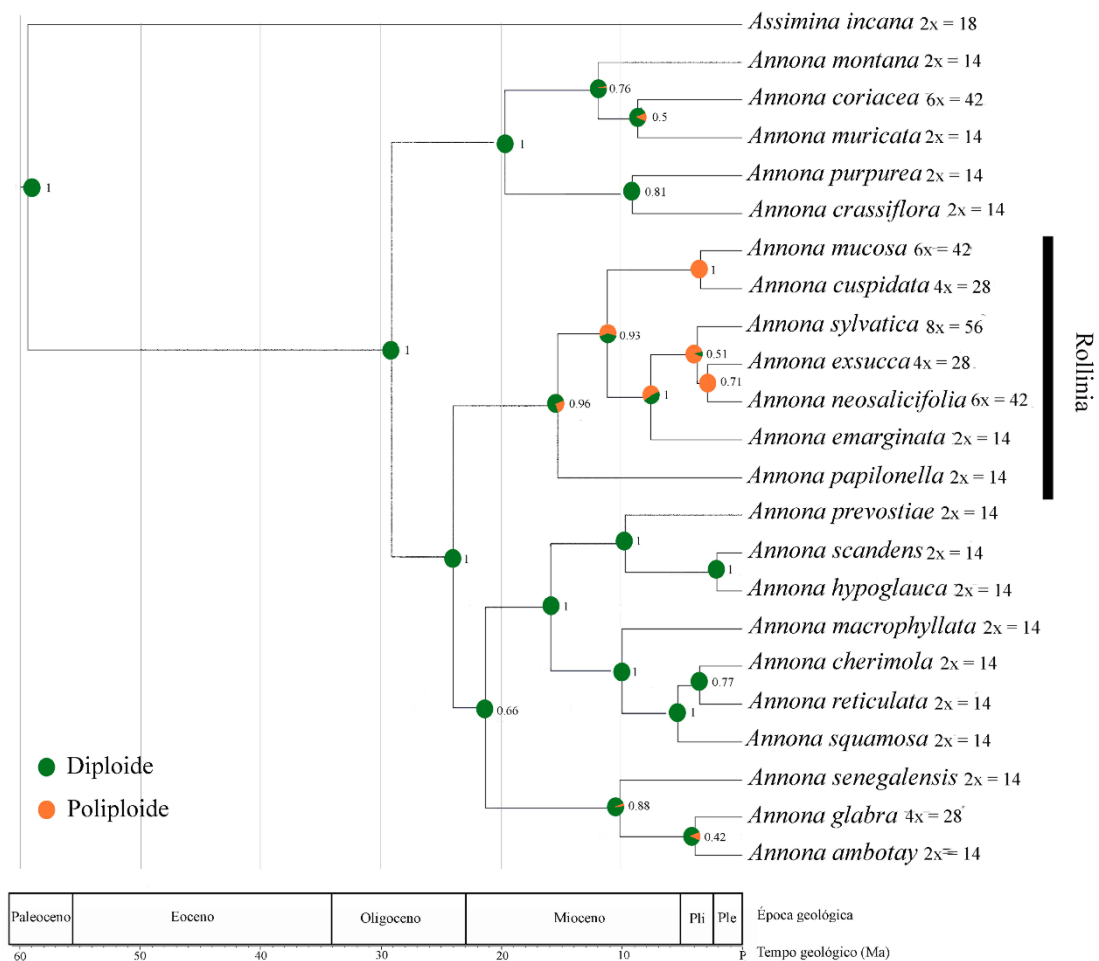


Figura 5. Reconstrução de caracteres ancestrais binários (estados: diploide e poliploide) no gênero *Annona* através da linguagem R. A seta indica o ancestral mais antigo com maior probabilidade de ser poliploide no clado Rollinia. Os números na frente dos nós indicam a probabilidade posterior bayesiana. Círculos nos nós da filogenia representam a probabilidade do estado ancestral. Os números após o nome das espécies indicam o nível de ploidia (2x a 8x) das espécies. Abaixo da figura estão as épocas geológicas que indicam o tempo de divergência das espécies e de seus nós ancestrais em Milhões de anos atrás (Ma). Pli: Plioceno; Ple: Pleistoceno; P: Presente.

Os dois métodos de reconstrução do número cromossômico apresentaram ligeiras diferenças. Phytotools apresentou probabilidades idênticas para um ancestral de biribá de 2x = 28 e 42, e uma baixa probabilidade para 2x = 14. Para os outros ancestrais do clado Rollinia, também existem algumas probabilidades de poliploidia (Figuras 4.A e 5). ChromEvol inferiu o ancestral comum mais recente de biribá de 2x = 28 (Figura 4.B), entretanto não há inferência de poliploidia para outros ancestrais do clado Rollinia. O

melhor modelo para avaliar a evolução cromossômica do gênero foi *Base\_Number\_No\_Dupl*, com o menor AIC (67.93) (Apêndice E).

## 6. DISCUSSÃO

As variações no tamanho dos frutos e dos morfotipos de biribá não estão associadas ao aumento do número cromossômico nem aos diferentes tamanhos de genoma. O clado *Rollinia* apresenta alta taxa de poliploides. O ancestral comum mais recente de *A. mucosa* divergiu no Plioceno e foi inferido como poliploide.

