

Sistemática filogenética de *Pterocaulon* e *Wunderlichia* (Asteraceae)

Pesquisador responsável: Dr. João Semir

Universidade Estadual de Campinas

Resumo

A grande variabilidade morfológica que as plantas apresentam permite a caracterização e o reconhecimento das espécies, constituindo assim, a base da taxonomia. O número de caracteres utilizados para o reconhecimento das espécies aumentou muito ao longo da história da classificação dos organismos e, nas últimas décadas este acréscimo foi ainda maior devido aos avanços oriundos de estudos moleculares. Atualmente técnicas utilizando dados moleculares associados aos dados morfológicos são excelentes fontes de informação para os estudos de evolução e reconstrução filogenética. Asteraceae é a maior família entre as Angiospermas, possui cerca de 24.000 espécies distribuídas em 1.600 gêneros de distribuição cosmopolita. Nos Neotrópicos a diversidade da família é de aproximadamente 580 gêneros e 8.040 espécies. Para o Brasil são referidas 1.960 espécies distribuídas em 288 gêneros, representando a terceira maior família de plantas com flores para o Brasil, colocando-o como um centro de diversidade das Asteraceae. O presente projeto faz parte dos estudos para o conhecimento da diversidade das Asteraceae brasileiras e tem como objetivo reconstruir hipóteses filogenéticas dos gêneros *Pterocaulon* e *Wunderlichia*, com base em dados moleculares, permitindo o estudo e interpretação da evolução de caracteres morfológicos importantes para a circunscrição desses gêneros. Para este propósito, além dos dados moleculares, serão utilizadas ferramentas, como o estudo taxonômico e cromossômico. Os resultados serão apresentados em forma de artigos, publicados em periódicos e também divulgados em reuniões científicas. O desenvolvimento deste projeto é importante, pois será realizado por meio de parcerias com pesquisadores de outras áreas da botânica sendo possível ampliar o conhecimento dos táxons em análise, contribuindo para melhorar a compreensão acerca da diversidade, biologia e conservação dos mesmos.

Phylogenetic Systematics of *Pterocaulon* and *Wunderlichia* (Asteraceae)

Encharged Researcher: Dr. João Semir

University of Campinas

Abstract

The great morphological variability of plant allows the characterization and identification of species, forming the basis of taxonomy. The number of characters used for recognition of species increased greatly over the history of classification of organisms and in recent decades, this increase was even greater because of advances coming from molecular studies. Currently techniques using molecular data associated with morphological data are excellent sources of information for studies of evolution and phylogenetic reconstruction. Asteraceae is the largest family of Eudicot Angiosperms with 24.000 species distributed in 1.600 genera. It is estimated that the diversity of the family in the Neotropics is approximately 580 genera and 8.040 species, while in Brazil 270 genera and 1960 species are referred, which places it as an important center of diversity of the family. Seeking to solve taxonomy and evolution questions, will be used new approaches associated with integrated interpretation of all the results. This project is part of studies on Brazilian Asteraceae diversity and aims to reconstruct the phylogeny of the genera *Pterocaulon* and *Wunderlichia*, and develop studies of character evolution, taxonomy and cytogenetic. Scientific papers and presentations at scientific meetings will be produced for dissemination of the results of this study. It also will expand the partnership with national and international institutions. This study will broaden the knowledge about the diversity of the family, evaluative history and conservation of the taxa. The results of this study will be added in the new projects, expanding the knowledge of the family.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistemática Filogenética

A grande variabilidade morfológica que as plantas apresentam permite a caracterização e o reconhecimento das espécies, constituindo assim, a base da taxonomia. O número de caracteres utilizados para o reconhecimento das espécies aumentou muito ao longo da história da classificação dos organismos e, nas últimas décadas este acréscimo foi ainda maior devido aos avanços oriundos de estudos moleculares (Judd *et al.* 2002), o que têm alterado em muito o posicionamento dos táxons nos diversos níveis taxonômico, em especial ordens e famílias (APGII 2003). Por esta razão, a realização de trabalhos de sistemática depende cada vez mais desta importante ferramenta, que em combinação com a metodologia taxonômica tradicional possibilita a produção de classificações mais sólidas.

Além da importância para a sistemática, as filogenias constituem uma ferramenta importante para estudos biogeográficos e evolutivos. Pois, possibilita traçar a evolução de caracteres selecionados, bem como determinar o estado ancestral de caracteres de interesse (Carpenter 2005; Harrison *et al.* 2005). Além disso, as filogenias possibilitam determinar centros de dispersão e estudar os processos históricos envolvidos na distribuição atual de espécies (Brooks & McLennan 2001; Graham *et al.* 2004; Sanderson *et al.* 2004; Winkworth & Donoghue 2005).

A combinação de mapas de distribuição de espécies com filogenias também têm sido de grande valia para a conservação, por favorecer melhor interpretação para a seleção de áreas prioritárias para a conservação (Sinclair *et al.* 2005; Rodrigues *et al.* 2005), assim como estimar o potencial de espécies para a restauração de áreas degradadas (Lesslie 2001) e, a detecção de espécies invasoras potenciais com base em um contexto histórico (Peterson 2003).

Outra ferramenta que vem sendo utilizada e tem contribuído em muito para a sistemática vegetal é o uso de técnicas de citogenética molecular, como a de hibridação de DNA *in situ* (FISH) que tem facilitado a caracterização cariotípica de diversos grupos taxonômicos, permitindo localizar sequências específicas de DNA e RNA ao longo dos cromossomos e no núcleo interfásico (Heslop-Harrison *et al.* 1991). Essa técnica possibilita a distinção entre espécies, bem como a caracterização de citótipos e de possíveis híbridos e de seus parentais (Guerra 1988; Schwarzacher *et al.* 1980; Snowdon *et al.* 2002). As principais sequências de DNA repetitivo utilizadas na citogenética vegetal são as que codificam os genes de DNA ribossômicos 45S (18S-5,8S-26S) e 5S, de telômeros e microssatélites, além de alguns grupos de DNA satélites (Sumner 1972; Heslop-Harrison *et al.* 1991). O DNA satélite é um tipo de DNA altamente repetitivo cujas unidades são repetidas em tandem e que pode ser espécie ou gênero - específico (Hemleben *et al.* 2007).

Diante do exposto, conclui-se que a sistemática representa a base para os estudos citogenéticos, biogeográficos, evolutivos e da biologia da conservação. Contudo, todos esses estudos dependem de filogenias robustas e informações precisas sobre a morfologia, distribuição e biologia das espécies (Soltis *et al.* 1999; Brooks & McLennan 2001; Graham 2004).

1.2. Asteraceae

Mesmo sendo considerada a maior família dentre as angiospermas, Asteraceae é reconhecida e diagnosticada como grupo monofilético por sinapomorfias morfológicas, químicas e moleculares (Cronquist 1988; Jansen & Palmer 1987; Kim *et al.* 1992; Bremer 1994; Lundberg & Bremer 2002; Panero & Funk 2002; Funk *et al.* 2009).

Asteraceae possui cerca de 24.000 espécies distribuídas em 1.600 gêneros (Funk *et al.* 2009), sendo o grupo mais diverso dentre as Eudicotiledôneas (Stevens 2001) e representando cerca de 1/10 de todas as Angiospermas. A família possui distribuição geográfica cosmopolita, ocorrendo em todos continentes, com exceção do Antártico (Bremer 1994, Funk *et al.* 2005).

DeVore & Stuessy (1995) referiram que esta alta diversidade presente na família está relacionada à ocorrência de metabólitos secundários muito ativos, associados à presença de mecanismos muito eficientes de polinização e dispersão.

A diversidade da família nos Neotrópicos é estimada em cerca de 580 gêneros e 8.040 espécies (Pruski & Sancho 2004), enquanto que na América do Sul seus membros estão representados por cerca de 30% da diversidade genérica e 50% da diversidade específica (Bremer 1994). Em regiões áridas como a patagônia os representantes da família correspondem a 20% da flora (Cabrera 1978). Para Brasil, cuja flora tem Asteraceae como a terceira maior família de plantas com flores, foram listadas 1.966 espécies distribuídas em 288 gêneros (Nakajima *et al.* 2010), colocando o Brasil como um centro de diversidade da família.

A família é muito diversificada e apresenta morfologia e taxonomia bastante complexa, o que a primeira vista dificulta e é um obstáculo para o estudo do grupo, no entanto, essa diversidade morfológica muitas vezes auxilia na identificação de alguns táxons, especialmente de tribos.

1.3. Sistemática de Asteraceae

Cassini (1819) é reconhecido por diversos autores (King & Dawson 1975, King *et al.* 1995a,b; Bremer 1994) como o primeiro autor a propor um sistema de classificação para a família.

Durante o período de 1812-1821, Henry Cassini publicou dezenas de artigos descrevendo diversos gêneros, revisando outros e estabelecendo tribos. No seu sistema de classificação, a família foi organizada em 20 tribos, muitas das quais reconhecidas até hoje. Outros sistemas que merecem destaque são os de Lessing (1832); De Candolle (1836); Bentham (1873); Hoffmann (1890); Cronquist (1977); Jeffrey (1978) e Bremer (1994).

Com os avanços da biologia molecular, na década de oitenta começaram os estudos moleculares na família, sendo um dos primeiros o de Jansen & Palmer (1987), no qual verificaram a semelhança entre a organização da estrutura do DNA do cloroplasto dos membros da subtribo Barnadesiinae (tribo Mutisieae *s.l.*), com outros representantes das Angiospermas. Observaram também que todos os outros membros de Asteraceae apresentam reversão nessa região do DNA. Desta forma, propuseram a subtribo Barnadesiinae como o grupo irmão de todas as Asteraceae. Esta hipótese também teve sustentação na análise cladística baseada em dados morfológicos, realizada por Bremer (1987). Posteriormente, Bremer & Jansen (1992) elevaram as Barnadesiinae à subfamília.

Em estudos subsequentes (Bremer 1994; Jeffrey 1995), as subfamílias Barnadesioideae e Asteroideae foram consideradas monofiléticas, enquanto que Cichorioideae aparece como parafilética. Posteriormente, Bremer (1996) reconheceu quatro subfamílias em Asteraceae: Barnadesioideae, Carduoideae, Cichorioideae e Asteroideae.

Panero & Funk (2002) realizaram um estudo filogenético com base em seqüências de DNA do cloroplasto a fim de esclarecer as relações filogenéticas na subfamília Cichorioideae, ainda considerada parafilética. Os resultados obtidos forneceram suporte para propor uma nova classificação para a família, que passou a abrigar 11 subfamílias e 35 tribos. Sendo que as mudanças mais expressivas ocorreram na tribo Mutisieae *sensu* Bremer (1994), em que, vários de seus táxons foram elevados à subfamília.

Posteriormente, também com base em dados moleculares foram estabelecidas mais duas subfamílias: Stiffioideae e Wunderlichioideae, além de três tribos: Hyalideae, Onoserideae e Wunderlichieae (Panero & Funk 2007).

Com os estudos moleculares, as mudanças ocorreram em vários níveis taxonômicos dentro da família. Dentre os numerosos táxons tradicionalmente aceitos como naturais e que tiveram sua circunscrição alterada com as filogenias moleculares, está Inuleae, posicionada em Asteroideae por diversos autores (Cronquist 1976; Wagenitz 1976; Jeffrey 1978). A classificação mais aceita para essa tribo foi estabelecida por Merxmüller *et al.* (1977), que reconheceram três subtribos: Inuliinae, Gnaphaliinae e Anthixiinae, apesar dos próprios autores reconhecerem as dificuldades na delimitação dos gêneros. Anderberg (1989) realizou um estudo filogenético com base em caracteres morfológicos, nessa filogenia, os representantes de Inuleae emergiram em três clados distintos.

Assim sendo, o autor apresentou uma nova circunscrição para a tribo, restabeleceu Gnaphalieae Rydb. e propôs a tribo Plucheae (Benth.) A. Anderb. No entanto, essa classificação não foi sustentada nas análises filogenéticas com dados moleculares, uma vez que os representantes de Inuleae e Plucheae emergiram juntos, constituindo um grupo monofilético (Kim & Jansen 1995; Bayern & Star 1998; Eldenäs *et al.* 1999). Entretanto, nessas filogenias a quantidade de táxons amostrados foi muito pequena. Posteriormente, foi realizada outra análise molecular, utilizando-se uma amostragem maior de táxons e, novamente os representantes de Inuleae e Plucheae emergiram em um mesmo clado, corroborando assim com o monofiletismo do grupo (Anderberg *et al.* 2005). Diante dessas evidências, Anderberg & Eldenäs (2007) propuseram a inclusão de Plucheae como uma subtribo de Inuleae.

Atualmente, Asteraceae está dividida em 12 subfamílias e 43 tribos, sendo que alguns dos clados basais, sustentados por dados moleculares, ainda são pouco caracterizados morfológicamente, como as tribos Stifftieae, Hyalideae, Gochnatieae e a subfamília Wunderlichioideae (APGIII 2009; Panero & Funk 2008; Funk *et al.* 2009). Assim sendo, para o entendimento da evolução da família são necessários mais estudos para investigar novos caracteres morfológicos e moleculares que permitam preencher as lacunas ainda existentes.

1.4. Caracterização geral dos gêneros *Pterocaulon* e *Wunderlichia*

O gênero *Pterocaulon* está representado por ervas ou subarbustos, normalmente cobertos por indumento lanoso, tomentoso ou glanduloso-pubescente; ramos eretos, cilíndricos, freqüentemente alados; xilopódio geralmente presente. As folhas são sésseis, alternas, em geral inteiras, lâmina linear, estreito-ovada, elíptica a obovada, cartácea, face abaxial lanosa, base decurrente nos ramos, formando alas, margem denteada. Inflorescências constituídas por capítulos sésseis, heterógamos, disciformes, dispostos em espigas de glomérulos, glomérulos de segunda ordem ou panículas de espigas; involúcro normalmente campanulado, multisseriado, brácteas involucrais imbricadas, subcoriáceas ou escariosas, externas lanosas, internas geralmente glabras e caducas; receptáculo plano a ligeiramente côncavo, hirsuto ou glabro, epaleáceo. Flores periféricas numerosas, pistiladas, corola filiforme, 2-3-denteadas; flores centrais poucas, geralmente 1, monoclinas ou estaminadas, corola tubulosa, 5-laciniada; anteras com apêndice estreito-ovado, base sagitada; ramos do estilete agudo e pilosos. Cipselas elipsóides, fusiformes ou obcônicas, às vezes levemente comprimidas, costadas, pubescentes; pápus cerdoso, unisseriado a multisseriado, cerdas livres, delgadas e escabras.

Pterocaulon possui cerca de 20 espécies de distribuição disjunta, com um centro de diversidade nas Américas e outro na Australásia. As espécies americanas ocorrem deste o sul dos

Estados Unidos até a região central da Argentina. As espécies de *Pterocaulon* são mais frequentes em ambientes campestres, sendo encontradas também em trilhas e bordas de mata. Para o Brasil são referidas 11 espécies (Nakajima *et al.* 2010), colocando o país como um centro de diversidade do gênero. Das espécies que ocorrem no Brasil, *Pterocaulon lanatum* Kuntze e *Pterocaulon virgatum* (L.) DC. apresentam ampla distribuição e são consideradas plantas ruderais (Lorenzi 2008).

Na última revisão taxonômica do gênero, Cabrera & Ragonese (1978) propuseram quatro seções em *Pterocaulon*: *Lanatocaulon* com uma espécie restrita a província do Chaco; *Monenteles* com seis espécies ocorrentes na Austrália e leste Asiático; *Pterocaulon* com distribuição panamericana, constituída por 10 espécies e *Pterocaulopsis* com uma espécie restrita ao cone sul.