### 6.1. Eventos evolutivos e suas consequências nas variações fenotípicas de biribá

Uma vez que a poliploidia está associada ao gigantismo de partes reprodutivas (Hancock 2012), esperava-se que o número cromossômico estivesse associado a diferentes tamanhos de frutos. Portanto, frutos menores deveriam apresentar uma ploidia menor e conforme o aumento do tamanho dos frutos, a ploidia também seguiria diretamente essa proporcionalidade. Essa associação já foi observada, por exemplo, nos processos de domesticação do morango (espécies do gênero *Fragaria*) (Bertioli 2019) e da carambola (*A. carambola*) (Hu et al. 2021). Entretanto, essa hipótese não foi confirmada para biribá. Dentro do gênero *Annona*, plantas com frutos muito grandes e domesticados, exemplo da graviola (*A. muricata* L.) podem ser diploides, e plantas com frutos pequenos e silvestres, exemplo do Araticum do mato (*A. sylvatica* A. St.-Hil.), podem ser poliploides (Apêndice A). Dessa forma, inferimos que o processo de seleção humana no gênero *Annona* influencia o tamanho dos frutos independentemente do nível de ploidia.

Outra hipótese levantada diz respeito à presença de variação do conteúdo de DNA relacionada a diferentes fenótipos, que também foi refutada. Mesmo em diferentes regiões da Amazônia brasileira, a variação no conteúdo de DNA não foi significativa, sugerindo uma estabilidade no genoma. Outros estudos apresentaram divergências no tamanho do genoma do biribá (Soares et al. 2014, Lorenzoni 2016, Leitch et al. 2019). Por conseguinte, as diferenças observadas entre os estudos podem ser uma consequência da metodologia, uma vez que o padrão interno utilizado pode influenciar o resultado, assim como a ocorrência de erros e artefatos técnicos (Leitch and Bennett 2004, Doležel et al. 2007).

Nesse contexto, Martin et al. (2019) estabeleceram uma quantidade de DNA para indivíduos diploides em *Annona* e associaram o aumento da ploidia ao tamanho do genoma. Em comparação com *Annona neosalicifolia* H. Rainer, uma espécie hexaploide ( $2C = 9.64$  pg), *A. mucosa* tem aproximadamente 4 pg a menos de conteúdo de DNA. Baseado no conteúdo de DNA de outras espécies de *Annona* (Apêndice A) observamos que para biribá cultivado na Amazônia brasileira essa característica não está associada de forma linear a ploidia, pois todas as amostras têm  $6x = 42$  e  $2C = 5.31 \pm 0.12$ . A espécie também não segue o padrão de regiões heterocromáticas do gênero *Annona*, apresentando cinco pares de bandas, enquanto o esperado seriam três pares (Morawetz 1986b). Esses resultados podem estar associados aos rearranjos e reestruturação cromossômica que são comuns em poliploides (Leitch and Bennett 2004, Soltis et al. 2015, Tacuatiá et al. 2017, Wang et al. 2021).

## 6.2. Eventos de poliploidização e o contexto evolutivo na domesticação do biribá

As filogenias apresentadas aqui concordam em grande parte com a literatura (Chatrou et al. 2009, Guo et al. 2017), entretanto, as espécies do clado Rollinia, que sempre apresentavam politomia, tiveram um bom suporte estatístico para os ramos, no nosso trabalho. Essa resolução do clado permitiu sugerir que *A. mucosa* e *A. cuspidata* compartilham o mesmo ancestral comum mais recente em uma amostragem de 38 % das espécies do clado (Rainer 2007). As reconstruções do número cromossômico ancestral apresentadas no estudo são divergentes em relação à ancestralidade poliploide do clado Rollinia. Essas divergências já foram relatadas em outros grupos de plantas e, dependendo da metodologia, diferentes eventos cromossômicos são sugeridos (Brottier et al. 2018, Moraes et al. 2020). Com nossos resultados não é possível inferir se a poliploidia é consequência de um único ou múltiplos eventos ancestrais de poliploidização dentro do clado Rollinia pela amostragem de 16 % das espécies do clado na reconstrução.

Nossos resultados sugerem (em ambas as abordagens) que o ancestral comum mais recente do biribá foi poliploide. Por esse ancestral apresentar uma divergência no Plioceno, antes da seleção humana nas Américas (Clement et al. 2021), o evento de poliploidia é inferido antes do processo de domesticação. Essa temporalidade de eventos já foi observada, por exemplo, no guaraná, uma espécie de cipó domesticada na Amazônia (Freitas et al. 2007, Atroch et al. 2012, Urdampilleta et al. 2020) e além de um amplo grupo de plantas (Salman-Minkov et al. 2016, Zhang et al. 2019).

Ao inferimos o ancestral poliploide para o biribá, é esperado que populações naturais de biribá apresentem poliploidia. Três indivíduos em ambientes possivelmente não antrópicos no Peru foram registrados como tetraploide (Maas et al. 1992), porém só um apresentou descrição de coleta em floresta primária. Dessa forma, nossos resultados podem sugerir que populações naturais de biribá sejam tetraploides. Entretanto, um indivíduo de população silvestre de biribá da região Mexicana apresentou hexaploidia (Serbin et al. 2022 in prep.). Esse resultado reforça a hipótese da presença da poliploidia durante o processo de domesticação, porém novas perguntas surgem como, qual a origem da hexaploidia dos biribás domesticados e silvestres e qual o centro da domesticação da espécie.

## 7. CONCLUSÕES

O biribá cultivado na Amazônia brasileira é hexaploide ( $2n = 6x = 42$ ) com conteúdo de DNA de  $2C = 5.31 \pm 0.12$  pg. Esses valores não influenciam no tamanho dos frutos (100 a 1800 g, até 4000 g na literatura) e na variação morfológica, especialmente as saliências carpelares. A ancestralidade da poliploidia foi inferida no clado Rollinia, com pouco suporte, e com alto suporte para o ancestral comum mais recente de biribá que se divergiu no Plioceno. Dessa forma sugerimos que o biribá já era poliploide quando foi domesticado. Acreditamos que o citótipo tetraploide pertença a populações silvestres, entretanto ainda não existem informações cariotípicas de populações silvestres, principalmente as populações entre México e Amazônia. De todas as formas, este trabalho apresenta a maior representação filogenética do gênero *Annona* (com 50 espécies) e é o primeiro a realizar uma reconstrução do número cromossômico ancestral para o gênero. Por fim, sugerimos que a ampla variedade fenotípica do biribá pode ser uma consequência da seleção humana durante o processo de domesticação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19: 716–723.
- Anderson, E. 1952. *Plants, man, and life*. Little, Brown & Cia., Boston, Massachusetts, 251p.