Pterocaulon está subordinado à tribo Inuleae e subtribo Plucheinae, sendo filogeneticamente relacionado aos gêneros *Pluchea* Cass., *Tessaria* Ruiz & Pav., *Stenachenium* Benth. e *Sphaeranthus* L. (Anderberg 1989; Anderberg 1991a,b; Anderberg *et al.* 2007, Anderberg *et al.* 2009, veja figura 1). O *Pterocaulon* também é morfologicamente semelhante aos gêneros africanos *Jeffreya* Wild. e *Neojeffreya* Cabrera, os quais foram segregados de *Pterocaulon*.

O gênero *Wunderlichia* compreende pequenas árvores ou arbustos. Por serem plantas adaptadas ao ambiente xerofítico apresentam indumento geralmente tomentoso. As folhas são alternas e decíduas. As inflorescências são curtas, condensadas ou laxas, constituídas de capítulos solitários ou numerosos. Os capítulos são homógamos, discóides e multifloros com involúcro campanulado, infundibuliforme ou globoso, composto de 5-10 séries de brácteas involucrais; receptáculo é plano-convexo e paleáceo, as páleas são inteiras ou bifurcadas. Flores com corola tubulosa, glabra, tubo estreito, curto ou longo e o limbo campanulado-oblongo, 5-laciniado, com lacínios espiralados; anteras com base sagitada e apêndice caudal livre; estilete cilíndrico, exserto com base clavada ou turbinado-bulbosa e ápice retuso. Cipselas oblongas, glabras ou tomentosas, 10-nervadas, presença de um disco colunar no ápice; pápus disposto em 3-4 séries, cerdas paleáceas e unidas em anel na base.

Wunderlichia é um gênero endêmico do Brasil, possui seis espécies de distribuição exclusiva nos ambientes xerofíticos, como os terrenos rochosos da Cadeia do Espinhaço, campos rupestres e cerrados arenoso-pedregosos dos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Barroso & Maguire 1973; Roque & Pirani 1997; Hind & Semir 1998).

Wunderlichia assemelha-se morfologicamente ao gênero *Stenopadus* S.F. Blake, sendo que as principais diferenças estão relacionadas à densidade de indumento no receptáculo e ao diâmetro da corola: em *Wunderlichia* o receptáculo é denso-paleáceo e a corola é estreita, enquanto que em *Stenopadus* o receptáculo é esparso-paleáceo e a corola é mais larga (Barroso & Maguire 1973).

Tradicionalmente, o gênero *Wunderlichia* é inserido na tribo Mutisieae *s.l.*, por diversos autores, dentre os quais Jeffrey (1967); Cabrera (1977) e Bremer (1994). Entretanto, nas filogenias recentes com base em dados moleculares (Fig. 2), o gênero é tratado como pertencente à tribo Wunderlichieae e tem como gêneros irmãos *Stenopadus* e *Stomatochaeta* Maguire & Wurdack, (Ortiz *et al.* 2009).

2. JUSTIFICATIVA

A sistemática é o cerne da biodiversidade e as principais temáticas como a diversidade, a classificação, a biogeografia e a filogenia, constituem a base para estudos de outras áreas da biologia. O conhecimento da biodiversidade, da distribuição e da história evolutiva dos táxons, contribui de uma maneira ou de outra, para todo o conhecimento biológico (Cracraft 2002).

Em um mundo onde a perda da biodiversidade ocorre em ritmo acelerado, a sistemática deve ser vista como uma ciência fundamental e importante que contribui para a prática da conservação (Cracraft 2002). Com o a redução dos habitats naturais, a sistemática é evidenciada como uma importante ferramenta para a conservação, sendo este um dos muitos argumentos em favor desta área do conhecimento da botânica (Prance 1994).

Atualmente técnicas utilizando dados moleculares associados aos dados morfológicos são excelentes ferramentas para os estudos de evolução e reconstrução filogenética. Desta forma, os dados de seqüências de DNA reúnem um grande número de caracteres, proporcionando uma alta resolução nas reconstruções filogenéticas, fornecendo, indiretamente, uma melhor interpretação da homologia entre os caracteres (Baldwin *et al.* 1995).

Devido ao grande número de espécies, a sua distribuição ampla e a alta representatividade na América do Sul, estudos em Asteraceae, especialmente os sistemáticos de cunho taxonômico e filogenéticos, se fazem necessários.

No Brasil, Asteraceae é muito diversificada e apresenta grande número de espécies endêmicas e raras. Das cerca de 1.960 espécies listadas, 1.200 são endêmicas e mais de 100 são raras (Nakajima *et al.* 2009). Dentre os táxons endêmicos, somente na Mata Atlântica existem sete gêneros e cerca de 250 espécies catalogadas; também são numerosas as espécies e alguns gêneros que são restritos dos cerrados e campos rupestres, como por exemplo, *Wunderlichia* (Barroso & Maguire 1973). Apesar da grande diversidade e endemismo de Asteraceae na flora brasileira, ainda são poucas as informações sobre a real diversidade e provavelmente esses números podem ser ampliados, com estudos mais precisos sobre a taxonomia dos diferentes táxons, permitindo melhor conhecimento dessa família tão importante.

Em relação ao gênero *Wunderlichia*, mesmo sendo endêmico do Brasil, ainda é pouco conhecido e o único tratamento geral com este táxon refere-se à revisão de Barroso & Maguire (1973). Além disso, nas coleções dos herbários, *Wunderlichia* está representado por pouquíssimos espécimes, possivelmente porque além de ser rara, a maioria dos representantes deste gênero são plantas robustas, lenhosas e nem sempre fáceis de coletar.

Mesmos conhecendo se pouco sobre a biologia e taxonomia de *Wunderlichia*, duas das seis espécies, são citadas como criticamente em perigo. Assim, após a conclusão do estudo sistemático de *Wunderlichia* será possível determinar o estado de conservação das espécies a partir do mapeamento das populações no campo. Desta forma, medidas de proteção/conservação poderão ser propostas com base nesses dados, além de favorecer o reconhecimento e correta identificação das espécies.

A partir de uma análise detalhada das espécies de *Wunderlichia*, características morfológicas serão levantadas e utilizadas em delimitações mais precisas. Dessa forma, questões referentes à filogenia dos gêneros *Wunderlichia*, *Stenopadus* e *Stomatochaeta* só poderão ser melhores interpretadas com o aprofundamento de estudos que utilizem novas ferramentas, especialmente as relacionadas à biologia molecular.

A grande variabilidade morfológica das espécies de *Pterocaulon*, a ausência de informações precisa sobre a morfologia, distribuição geográfica e taxonomia das espécies, em especialmente das espécies de ampla distribuição, fazem deste gênero um interessante objeto de estudo.

Apesar de o Brasil ser um centro de diversidade do gênero, é comum observar nos herbários o depósito de pouquíssimos vouchers de *Pterocaulon*, sendo mais frequente encontrar nas coleções vários espécimes de apenas uma ou duas espécies. Esse déficit, provavelmente reflete à ausência de coletas é a negligência dos coletores em relação às espécies herbáceas, uma vez que, a metodologia de amostragem utilizada em muitos trabalhos de levantamento florístico, em especial os realizados em formações de cerrado, geralmente não amostram as espécies herbáceas.

Outro ponto relevante em relação ao estudo de *Pterocaulon* é a pouca informação sobre a taxonomia do gênero, sendo extremamente difícil o reconhecimento dos táxons, uma vez que os caracteres morfológicos utilizados para o reconhecimento das espécies são imprecisos e, o único tratamento taxonômico completo para o gênero tem mais de trinta anos (Cabrera & Ragonese 1978).

O presente projeto está embasado em um trabalho de campo extenso e em uma metodologia padronizada, bem como parcerias com pesquisadores experientes das diversas áreas da Biologia Vegetal, envolvendo três Instituições bem conceituadas: a Universidade Estadual de Campinas, o Instituto de Botânica e o Swedish Museum of Natural History, o que contribuirá para um trabalho mais preciso e abrangente, permitindo melhor conhecimento, tanto morfológico quanto filogenético

dos gêneros em análise.