- Araujo, N. M. P.; Arruda, H.S.; Marques, D.R.P.; de Oliveira, W.Q.; Pereira, G.A.; Pastore, G.M. 2021. Functional and nutritional properties of selected Amazon fruits: A review. *Food Research International* 147: 110520.
- Atroch, A.L.; Nascimento-Filho, F.J.; Angelo, P.C.S.; Freitas, D.V.; Sousa, N.R.; Resende, M.D. v; et al. 2012. Domestication and breeding of guaraná. In: Borém, A.; Lopes, M.T.G.; Clement, C.R.; Noda, H. (Eds.), *Domestication and Breeding: Amazonian Species*, Federal University of Viçosa, Viçosa, p.333–360.
- Benson, D.A.; Cavanaugh, M.; Clark, K.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J.; Ostell, J.; et al. 2012. GenBank. *Nucleic Acids Research* 41: D36–D42.
- Bertioli, D.J. 2019. The origin and evolution of a favorite fruit. *Nature Genetics* 51: 372–373.
- Brottier, L.; Chaintreuil, C.; Simion, P.; Scornavacca, C.; Rivallan, R.; Mournet, P.; et al. 2018. A phylogenetic framework of the legume genus *Aeschynomene* for comparative genetic analysis of the Nod-dependent and Nod-independent symbioses. *BMC Plant Biology* 18: 1–15.
- Cavalcante, P.B. 2010. *Frutas comestíveis da Amazônia*. 7th ed. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, 279p.
- Chatrou, L.W.; Escribano, M.P.; Viruel, M.A.; Maas, J.W.; Richardson, J.E.; Hormaza, J.I. 2009. Flanking regions of monomorphic microsatellite loci provide a new source of data for plant species-level phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 726–733.
- Chen, Z.J. 2013. Genomic and epigenetic insights into the molecular bases of heterosis. *Nature Reviews Genetics* 14: 471–482.
- Cheng, F.; Wu, J.; Wang, X. 2014. Genome triplication drove the diversification of *Brassica* plants. *Horticulture Research* 1: 1–8.
- Clement, C.R. 1989. A center of crop genetic diversity in western Amazonia. *BioScience* 39: 624–631.
- Clement, C.R. 1999. 1492 and the loss of Amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. *Economic Botany* 53: 188–202.
- Clement, C.R.; Müller, C.H.; Flores, W.B.C. 1982. Recursos genéticos de espécies frutíferas nativas da Amazônia Brasileira. *Acta Amazonica* 12: 677–695.
- Clement, C.R.; Cristo-Araújo, M.; Coppens D'Eeckenbrugge, G.; Alves Pereira, A.; Picanço-Rodrigues, D. 2010. Origin and domestication of native Amazonian crops. *Diversity* 2: 72–106.

- Clement, C.R.; Casas, A.; Parra-Rondinel, F.A.; Levis, C.; Peroni, N.; Hanazaki, N.; et al. 2021. Disentangling domestication from food production systems in the Neotropics. *Quaternary* 4: 4.
- Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R.; Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- Doležel, J.; Greilhuber, J.; Suda, J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2: 2233–2244.
- Drummond, A.J.; Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 1–8.
- Drummond, A.J.; Suchard, M.A.; Xie, D.; Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969–1973.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
- Edger, P.P.; Poorten, T.J.; VanBuren, R.; Hardigan, M.A.; Colle, M.; McKain, M.R.; et al. 2019. Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. *Nature Genetics* 51: 541–547.
- Escobedo-López, D.; Campos-Rojas, E.; Rubén Rodríguez-Núñez, J.; Alia-Tejagal, I.; Núñez-Colín, C.A. 2019. Priority areas to collect germplasm of *Annona* (Annonaceae) in Mexico based on diversity and species richness indices. *Genetic Resources and Crop Evolution* 66: 401–413.
- Fang, Z.; Morrell, P.L. 2016. Domestication: Polyploidy boosts domestication. *Nature Plants* 2: 1–2.
- Fox, D.T.; Soltis, D.E.; Soltis, P.S.; Ashman, T.-L.; van de Peer, Y. 2020. Polyploidy: A biological force from cells to ecosystems. *Trends in Cell Biology* 30: 688–694.
- Freitas, D.V.; Carvalho, C.R.; Filho, F.J.D.N.; Astolfi-Filho, S. 2007. Karyotype with 210 chromosomes in guaraná (*Paullinia cupana* 'sorbilis'). *Journal of Plant Research* 120: 399–404.
- Gallagher, J.P.; Grover, C.E.; Hu, G.; Jareczek, J.J.; Wendel, J.F. 2020. Conservation and divergence in duplicated fiber coexpression networks accompanying domestication of the polyploid *Gossypium hirsutum* L. *G3 Genes/Genomes/Genetics* 10: 2879–2892.
- Gernhard, T. 2008. The conditioned reconstructed process. *Journal of Theoretical Biology* 253: 769–778.