Assim sendo, o estudo das Asteraceae se faz de grande importância, principalmente pelo fato de ser a terceira maior família de plantas com flores do Brasil, sendo essa diversidade também encontrada no estado de São Paulo, segundo a recente listagem em preparação da família para a flora de São Paulo. Desta maneira, este estudo permitirá a atualização e o acúmulo de novas informações taxonômicas, morfo-anatômicas, citogenéticas e filogenéticas sobre os gêneros *Pterocaulon* e *Wunderlichia*, contribuindo para o conhecimento da biodiversidade na família Asteraceae.

3. OBJETIVOS

Diante do exposto, este projeto tem como principal objetivo conhecer a história evolutiva e caracterizar os gêneros *Pterocaulon* e *Wunderlichia*. Para tal fim, será feito uso de ferramentas da Biologia molecular e da citogenética:

- Filogenia

Reconstruir a filogenia dos gêneros *Pterocaulon* e *Wunderlichia*, com base em caracteres moleculares e morfológicos;

Testar a hipótese de monofiletismo de *Pterocaulon* e *Wunderlichia*;

Reconstruir os padrões de evolução morfológica em *Pterocaulon* e *Wunderlichia*;

- Citogenética

Determinar o número cromossômico de *Wunderlichia* e caracterizar a diversidade cariotípica das espécies, por meio de técnicas de coloração convencional e de bandamento e hibridização *in situ*.

4. DESAFIOS CIENTÍFICOS E MEIOS E MÉTODOS PARA SUPERÁ-LOS

Para superar os desafios expostos, será utilizada uma metodologia padronizada e embasada em trabalhos botânicos que já vêm sendo desenvolvidos em diversas famílias de plantas com flores. Desta maneira, para o sucesso e conclusão do presente projeto, serão realizados:

4.1. Levantamento bibliográfico

Para o levantamento bibliográfico, serão realizadas consultas em obras específicas para obtenção de referências bibliográficas sobre os táxons em estudo.

4.2. Viagens de coleta e processamento do material botânico

As coletas são essenciais para o estudo das características morfológicas dos táxons, além de enriquecer as coleções dos herbários, sendo indispensáveis para obtenção de material para as análises molecular e citogenética. Sendo assim, serão realizadas expedições de coleta em todas as áreas de ocorrência das espécies, priorizando-se as localidades onde foram coletados os espécimes-tipo. Desta forma, as expedições serão realizadas nos estados da Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins.

Durante as expedições de coleta serão feitas observações precisas das espécies no campo e anotações detalhadas de informações relativas às fenofases, hábito, altura do indivíduo, coloração das flores e observações ecológicas, além de documentação fotográfica.

Além de coletas de fragmentos de folhas armazenados em sílica para extração do DNA total, serão coletados espécimes para voucher, folhas e estruturas florais fixadas em meio líquido para posterior estudo em laboratório. Os procedimentos utilizados para coletas e herborização serão os usuais para os estudos em taxonomia de Angiospermas.

Os espécimes coletados serão herborizados e as exsicatas depositadas no herbário do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UEC) e as duplicatas serão distribuídas a outras instituições.

4.3. Consulta as coleções dos herbários

Serão consultados os acervos de alguns herbários brasileiros e estrangeiros, acrônimos segundo Thiers (2010), por meio de visitas ou solicitações de empréstimos das coleções. Desta forma, serão consultados os herbários da Bahia (ALCB, HUEFS), Distrito Federal (CEN, HEPH, IBGE, UB), Espírito Santo (CVRD, MBML), Goiás (HJ, HUEG, UEG, UFG), Minas Gerais (BHCB, BHZB, CESJ, ESAL, HUENG, GFJP, VIC OUPR), Rio de Janeiro (GUA, HB, R, RB, UFRJ) e São Paulo (ESA, HRCB, IAC, SP, SPF, UEC), além de consultas as coleções de alguns herbários da América do Sul (LP, SI, CORD, BAF, VEN, COL, LPB, BOL), australianos (PERTH, NSW, MEL, BRI, DNA, AD, CNS, CANB), europeus (B, BM, K, M, P, PR, G, GDC, S) e norte-americanos (US, NY e MO).

4.4. Estudo cromossômico

As análises cromossômicas serão feitas preferencialmente em mitose, para elaboração de cariótipos, utilizando técnicas de coloração convencional.

Serão analisadas todas as seis espécies de *Wunderlichia*, procurando estudar os espécimes provenientes de diversas populações.

As cipselas (frutos) serão coletadas, acondicionadas em sacos de papel e transportadas para o laboratório, onde serão colocadas para germinar em condições controladas de temperatura e luminosidade. As radículas emergidas serão pré-tratadas em agente anti-mitótico, como o 8-hidroxiquinoleína, colchicina ou paradiclorobenzeno, para obtenção de metáfases mitóticas em condições ideais para a elaboração de cariótipos.

As raízes serão fixadas em Carnoy (etanol absoluto: ácido acético glacial, 3:1), em temperatura ambiente por 24 horas, posteriormente estocadas em freezer. As preparações cromossômicas serão obtidas mediante o esmagamento de meristemas radiculares hidrolisados com ácido clorídrico ou solução enzimática (celulase 2% + pectinase 20%) e a coloração convencional será feita com Giemsa 2%, conforme o protocolo de Guerra (1983).

O cariótipo médio de cada espécie será baseado na medição de cromossomos de, pelo menos, dez células de cada espécie/população. Será utilizada como padrão a média da medida de cada par, incluindo o tamanho do cromossomo, posição centromérica e de constrições secundárias. A nomenclatura adotada para a morfologia cromossômica será a de Guerra (1986).

Para a caracterização do cariótipo serão utilizadas medidas como o CTC (comprimento total da cromatina), calculado através da soma do tamanho individual de todos os cromossomos; o IC (índice centromérico) de cada par cromossômico, calculado dividindo-se o tamanho do braço curto pelo tamanho individual do cromossomo e multiplicado por 100; e o TF (índice de assimetria), calculado através da soma de todos os índices centroméricos e dividindo-se pelo número total de cromossomos (Huziwara 1962).

Para a complementação cariotípica, algumas espécies serão submetidas às técnicas de bandamento C ligeiramente modificada (Schwarzacher *et al.* 1980) e com os fluorocromos CMA/DAPI, seguindo os procedimentos de Schweizer (1980, 1981). As informações cromossômicas obtidas mediante as técnicas de bandamento serão incorporadas aos cariótipos previamente obtidos mediante a coloração convencional.

Para a técnica de Hibridação *in situ* (HIS), será utilizado o protocolo de Leitch *et al.* (1994), em que as lâminas serão tratadas com Rnase 1% (1 Rnase: 99 2xSSC) pH 7,0, à 37°C por 1 hora. As lâminas serão lavadas em 2xSSC por 10 minutos sob agitação, mergulhadas em paraformaldeído 4% por mais 10 minutos, e depois lavadas novamente com 2xSSC. As lâminas serão imersas em álcool 70% por 5 min e em álcool 100% por mais 5 min. Após as lâminas estarem secas, a preparação será coberta pela mistura de hibridização. A mistura de hibridização é composta por formamida 100%, dextran sulfato 50%, 20xSSC, sonda (100-200ng μl^{-1}), DNA de bloqueio, SDS 10% e água. Depois de acrescentada a mistura de hibridização nas lâminas, estas serão colocadas

em um termociclador, sendo submetidas a três ciclos de 10min cada, às temperaturas de 90°C, 50°C e 38°C de 90°C. As lâminas serão então mantidas na estufa a 37°C, em câmara úmida e no escuro, por toda a noite.

Serão feitos os banhos pós-hibridação, primeiramente com 2xSSC a 42°C por 5 min, formamida 20% (20ml de formamida para 80ml de 0,1xSSC) a 42°C por 10 min, 0,1xSSC a 42°C por 5 min e outro novamente em 2xSSC a 42°C por 5 min, 4xSSC/Tween 20 0,2% a 42°C e outro com 4xSSC/Tween 20 0,2% à temperatura ambiente. Todos os banhos serão feitos sob agitação.

As lâminas serão tratadas com 100µl de BSA 5% por 5 min. Serão adicionados 50µl da solução de detecção, contendo 1:100 de avidina-FITC, e se contracorar os cromossomos com iodeto de propídio. A análise destas lâminas será feita em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX51, e as células fotografadas com sistema de captura de imagens Image-ProPlus versão 6.0. Na medida do possível, serão elaborados cariótipos, com o auxílio do Software MicroMeasure.

4.5. Estudo molecular

Extração: Para a extração do DNA total, fragmentos de folhas serão coletados e desidratados em sílica gel, de acordo com o protocolo de Chase & Hills (1991). Caso não seja possível obter material em sílica para todas as espécies, o DNA será extraído de amostras de herbário, especialmente para as espécies que não ocorrem no Brasil. Além disso, também será consultado o Genbank para aquisição das seqüências das espécies que já tenham suas seqüências depositadas. Para a extração do DNA total será utilizado o DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Co., Düsseldorf, Alemanha) tanto para folhas coletadas em sílica gel, quanto para as amostras provenientes de material herborizado.

Amplificação: Serão testados diferentes marcadores do DNA do cloroplasto e nuclear para amplificação, como por exemplo, *ndhF*, *trnH-psbA*, *trnL-F*, ITS, 5S-NTS e ETS, os que se mostrarem mais informativas, serão utilizadas para a reconstrução filogenética dos táxons em análise

Sequenciamento: Os produtos de PCR serão purificados com o Kit de purificação QIAquick (Qiagen. Düsseldorf, Alemanha). As seqüências serão então obtidas em seqüenciador automático. Todo o seqüenciamento para o estudo filogenético de *Wunderlichia* será realizado no laboratório de Biologia Molecular de Plantas e Genoma (CBMEG-Unicamp), já para o gênero *Pterocaulon*, a principio, essa etapa também será realizada no laboratório de Biologia Molecular de Plantas e Genoma (CBMEG-Unicamp) e posteriormente terá continuidade no laboratório de Sistemática Molecular do Museu Sueco de História Natural.

Análise filogenética: As seqüências serão montadas e editadas no software Staden Package Versão 2003.0b1 (Staden 1996) e alinhadas no software Clustal X (Thompson *et al.* 1997). Os softwares BioEdit 7.0.0 (Hall 1999) e MEGA4 (Tamura *et al.* 2007) serão utilizados para fazer ajustes manuais. A reconstrução da filogenia utilizará os métodos: Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e inferência Bayesiana (IB). As análises de máxima parcimônia (MP) serão conduzidas no software PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002) por meio de buscas heurísticas em TBR; para as análises de máxima verossimilhança (ML) utilizar-se-á o software RAxML (Stamatakis 2006) e para a inferência bayesiana (IB) o software MrBayes 3.0 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). Para testar a congruência dos dados provenientes dos diferentes *loci* será empregado o “incongruence length difference test” (Farris *et al.* 1994), implementado no software PAUP* 4.0b10. Para os métodos de MP e ML a sustentação dos clados será inferida através de *bootstrap* (Felsenstein 1985) com 1000 replicações, implementado no PAUP* 4.0b10. Para inferência Bayesiana a sustentação dos ramos será estimada através de probabilidades posteriores.

Mapeamento de caracteres morfológicos: Caracteres morfológicos de importância taxonômica para os táxons em análise serão selecionados e mapeados na filogenia a fim de analisar os estados de caracteres ancestrais, com o objetivo de entender os padrões de evolução morfológica dos gêneros em questão, buscando possíveis relações entre caracteres e aspectos ecológicos e/ou biogeográficos no grupo. Essa reconstrução será conduzida com uso do software Mesquite 2.72 (Maddison & Maddison 2009), sob o critério de verossimilhança.

5. SUBPROJETOS

5.1. Subprojeto I- Estudos Biossistemáticos de *Wunderlichia* Riedel ex Benth. & Hook. f. (*Mutisieae s.l.*, *Asteraceae*). Projeto de doutorado (Financiado pela FAPESP, proc. 08/58254-0)

Orientador: Dr. João Semir

Co-orientador: Dra. Rosângela Simão Bianchini (Instituto de Botânica)

Pós-graduanda: Msc. Fátima Otavina de Souza Buturi

Colaboradores: Dra. Adriana Hissae Hayashi (Instituto de Botânica)

Dra. Eliana Regina Forni Martins (UNICAMP)

Dra. Maria Amélia Vitorino Cruz-Barros (Instituto de Botânica)

Dra. Vanessa Mancuso Oliveira (UNICAMP)

Dra. Vera Nisaka Solferini (UNICAMP)

Este projeto de doutorado é interdisciplinar, envolve vários pesquisadores das diversas áreas da Biologia Vegetal, como a taxonomia, palinologia, anatomia, citogenética e biologia molecular, além da parceria com duas Instituições muito importantes, a Universidade Estadual de Campinas e

o Instituto de Botânica. Como esse é um projeto que já vem sendo desenvolvido, algumas etapas foram iniciadas e outras concluídas. Este projeto engloba vários estudos como:

Estudo polínico

O estudo polínico foi realizado no Instituto de Botânica, no Núcleo de Palinologia sob supervisão da Dra. Maria Amélia Vitorino Cruz-Barros. A parte laboratorial foi concluída e o artigo está em fase de redação final

Estudo morfo-anatômico

O estudo morfo-anatômico do limbo foliar está sendo desenvolvido no Instituto de Botânica, no Núcleo de Anatomia, em colaboração com a Dra Adriana Hissae Hayashi, que tem experiência em trabalhos com anatomia de Asteraceae.

Estudo cromossômico

O trabalho vem sendo desenvolvido no Laboratório de Biosistemática do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP, em colaboração com as Dras. Eliana Regina Forni Martins e Vanessa Mancuso Oliveira, ambas com vasta experiência em trabalhos com Asteraceae. Até o momento foram realizadas as análises cromossômicas de duas espécies *Wunderlichia azulensis* Maguire & G.M. Barroso e *W. mirabilis* Riedel ex Baker.

Estudo molecular

A obtenção dos dados moleculares está sendo realizado no laboratório de Diversidade Genética (IB-Unicamp) em colaboração com a Dra. Vera Nisaka Solferini, que já contribuiu com diversos trabalhos realizados pelo Departamento de Biologia Vegetal.

Para a análise molecular serão amostradas todas as espécies de *Wunderlichia* e como grupo externo será utilizado representantes de *Gochnatia* Kunth, *Stenopadus* S.F. Blake, *Stomatochaeta* Maguire & Wurdack, e *Stiffitia* J.C. Mikan, gêneros que tanto em estudos morfológicos (Barroso & Maguire 1973; Pruski 1991; Tellería 2008) quanto filogenéticos (Freire *et al.* 2002; Kim *et al.* 2002; Panero & Funk 2002, Funk *et al.* 2009) foram tratados como relacionados à *Wunderlichia*. Além desses táxons, também será utilizado um representante de *Barnadesia* Mutis ex L. f. (Barnadesieoideae).

Foram realizados alguns testes com marcadores moleculares do DNA do cloroplasto rpl32-trnL, utilizando se os primers rpl32-R e trnL(UAG) (Shaw *et al.* 2007) e o nuclear ITS, com os primers ITS5 e ITS4 (Baum *et al.* 1994; White *et al.* 1990).

Serão testados outros marcadores plâtídiais e nucleares e, os que se mostrarem mais informativas para esse gênero, serão utilizados na análise filogenética. A princípio, serão testados os marcadores do DNA do cloroplasto que foram utilizados em Asteraceae e se mostraram informativos, como *ndhF* e *trnL-F* (Fernández *et al.* 2001; Panero & Funk 2002; Hershkovitz *et al.* 2006; Panero & Funk 2007) e os nucleares 5S-NTS, ETS (Baldwin & Markos 1998; Clevinger & Panero 2000; Karaman-Castro, & Urbatsch 2009).