- Glick, L.; Mayrose, I. 2014. ChromEvol: Assessing the pattern of chromosome number evolution and the inference of polyploidy along a phylogeny. *Molecular Biology and Evolution* 31: 1914–1922.
- Goldblatt, P.; Johnson, D.E. 1994. *Index to plant chromosome numbers, 1990-1991*. Missouri Botanical Garden, Saint Louis, 219–261p.
- Grant, V. 1974. *Plant speciation*. Columbia Univ. Press, New York, 564p.
- Guerra, M.D. 1988. *Introdução à citogenética geral*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 142p.
- Guerra, M.D.; Souza, M.J. 2002. *Como observar cromossomos*. FUNPEC, Ribeirão Preto, 201p.
- Guo, X.; Tang, C.C.; Thomas, D.C.; Couvreur, T.L.P.; Saunders, R.M.K. 2017. A mega-phylogeny of the Annonaceae: Taxonomic placement of five enigmatic genera and support for a new tribe, Phoenicantheae. *Scientific Reports* 7: 1–11.
- Hammer, K. 1984. Das domestikationssyndrom. *Die Kulturpflanze* 32: 11–34.
- Hancock, J.F. 2012. *Plant evolution and the origin of crop species*. 3rd ed. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 245p.
- Hu, Y.; Sun, D.; Hu, H.; Zuo, X.; Xia, T.; Xie, J. 2021. A comparative study on morphological and fruit quality traits of diploid and polyploid carambola (*Averrhoa carambola* L.) genotypes. *Scientia Horticulturae* 277: 109843.
- Hughes, C.E.; Govindarajulu, R.; Robertson, A.; Filer, D.L.; Harris, S.A.; Bailey, C.D. 2007. Serendipitous backyard hybridization and the origin of crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 14389–14394.
- Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; et al. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649.
- Kolassa, J.E.; Jankowski, S. 2014. *MultiNonParam-package R Documentation*. R Graphical Manual. (imsbio.co.jp). Accessed on 02 Nov. 2021.
- Leitch, A.R.; Leitch, I.J. 2008. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* 320: 481–483.
- Leitch, I.J.; Bennett, M.D. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 651–663.
- Leitch, I.J.; Johnston, E.; Pellicer, J.; Hidalgo, O.; Bennett, M.D. 2019. *Plant DNA C-values database*. Royal Botanical Gardens, Kew. (<https://cvalues.science.kew.org>). Accessed on 01 Nov. 2021.

- Levis, C.; Costa, F.R.C.; Bongers, F.; Peña-Claros, M.; Clement, C.R.; Junqueira, A.B.; et al. 2017. Persistent effects of pre-Columbian plant domestication on Amazonian forest composition. *Science* 355: 925–931.
- Li, P.S.; Thomas, D.C.; Saunders, R.M.K. 2017. Historical biogeography and ecological niche modelling of the Asimina-Dissepalum clade (Annonaceae): Role of ecological differentiation in Neotropical-Asian disjunctions and diversification in Asia. *BMC Evolutionary Biology* 17: 1–18.
- Lins, J.; Lima, H.P.; Baccaro, F.B.; Kinupp, V.F.; Shepard Jr, G.H.; Clement, C.R. 2015. Pre-Columbian floristic legacies in modern homegardens of Central Amazonia. *PLoS One* 10: e0127067.
- Liu, S.; Liu, Y.; Yang, X.; Tong, C.; Edwards, D.; Parkin, I.A.P.; et al. 2014. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nature Communications* 5: 1–11.
- Lorenzoni, R.M. 2016. *Evidências cariotípicas e moleculares da hexaploidia em Annona mucosa*. Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, 49p.
- Maas, P.; Lobão, A.Q.; Rainer, H. 2015. *Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110252>). Accessed on 20 Aug. 2019.
- Maas, P.J.M.; Westra, L.Y.Th.; Brown, K.S.Jr.; Welle, B.J.H. ter; Webber, A.C.; Thomas, A.L.; et al. 1992. Rollinia. *Flora, Neotropica, Monograph* 62: 1–188.
- Martin, C.; Viruel, M.; Lora, J.; Hormaza, J.I. 2019. Polyploidy in fruit tree crops of the genus *Annona* (Annonaceae). *Frontiers in Plant Science* 10: 99.
- McKight, P.E.; Najab, J. 2010. Kruskal-Wallis Test. In: Weiner, I.B.; Craighead, W.E. (Eds.), *The Corsini Encyclopedia of Psychology*, New York, p.1413.
- Meyer, R.S.; Duval, A.E.; Jensen, H.R. 2012. Patterns and processes in crop domestication: An historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. *New Phytologist* 196: 29–48.
- Miller, M.A.; Pfeiffer, W.; Schwartz, T. 2011. The CIPRES science gateway: A community resource for phylogenetic analyses. *Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference: Extreme Digital Discovery*: 1–8.
- Moraes, A.P.; Vatanparast, M.; Polido, C.; Marques, A.; Souza, G.; Fortuna-Perez, A.P.; et al. 2020. Chromosome number evolution in dalbergioid legumes (Papilionoideae, Leguminosae). *Brazilian Journal of Botany* 43: 575–587.