Para análise dos caracteres ancestrais, características morfológicas de importância taxonômica para *Wunderlichia* e os gêneros relacionados, como número, formato e textura das brácteas involucrais, tipo e densidade do indumento no receptáculo, formato, espessura e nervação da corola, serão selecionados e mapeados na filogenia a fim de reconstruir estados de caracteres ancestrais para entender os padrões de evolução morfológica nestes gêneros. Essa reconstrução, como mencionado na metodologia será conduzida com uso do software Mesquite 2.72, sob o critério de verossimilhança.

Tratamento taxonômico

O tratamento taxonômico está bem adiantado e as descrições foram elaboradas seguindo o modelo para publicação no periódico Systematic Botany Monographs. Até o momento foram realizadas as descrições de cinco espécies e ilustração de quatro espécies. O tratamento só será concluído quanto todos os estudos propostos estiverem prontos, assim os resultados obtidos serão incluídos nas descrições e nos comentários das espécies.

Os estados de conservação dos táxons estudados foram determinados de acordo com a metodologia da IUCN (2001). Durante o trabalho de coleta, as populações foram georreferenciadas com GPS (*Global Position System*) sendo essa informação utilizada para a confecção dos mapas de distribuição. As alterações antrópicas observadas nos habitats dos táxons estudados foram relatadas, de forma que possam ser estabelecidas medidas de controle. As espécies que não ocorrem dentro de unidades de conservação federais, estaduais ou municipais foram referenciadas.

5.2. Subprojeto II – Estudo Filogenético de *Pterocaulon* Elliott (Inulieae, Asteraceae)

Orientador: Dr. João Semir (Unicamp)

Pós-graduando: Msc. Marcelo Monge

Colaborador: Dr. Arne A. Anderberg (Swedish Museum of Natural History, Stockholm)

Os objetivos deste estudo são: inferir a filogenia do gênero *Pterocaulon*, com base em caracteres moleculares e morfológicos; testar a hipótese de monofiletismo de *Pterocaulon* e de suas seções; reconstruir os padrões de evolução morfológica em *Pterocaulon*;

A obtenção dos dados moleculares será realizada no laboratório de Sistemática Molecular do Museu Sueco de História Natural sob orientação do Dr. Arne A. Anderberg, especialista na tribo Inulieae com vasta experiência em taxonomia e sistemática filogenética. Esta nova parceria possibilitará a ampliação dos estudos sobre esta tribo tão pouco estudada no Brasil.

Para este estudo pretende-se amostrar todas as seções de *Pterocaulon* a fim de se reconstruir a filogenia baseada em caracteres moleculares e morfológicos. A priori foram escolhidos como grupo externo os gêneros *Neojeffreya* e *Jeffreya*, *Epaltes*, *Pluchea* e *Stenachenium*, todos representantes de Plucheinae, além de *Lucilia* (Inulinae), *Gamochaeta* (Gnaphalieae) e *Baccharis* (Astereae). Estes táxons foram selecionados com base em estudos filogenéticos prévios (Anderberg 1989; Anderberg 1991 a,b; Anderberg 2009; Eldenäs *et al.* 1999; Anderberg *et al.* 2009).

Para a análise filogenética, a princípio será testada a amplificação de diferentes regiões do DNA plastidial e nuclear, como por exemplo, *ndhF*, *trnH-psbA*, *trnL-F* e ITS. Após uma série de procedimentos serão selecionadas as regiões que apresentarem variações satisfatórias para o uso em reconstruções filogenéticas. A metodologia de análises de dados moleculares seguirá basicamente as enunciadas nos desafios científico, acima descritas, com possíveis alterações

Caracteres morfológicos de importância taxonômica para o grupo, como o tipo de inflorescências, o tipo de indumento e formato das brácteas, quantidade e tipo de flores no capítulo, serão selecionados e mapeados na filogenia a fim de reconstruir estados de caracteres ancestrais, com objetivo de entender os padrões de evolução morfológica dos gêneros em questão, buscando possíveis relações entre caracteres e aspectos ecológicos e/ou biogeográficos no grupo. À medida que o estudo for sendo desenvolvido, outros caracteres morfológicos poderão ser selecionados. A reconstrução será conduzida com uso do software Mesquite 2.72, sob o critério de verossimilhança.

6. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Como mencionado, esse é um projeto interdisciplinar que envolve três instituições e vários pesquisadores, por isso, para cada estudo proposto, será utilizado um laboratório como referido na metodologia. No entanto, boa parte do projeto será desenvolvida no Laboratório de Taxonomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) que dispõe de infra-estrutura adequada para a análise morfológica e identificação dos materiais, como bibliografias, lupas, microscópios, estufas e o acervo da coleção do herbário UEC. Toda a

análise molecular para o gênero *Wunderlichia* conduzida no laboratório de Diversidade Genética (IB-Unicamp), contando com todos os equipamentos necessários para se fazer a extração e amplificação do material genético. O seqüenciamento será terceirizado e realizado pelo laboratório de Biologia Molecular de Plantas e Genoma, CBMEG (Unicamp). O estudo citogenético será realizado no laboratório de Biossistemática do Departamento de Biologia Vegetal (UNICAMP) que possui toda a infra-estrutura adequada para o desenvolvimento das análises propostas. Para o gênero *Pterocaulon*, a análise molecular será iniciada no laboratório de Diversidade Genética (IB-Unicamp) e finalizada no laboratório de Sistemática Molecular do Museu Sueco de História Natural. O presente projeto terá duração de dois anos, seguindo o cronograma de atividades abaixo:

6.1. Cronograma de atividades

Ano	2011	2012	2012	2013
Atividades / Semestre	2º	1º	2º	1º
Levantamento bibliográfico				
Visitas aos herbários nacionais e da América do Sul				
Expedições de coleta				
Extração, amplificação e seqüenciamento				
Entrega do relatório científico parcial e prestação de contas				
Estágio no laboratório de Sistemática Molecular do Museu Sueco de História Natural e visita aos herbários estrangeiros				
Análises filogenéticas				
Participação em eventos e Congressos				
Redação do manuscrito para publicação				
Entrega do relatório científico final e prestação de contas				

7. DISSEMINAÇÃO E AVALIAÇÃO

Como principal resultado deste estudo serão produzidos artigos sobre a história evolutiva e biosistemática em *Pterocaulon* e *Wunderlichia*. Ao final deste projeto, serão redigidos pelo menos quatro artigos científicos relacionados à citogenética, Taxonomia e filogenia. Os resultados obtidos serão divulgados em reuniões científicas e congressos por meio de resumos e apresentações orais. Os artigos serão submetidos para publicação em periódicos científicos internacionais de ampla circulação, possibilitando assim, ampliar o conhecimento acerca das relações dentro das tribos Wunderlichieae e Inuleae, contribuindo para a sistemática de Asteraceae.

8. RESULTADOS PRELIMINARES

No X Congresso Latinoamericano de Botânica de 4 a 10 de outubro de 2010, realizado em La Serena no Chile foram apresentados dois trabalhos em forma de painel:

- “Morfologia polínica das espécies de *Wunderlichia* Riedel ex Benth. (Asteraceae)”, autoria de Souza-Buturi, F.O. & Cruz-Barros, M.A.V.
- “*Wunderlichia* Riedel ex Benth (Asteraceae): Um gênero endêmico do Brasil”, autoria de Souza-Buturi, F.O., Semir, J. & Bianchini, R.S.
- O estudo polínico das espécies de *Wunderlichia* foi finalizado e o artigo científico está em fase de redação final. Este artigo foi elaborado segundo as normas para submissão ao periódico Botanical Journal of the Linnean Society.