- Morawetz, W. 1984. Karyologie, ökologie und evolution der gattung *Annona* (Annonaceae) in Pernambuco, Brasilien. *Flora* 175: 435–447.
- Morawetz, W. 1986a. Systematics and karyoevolution in Magnoliidae: Tetrameranthus as compared with other Annonaceae genera of the same chromosome number. *Plant Systematics and Evolution* 154: 147–173.
- Morawetz, W. 1986b. Remarks on karyological differentiation patterns in tropical woody plants. *Plant Systematics and Evolution* 152: 49–100.
- Paradis, E.; Claude, J.; Strimmer, K. 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289–290.
- Paterson, A.H. 2005. Polyploidy, evolutionary opportunity, and crop adaptation. In: Mauricio, R. (Ed.), *Genetics of Adaptation*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p.191–196.
- Patiño, V.M.R. 2002. *Historia y dispersion de los frutales nativos del Neotrópico*. CIAT, Cali, Colombia, 655p.
- Pecinka, A.; Fang, W.; Rehmsmeier, M.; Levy, A.A.; Scheid, O.M. 2011. Polyploidization increases meiotic recombination frequency in *Arabidopsis*. *BMC Biology* 9: 1–7.
- R Core Team. 2014. *R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, .
- Rainer, H. 2007. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A. St.-Hil. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie* 108: 191–205.
- Rambaut, A. 2009. *FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees*. Institute of Evolutionary Biology University of Edinburgh. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Accessed on 09 Nov. 2021.
- Rambaut, A.; Drummond, A.J. 2013. *Tracer v1.6*. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>). Accessed on 09 Nov. 2021.
- Renny-Byfield, S.; Wendel, J.F. 2014. Doubling down on genomes: Polyploidy and crop plants. *American Journal of Botany* 101: 1711–1725.
- Revell, L.J. 2012. Phytools: An R package for phylogenetic comparative biology. *Methods in Ecology and Evolution* 3: 217–223.
- Ribeiro, L.R. 2012. *Citogenética e efeitos citogenotóxicos de Annona crassiflora Mart. (Annonaceae)*. Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 93p.
- Rice, A.; Mayrose, I. 2021. Model adequacy tests for probabilistic models of chromosome-number evolution. *New Phytologist* 229: 3602–3613.

- Rice, A.; Glick, L.; Abadi, S.; Einhorn, M.; Kopelman, N.M.; Salman-Minkov, A.; et al. 2015. The Chromosome Counts Database (CCDB) – A community resource of plant chromosome numbers. *New Phytologist* 206: 19–26.
- Rice, A.; Šmarda, P.; Novosolov, M.; Drori, M.; Glick, L.; Sabath, N.; et al. 2019. The global biogeography of polyploid plants. *Nature Ecology and Evolution* 3: 265–273.
- Ronquist, F.; Teslenko, M.; van der Mark, P.; Ayres, D.L.; Darling, A.; Höhna, S.; et al. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Sader, M.A.; Amorim, B.S.; Costa, L.; Souza, G.; Pedrosa-Harand, A. 2019. The role of chromosome changes in the diversification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Systematics and Biodiversity* 17: 7–21.
- Salman-Minkov, A.; Sabath, N.; Mayrose, I. 2016. Whole-genome duplication as a key factor in crop domestication. *Nature Plants* 2: 1–4.
- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307–324.
- Segura, S.; Fresnedo, J.; Mathuriau, C.; López, J.; Andrés, J.; Muratalla, A. 2018. The edible fruit species in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 65: 1767–1793.
- Soares, J.D.R.; Dias, G. de M.G.; Rodrigues, F.A.; Pasqual, M.; Chagas, E.A. 2014. Caracterização anatômica e citométrica em biribazeiro (*Rollinia mucosa* [Jacq.]). *Revista Brasileira de Fruticultura* 36: 272–280.
- Soltis, P.S.; Marchant, D.B.; van de Peer, Y.; Soltis, D.E. 2015. Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Genetics & Development* 35: 119–125.
- Stebbins, G.L. 1947. Types of Polyploids: Their classification and significance. In: Demerec, M. (Ed.), *Advances in Genetics*, Academic Press, Berkeley, p.403–429.
- Tacuatiá, L.O.; Kaltchuk-Santos, E.; Souza-Chies, T.T.; Eggers, L.; Forni-Martins, E.R.; Pustahija, F.; et al. 2017. Physical mapping of 35S rRNA genes and genome size variation in polyploid series of *Sisyrinchium micranthum* and *S. rosulatum* (Iridaceae: Iridoideae). *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 151: 403–413.
- Urdampilleta, J.D.; Forni-Martins, E.R.; Ferrucci, M.S. 2020. Polyploidy in *Paullinia* (Paullinieae, Sapindaceae) and its systematic implications. *Systematic Botany* 45: 873–878.
- Vanhove, W. 2008. *Descriptors for cherimoya (Annona cherimola Mill.)*. Bioversity International, Rome, Italy, 49p.

VMABCC-BIOVERSITY. 2009. *Libro rojo de parientes silvestres de cultivos de Bolivia*.

PLURAL Editores, La Paz, Bolivia, 344p.

Wang, X.; Morton, J.A.; Pellicer, J.; Leitch, I.J.; Leitch, A.R. 2021. Genome downsizing after polyploidy: Mechanisms, rates and selection pressures. *The Plant Journal* 107: 1003–1015.

Zhang, K.; Wang, X.; Cheng, F. 2019. Plant polyploidy: Origin, evolution, and its influence on crop domestication. *Horticultural Plant Journal* 5: 231–239.

## 9. APÊNDICES

APÊNDICE A - Espécies do gênero *Annona* com informação citogenética (número de cromossomos, tamanho do genoma (picogramas)) e sobre domesticação (graus seguem Clement (1999): silvestre, incipiente, semi-domesticado e domesticado); dados ausentes (-).

Espécie	Número cromossômico	Conteúdo de DNA (1C)	Grau de domesticação
<i>Annona acutiflora</i> Mart.	2n = 2x = 14 <sup>a</sup>	-	-
<i>Annona ambotay</i> Aubl.	2n = 2x = 14 <sup>a</sup>	-	-
<i>Annona cacans</i> Warm.	2n = 2x = 14 <sup>b</sup>	1 <sup>h</sup>	-
<i>Annona cherimola</i> Mill.	2n = 2x = 14 <sup>b</sup>	1.7 <sup>g</sup>	Domesticada <sup>i</sup>
<i>Annona coriacea</i> Mart.	2n = 6x = 42 <sup>a</sup>	-	Silvestre <sup>j</sup>
<i>Annona crassiflora</i> Mart.	2n = 2x = 14 <sup>f</sup>	-	-
<i>Annona cuspidata</i> (Mart.) H. Rainer*	2n = 4x = 28 <sup>e</sup>	-	Incipiente Domesticada <sup>il</sup>
<i>Annona dioica</i> A. St.-Hil. *	2n = 2x = 14 <sup>a</sup>	-	-
<i>Annona emarginata</i> (Schltdl.) H. Rainer.*	2n = 2x = 14 <sup>c</sup>	1.68 <sup>g</sup>	Domesticada <sup>i</sup>
<i>Annona exsucca</i> DC. ex Dunal*	2n = 2x = 14 <sup>e</sup> 2n = 4x = 28 <sup>c</sup>	-	-
<i>Annona glabra</i> L.	2n = 4x = 28 <sup>b</sup>	1.30 <sup>h</sup>	Silvestre <sup>k</sup>
<i>Annona hispida</i> (Maas & Westra) H. Rainer*	2n = 4x = 28 <sup>e</sup>	-	-
<i>Annona hypoglauca</i> Mart.	2n = 2x = 14 <sup>c</sup>	-	-
<i>Annona jahnii</i> Saff.	2n = 2x = 14 <sup>c</sup>	-	-
<i>Annona jucunda</i> (Diels) H. Rainer*	2n = 2x = 14 <sup>e</sup> 2n = 4x = 28 <sup>c</sup>	-	-
<i>Annona lutescens</i> Saff.	2n = 4x = 28 <sup>b</sup>	1 <sup>h</sup>	Silvestre <sup>l</sup>
<i>Annona macrophyllata</i> Donn. Sm.	2n = 2x = 14 <sup>d</sup>	-	Domesticada <sup>ik</sup>

<i>Annona mammiifera</i> (Maas & Westra) H. Rainer*	$2n = 4x = 28^c$	-	-
<i>Annona montana</i> Macf.	$2n = 2x = 14^b$	-	Semi-domesticada <sup>i</sup>
<i>Annona monticola</i> Mart.	$2n = 4x = 28^c$	-	-
<i>Annona mucosa</i> Jacq.*	$2n = 4x = 28^c$ $2n = 6x = 42^c$	2.3 <sup>m</sup> 2.7 <sup>n</sup> 3 <sup>i</sup>	Domesticada <sup>i</sup>
<i>Annona muricata</i> L.	$2n = 2x = 14^b$	1.7 <sup>g</sup>	Domesticada <sup>i</sup>
<i>Annona neoinsignis</i> H. Rainer.*	$2n = 2x = 14^c$	-	-
<i>Annona neolaurifolia</i> H. Rainer.*	$2n = 4x = 28^b$	-	-
<i>Annona neosalicifolia</i> H. Rainer*	$2n = 6x = 42^g$	4.82 <sup>a</sup>	-
<i>Annona nítida</i> Mart.	$2n = 2x = 14^a$	-	-
<i>Annona papilionella</i> (Diels) H. Rainer*	$2n = 2x = 14^c$	-	-
<i>Annona prevostiae</i> H. Rainer	$2n = 2x = 14^d$	-	-
<i>Annona purpurea</i> Moc. & Sesse	$2n = 2x = 14^c$	-	Semi-domesticada <sup>i,k</sup>
<i>Annona reticulata</i> L.	$2n = 2x = 14^b$	1.3 <sup>h</sup>	Semi-domesticada <sup>i</sup>
<i>Annona salzmanni</i> A. DC.	$2n = 2x = 14^a$	-	-
<i>Annona scandens</i> Diels.	$2n = 2x = 14^c$	-	-
<i>Annona senegalensis</i> Pers.	$2n = 2x = 14^g$	1.7 <sup>g</sup>	-
<i>Annona squamosa</i> L.	$2n = 2x = 14^g$	1.2 <sup>g</sup> 1.63 <sup>h</sup>	Domesticada <sup>i</sup>
<i>Annona sylvatica</i> (A. St.-Hil.) Martius*	$2n = 8x = 56^c$	-	Silvestre <sup>l</sup>
<i>Annona tomentosa</i> R. E. Fr.	$2n = 2x = 14^c$	-	-
<i>Annona williamsii</i> (Rusby ex R.E.Fr.) H. Rainer*	$2n = 4x = 28^c$	-	-

<sup>a</sup> (Morawetz 1984), <sup>b</sup> (Morawetz 1986b), <sup>c</sup>(Morawetz 1986a), <sup>d</sup> (Goldblatt and Johnson 1994), <sup>e</sup> (Maas et al. 1992), <sup>f</sup> (Ribeiro 2012), <sup>g</sup> (Martin et al. 2019), <sup>h</sup> (Leitch et al. 2019), <sup>i</sup> (Patiño 2002), <sup>j</sup> (VMABCC-BIOVERSITY 2009), <sup>k</sup> (Escobedo-López et al. 2019), <sup>l</sup> (Segura et al. 2018), <sup>m</sup> (Soares et al. 2014), <sup>n</sup> (Lorenzoni 2016)

- O hífen na coluna dos graus de domesticação significa falta de informação, mas provavelmente represente silvestre.

\* Espécies do clado Rollinia

APÊNDICE B - Nomes das espécies e números de acesso GenBank de sequências de DNA usadas neste estudo. (-) dados ausentes.