O tratamento taxonômico para o gênero *Wunderlichia* encontra-se bem adiantado. As descrições estão praticamente prontas com quatro espécies ilustradas, sendo necessário o acréscimo das informações obtidas nos outros estudos (cromossômico, anatômico e filogenético). Este artigo está sendo elaborado seguindo o modelo para publicação no periódico Systematic Botany Monographs.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderberg, A.A. 1989. Phylogeny and reclassification of the tribe Inuleae (Asteraceae). Canadian Journal of Botany, Ottawa 67: 2277-2296.
- Anderberg, A.A. 1991a. Taxonomy and phylogeny of the tribe Gnaphalieae (Asteraceae). Opera Botanica 104: 1–195.
- Anderberg, A.A. 1991b. Taxonomy and phylogeny of the tribe Plucheeae. Plant Systematics and

Evolution 176: 145–177.

- Anderberg, A.A.. 2009. Inuleae *In*: Pp. 667-680. V.A. Funk; A. Susanna; T.F. Stuessy & R.J. Bayer. Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. Viena: International Association for Plant Taxonomy.
- Anderberg, A.A.; Eldenäs, P.; Bayer, R.J. & Englund, M. 2005. Evolutionary relationships in the Asteraceae tribe Inuleae (Incl. Plucheae) evidenced by DNA sequences of *ndhF*, with notes on the systematic position of some aberrant genera. *Organism, Diversity and Evolution* 5: 135-146.
- Anderberg, A.A. & Eldenäs, P. 2007. Tribe Inuleae. Pp 374-391. *In*: Kubitzki, K, Kadereit, J.W. & Jeffrey, C. The families and Genera of Vascular Plants: Asterales. Berlin, Springer Verlag.
- Anderberg, A.A.; Baldwin, B.G.; Bayer, R.G.; Breitwieser, J.; Jeffrey, C.; Dillon, M.O.; Eldenäs, P.; Funk, V.; Garcia-Jacas, N.; Hind, D.J.N.; Karis, P.O.; Lack, H.W.; Nesom, G.; Nordestam, B.; Oberprieler, Ch.; Panero, J.L.; Puttock, C.; Robinson, H.; Stuessy, T.F.; Susanna, A.; Urtubey, E.; Vogt, R.; Ward, J. & Watson, L.E. 2007. Compositae. Pp. 61-588. *In*: Kadereit, J.W. & Jeffrey, C. (Eds.). The Families and Genera of Vascular Plants. Eudicots: Asterales, vol. VIII. Berlin: Springer Verlag.
- APG III- Angiosperm Phylogeny Group (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.
- Baldwin, B.G.; Sanderson, M.J.; Porter, J.M.; Wojciechowski, M.F.; Campbell, C.S.; Donoghue, M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- Baldwin, B.G. & Markos, S. 1998. Phylogenetic Utility of the External Transcribed Spacer (ETS) of 18S–26S rDNA: Congruence of ETS and ITS Trees of *Calycadenia* (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10 (3): 449-463.
- Barroso, G.M. & Maguire, B. 1973. A Review of the Genus *Wunderlichia* (Mutisieae, Compositae). *Revista Brasileira de Biologia* 33(3): 379-406.
- Baum, D.A.; Sytsma, K.J. & Hoch, P.C. 1994. A phylogenetic analysis of *Epilobium* (Onagraceae) based on nuclear ribosomal DNA sequences. *Systematic Botany* 19: 363-388
- Bayer, R.J. & Star, J.R. 1998. The phylogeny of Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the *trnL* intron and *trnL/trnF* intergenic spacer. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 242-256
- Bentham, G. 1873. Compositae. Pp.163-533. *In*: Bentham, G. & Hooker, W.J. (Eds.). *Genera Plantarum*, vol. 2. London: Reeve & Co.
- Bremer, K. & Jansen, R.K. 1992. A new subfamily of the Asteraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79: 414-415.
- Bremer, K. 1987. Tribal interrelationships of Asteraceae. *Cladistics* 3: 210-256.
- Bremer, K. 1994. Asteraceae- Cladistic & Classification. Portland: Timber press. 792p.
- Bremer, K. 1996. Major clades and grades of the Asteraceae. Pp.1-7. *In*: Hind, D.J.N., Beentje, H.J. (Eds.). Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae, Conference, vol. 1. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Brooks, D.R. & MacLennan, D.A. 2001. A comparison of a discovery-based and an event-based method of historical biogeography. *Journal of Biogeography* 28: 757-767.
- Cabrera, A.L. & Ragonese, A.M. 1978. Revisión del género *Pterocaulon* (Compositae). *Darwiniana* 21(2-4): 185-257.
- Cabrera, A.L. 1977. Mutisieae-Systematic review. Pp.1039-1066. *In*: Heywood, V.H., Harborne, J.B. & Turner, B.L. (Eds.). The Biology and Chemistry of the Compositae, vol. 2. London: Academic Press.
- Cabrera, A.L. 1978. Compositae. Flora de la Provincia de Jujuy. Colección Científica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina 13(10): 1-726.
- Carlquist, S. 1976. Tribal interrelationships and phylogeny of the Asteraceae. *Aliso* 8: 465-492.
- Carpenter, K.J. 2005. Stomatal architecture and evolution in basal angiosperms. *American Journal*

of Botany 92(10): 1595-1615.

- Cassini, H. 1819. Sur la famille des Synantherées, contenant les caractères des tribus. Journal de Physique, de Chimie, D'Histoire Naturelle et des Arts 88: 189-204.
- Chase, M.W. & Hills, H.G. 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of samples for DNA studies. Taxon 40: 215-220.
- Cracraft, J. 2002. The seven great questions of systematic biology: an essential foundation for conservation and the use of biodiversity. Annals of the Missouri Botanical Garden 89: 127-144.
- Cronquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. 2^o ed. New York, The New York Botanical Garden. 555p.
- Cronquist, A. 1977. The Compositae revisited. Brittonia 29: 137-153.
- De Candolle, A. P. 1836. Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis vol 5, Paris: Treuttel & Würtz. 692p.
- DeVore, M.L. & Stuessy, T.F. 1995. The place and Time of origin of Asteraceae, with additional comments on the Calyceraceae and Goodeniaceae. Pp. 23-40. In: Advances in Compositae Systematics. Hind, D.N.J.; Jeffrey, C & Pope, G.V. (Eds.). Kew: Richmond. Royal Botanical Gardens.
- Eldenäs, P.; Kallesrjö, M. & Anderberg, A.A. 1999. Phylogenetic placement and circumscription Inuleae s.str. and Plucheae (Asteraceae): evidence from sequences gene ndhF. Molecular Phylogenetics and Evolution 13: 50-58.
- Farris, J.S.; Kallersjö, M.; Kluge, A.G. & Bult, C. 1994. Testing significance on incongruence. Cladistics 10: 315-319.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Fernández, I.A.; Aguilar, J.F.; Panero, R.L. & Feliner, G.N. 2001. A Phylogenetic Analysis of *Doronicum* (Asteraceae, Senecioneae) Based on Morphological, Nuclear Ribosomal (ITS), and Chloroplast (trnL-F) Evidence. Molecular Phylogenetics and Evolution 20(1): 41-64.
- Freire, S.E.; Katinas, L. & Sancho, G. 2002. *Gochnatia* (Asteraceae: Mutisieae) and the Gochnatia complex: taxonomic implications from morphology. Annals of the Missouri Botanical Garden 89: 525-550.
- Funk, V.A.; Bayer, R.J.; Keeley, S.; Chan, R.; Watson, L.; Gemeinholzer, B.; Schilling, E.; Panero, J.L.; Baldwin, B.G.; Garcia-Jacas, N.; Susanna, A. & Jansen, R.K. 2005. Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of Compositae. Biologiske Skrifter Kongelige Danske Videnskabernes Selskab 55: 343-374.
- Funk, V.A.; Susanna, A.; Stuessy, T.F. & Robinson, H. 2009. Classification of Compositae. Pp.171-189. In: Funk, V.A.; Susanna A.; Stuessy, T.F. & Bayer, R.J. (Eds.). Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy.
- Graham, C.H.; Ron, S.R.; Santos, J.C.; Schneider, C.J. & Moritz, C. 2004. Integrating phylogenetics and environmental niche models to explore speciation mechanisms in dendrobatid frogs. Evolution 58: 1781-1793.
- Guerra, M. 1983. O uso de Giemsa em citogenética vegetal-comparação entre a coloração simples e o bandamento. Ciência e cultura 35: 190-193.
- Guerra, M. 1986. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* Revista Brasileira de Genética 9(4): 741-743.
- Guerra, M. 1988. Introdução à citogenética Geral. Rio de Janeiro. Editora Guanabara.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- Harrison, C.J., Corley, S.B., Moylan, E.C.; Alexander, D.L., Scotland, R.W. & Langdale, J.A. 2005. Independent recruitment of a conserved developmental mechanism during leaf evolution. Nature 434: 509-514.
- Hemleben, V.; Kovarik, A.; Torres-Ruiz, R.A.; Volkov, R.A.; Beridze, T. 2007. Plant highly repeated satellite DNA: distribution, molecular evolution and use for identification of hybrids.