Informações do voucher	Números de acesso do Genbank				
	<i>rbcL</i>	<i>trnL</i>	<i>matK</i>	<i>ndhf</i>	<i>psbA-trnH</i>
<i>Annona acuminata</i> Saff.	GQ981664	-	GQ981934	-	GQ982146
<i>Annona amazônica</i> R. E. Fr.	EU420853	EU420836	-	-	-
<i>Annona ambotay</i> Aubl.	-	-	-	-	KX248024
<i>Annona bicolor</i> Urb.	EU420854	EU420837	-	-	-
<i>Annona cherimola</i> Mill.	JX571777	KX663972	KM068848	KX663926	KX664018
<i>Annona conica</i> Ruiz & Pav. ex E.A. López	KX663909	KX664000	KX663871	KX663955	KX664042
<i>Annona coriacea</i> Mart.	MG718393	KP745618	MG718904	-	-
<i>Annona cornifolia</i> A. St.-Hil.	EU420855	-	-	-	-
<i>Annona crassiflora</i> Mart.	MG718271	-	MG718805	-	-
<i>Annona cuspidata</i> (Mart.) H. Rainer	EU420869	EU420851	MH024833	-	-
<i>Annona deceptrix</i> (Westra) H. Rainer	AY841595	AY841672	-	-	-

<i>Annona deminuta</i> R. E. Fr.	EU420857	EU420839	-	-	-
<i>Annona dolabripetala</i> Raddi.	MG833424	-	-	-	-
<i>Annona dumetorum</i> R. E. Fr.	EU420856	EU420838	GQ139704	-	GQ139844
<i>Annona edulis</i> (Triana & Planch.) H. Rainer	AY841655	AY841733	-	-	-
<i>Annona emarginata</i> (Schltdl.) H. Rainer.	MG718404	KX664004	MG718914	KX663961	KX664048
<i>Annona exsucca</i> DC. Ex. Dunai	-	-	-	-	KX248034
<i>Annona foetida</i> Mart.	-	-	-	-	KX248027
<i>Annona glabra</i> L.	AY841596	AY841673	GQ139717	EF179281	DQ125116
<i>Annona herzogii</i> (R. E. Fr.) H. Rainer	AY841656	AY841734	DQ125062	EF179308	-
<i>Annona holosericea</i> Saff.	EU420858	EU420840	-	-	HG963751
<i>Annona hypoglauca</i> Mart.	EU420859	EU420841	-	-	-
<i>Annona liebmanniiana</i> Baill.	KX663893	KX663982	KX663854	KX663936	KX664026

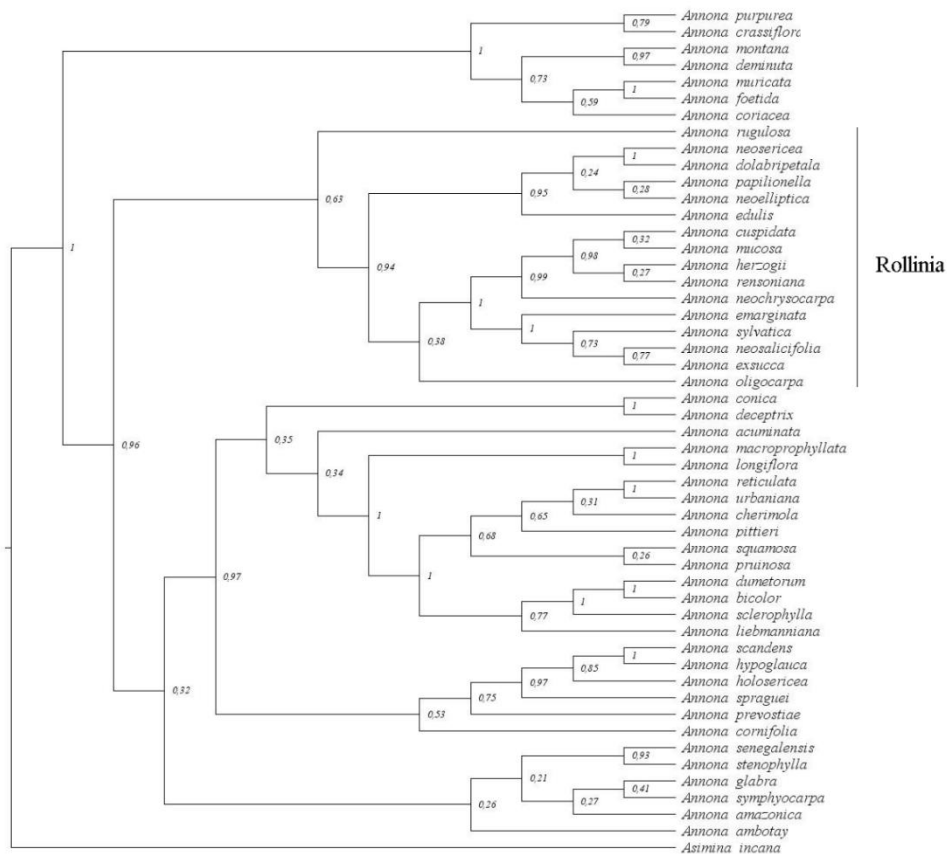
<i>Annona longiflora</i> S. Watson	KX663895	KX663984	KX663856	KX663938	KX664028
<i>Annona macrophyllata</i> Donn. Sm.	KM068880	KX663980	KM068859	KX663934	KX664024
<i>Annona montana</i> Macfad.	EU420860	EU420842	KX663867	KX663950	KJ426607
<i>Annona monticola</i> Mart.	-	-	-	-	-
<i>Annona mucosa</i> Jacq.	EU420870	EU420852	GQ139705	-	GQ139845
<i>Annona muricata</i> L.	AY743440	AY743459.2	AF543722	EF179282	AY841428
<i>Annona neochrysoarpa</i> H. Rainer	EU420868	EU420850	-	-	-
<i>Annona neoelliptica</i> H. Rainer & Maas	JQ626090	-	-	-	-
<i>Annona neosalicifolia</i> H. Rainer	KX663912	KX664003	KX663872	KX663957	KX664045
<i>Annona neosericea</i> H. Rainer	MG718042	-	MG718597	-	-
<i>Annona oligocarpa</i> R. E. Fr.	EU420861	EU420843	-	-	-
<i>Annona papilionella</i> (Diels.) H. Rainer	JQ590188	-	-	-	-

<i>Annona pittieri</i> Donn. Sm.	KX663898	KX663987	KX663858	KX663940	KX664029
<i>Annona prevostiae</i> H. Rainer	JQ625732	-	JQ626342	-	KX248029
<i>Annona pruinosa</i> G.E. Schatz	EU420862	EU420844	KX663861	KX663943	KX664031
<i>Annona purpurea</i> Moc. & Sesse	JQ590160	-	KM068866	KX663945	HG963551
<i>Annona rensioniana</i> (Standl.) H. Rainer	JQ594777	KX663994	KX663866	KX663949	KX664037
<i>Annona reticulata</i> L.	EU420863	EU420845	KM068850	KX663929	KX664020
<i>Annona rugulosa</i> (Schltdl.) H. Rainer	JX880395	-	JX880394	-	-
<i>Annona scandens</i> Diels.	EU420864	EU420846	KP859349	-	-
<i>Annona sclerophylla</i> Saff.	-	GQ139892	GQ139718	-	GQ139858
<i>Annona senegalensis</i> Pers.	AY841597	AY841674	KX663870	KX663954	-
<i>Annona spraguei</i> Saff.	GQ981665	-	GQ981935	-	GQ982147
<i>Annona squamosa</i> L.	EU420865	KT452845	EU715064	KT452834	EU715086

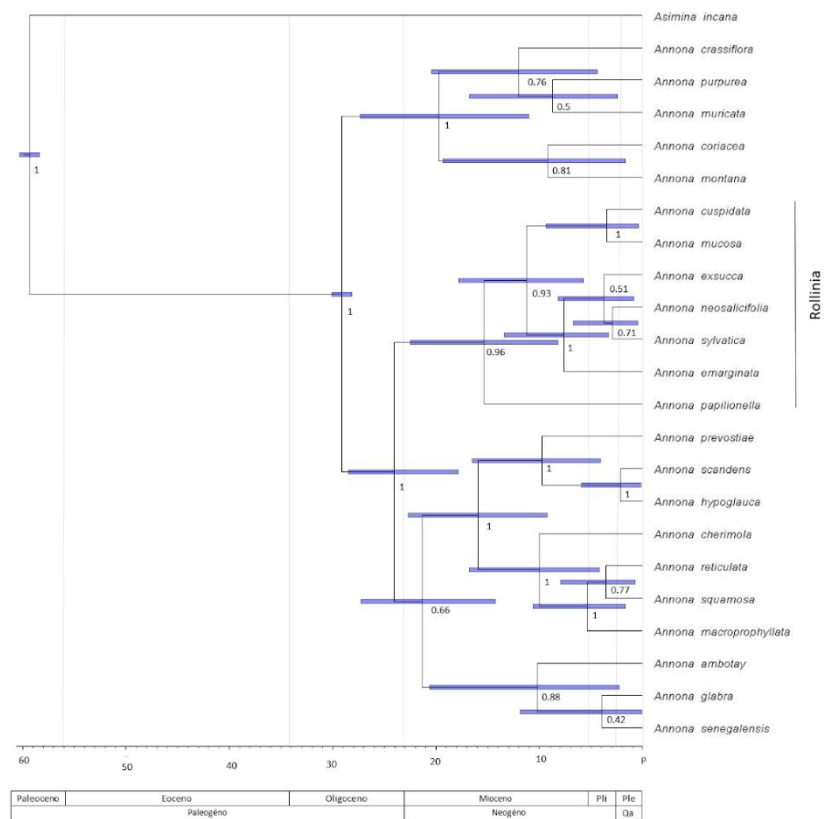


<i>Annona stenophylla</i> Engl. & Diels	MN166726	-	KX146231	-	-
<i>Annona sylvatica</i> (A. St.-Hil.) Martius	MG718043	-	MG718915	-	-
<i>Annona symphyocarpa</i> Sandwith	EU420866	EU420848	-	-	-
<i>Annona urbaniana</i> R. E. Fr.	EU420867	EU420849	-	-	-

APÊNDICE C - Árvore filogenética do gênero *Annona*. Árvore baseada nas sequências plastidiais: *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH*, *trnL* e *nadH*. O número à frente dos nós representa a probabilidade posterior da análise bayesiana.



APÊNDICE D - Cronograma do gênero *Annona* extraído da árvore de credibilidade máxima do clado (MCC) da análise BEAST. Os nós representam as idades médias posteriores (Milhões de anos atrás). As barras azuis nos nós representam os intervalos de *highest posterior density* - HPD de 95 %. Números nos nós representam probabilidades bayesianas posteriores (PP).



APÊNDICE E. Estimativas de pontuação *Log-likelihood* e *Akaike information criterion* (AIC) para o conjunto de dados analisado pelo software ChromEvol para a filogenia.

Modelo	Log-likelihood	AIC
CONST_RATE	-57.43	120.9
CONST_RATE_DEMI	-32.8	71.6
CONST_RATE_DEMI_EST	-32.6	73.2
CONST_RATE_NO_DUPL	-74.17	152.3
LINEAR_RATE	-65.5	141
LINEAR_RATE_DEMI	-66.35	142.7
LINEAR_RATE_DEMI_EST	-65.91	143.8
LINEAR_RATE_NO_DUPL	-68.46	144.9
BASE_NUMBER	-29.84	69.67
BASE_NUMBER_NO_DUPL	-29.96	67.93