Systematics and Biodiversity 5: 277-289.

- Hershkovitz, M.A.; Arroyo, M.T.K.; Charles Bell, C. & Hinojosa, F. 2006. Phylogeny of Chaetanthera (Asteraceae: Mutisieae) reveals both ancient and recent origins of the high elevation lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 594-605.
- Heslop-Harrison, J.; Heslop-Harrison, Y.; Cresti, M. & Ciampolini, F. 1991. Itrastructural features of pollen tubes of *Endymion nonscriptus* modified by cytochalasin D. *Sexual Plant Reproduction* 4: 73-80.
- Hind, D.J.N. & Semir, J. 1998. Typification of *Wunderlichia* (Compositae-Mutiseae). *Kew Bulletin* 53: 1011-1012.
- Hoffmann, O. 1890. Compositae. In: Engler, A. & Prantl, K. Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Verlag von Wilhelm Engelmann 4 (5): 87-391.
- Huziwaru Y. 1962. Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on the chromosomes of *Aster*. *American Journal of Botany* 49: 116-119.
- IUCN. 2001. IUCN Red list categories and criteria: version 3.1. Pp 1-30. In: IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge: United Kingdom.
- Jansen, R.K. & Palmer, J.D. 1987. A DNA chloroplast inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 5818-5822.
- Jeffrey, C. 1967. Notes on Compositae II. The Mutisieae in east tropical Africa. *Kew Bulletin* 21: 177-223.
- Jeffrey, C. 1977. Corolla forms in Compositae-some evolutionary and taxonomic speculations. Pp.111-118. In: Heywood, V.H.; Harbone, J.B. & Turner, B.L. (Eds.). *The Biology and chemistry of the Compositae*. London, Academic press.
- Jeffrey, C.J. 1978. Compositae. Pp. 263-268. In: *Flowering plants of the World*. Heywood, V.H. (Ed.). New York: Mayflower Books.
- Jeffrey, C.J. 1995. Compositae systematics 1975-1993. Developments and desiderata. In: *Advances in Compositae Systematics*. Hind, D.N.J.; Jeffrey, C & Pope, G.V. (Eds.). Kew: Richmond. Royal Botanical Gardens. Pp. 3-21.
- Jeffrey, C.J. 2007. Compositae: introduction with Key to Tribes. Pp. 61-86. In: Kadereit, J.W. & Jeffrey, C. (Eds.). *The families and Genera of Vascular Plants. Eudicots: Asterales*, vol. VIII. Berlin: Springer Verlag.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F. & Donoghue, M.J. 2002. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. 2^o ed. Sunderland: Sinauer.
- Karaman-Castro, V. & Urbatsch, L.E. 2009. Phylogeny of *Hinterhubera* Group and Related Genera (Hinterhuberinae: Astereae) Based on the nrDNA ITS and ETS Sequences. *Systematic Botany* 34(4): 805-817.
- Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. New York 27: 137-138.
- Kim, H.; Keeley, S.C.; Vroom, P.S. & Jansen, R.K. 1998. Molecular evidence for an African origin of the Hawaiian endemic *Hesperomannia* (Asteraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington 95: 15440-15445.
- Kim, H.; Loockerman, D.J. & Jansen, R. 2002. Systematic implications of ndhF sequence variation in the Mutisieae (Asteraceae). *Systematic Botany* 23(3): 598-609.
- Kim, K. & Jansen, R.K. 1995. ndhF sequence of evolution and the major clades in the sunflower family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 10379-10373.
- Kim, K.; Jansen, R.K. & Turner, B.L. 1992. Evolutionary implications of intraspecific chloroplast DNA variation in dwarf dandelions (*Krigia*: Asteraceae). *American Journal of Botany* 79(6): 708-715.
- King, R.M. & Dawson, H.W. 1975. *Cassini on Compositae I*. New York: Oriole Editions. 636p.
- King, R.M., Janaske, P.C. & Lellinger, D.B. 1995a. *Cassini on Compositae II*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Gardens 54: 189p.
- King, R.M., Janaske, P.C. & Lellinger, D.B. 1995b. *Cassini on Compositae III*. Monographs in

- Systematic Botany from Missouri Botanical Gardens 55: 507p.
- Leitch, A.R.; Schwarzacher, T.; Jackson, D. & Leitch, I.J. 1994. *In situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers LTD, Oxford.
- Lessing, C. F. 1832. Synopsis Generum Compositarum. Berlin: Duncker & Humboldt. 473p.
- Lesslie, L.G. 2001. Landscape classification and strategic assessment for conservation: an analyze of native cover loss in far south east Australia. *Biodiversity Conservation* 10: 427-442.
- Lorenzi, H. 2008. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4ª ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum. 640p.
- Lundberg, J. & Bremer, K. 2002. Phylogenetic study of the order Asterales using one large morphological and three molecular data sets. *International Journal of Plant Sciences* 164(4): 553-578.
- Maddison, W.P. & Maddison, D.R. 2009. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.72 <http://mesquiteproject.org>
- Merxmüller, H.; Leins, P. & Roessler, H. 1977. Inuleae—Systematic Review. Pp. 61-86. *In: Biology and Chemistry of Asteraceae* 1. Heywood, V.H. & Harbone, J.B. & Turner, B.L. (Eds.). London: Academic Press. x
- Nakajima, J.; Loeuille, B.; Heiden, G.; Dematteis, M.; Hattori, E.K.O.; Magenta, M.; Ritter, M.R.; Mondin, C.A.; Roque, N.; Ferreira, S.C.; Teles, A.M.; Borges, R.A.X.; Monge, M.; Bringel Jr., J.B.A.; Oliveira, C.T.; Soares, P.N.; Almeida, G.; Schneider, A.; Sancho, G.; Saavedra, M.M.; Liro, R.M.; Souza-Buturi, F.O.; Pereira, A.C.M.; Moraes, M.D. Asteraceae. 2010. *In: R.C. Forzza, J.F.A. Baumgratz; C.E.M. Bicudo; A.A. Carvalho Jr.; A. Costa; D.P. Costa; M. Hopkins; P.M. Leitman; L.G. Lohman; L.C. Maia; G. Martinelli; M. Menezes; M.P. Morin; M.A.N. Coelho; A. L. Peixoto; J.R. Pirani; J. Prado; L.P. Queiroz; V.C. Souza; J.R. Stehmann; L.S. Sylvestre; B.M.T. Walter & D. Zappi. Lista de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro.*
- Nakajima, J.N.; Teles, A.M.; Ritter, M.; Mondin, C.A.; Dematteis, M.; Heiden, G.; Borges, R.A.X.; Rivera, V. L.; Bringel Jr., J.B.A.; Saavedra, M.; Perreira, R.T.A. & Melo, M.R.C.S. 2009. Asteraceae. Pp 76-89. *In: Giulietti, A.M., Rapini, A., Andrade, M.J.G., de Queiroz, L.P. & da Silva, J.M.C. Plantas raras do Brasil. Conservation international & Universidade Estadual de Feira de Santana*
- Ortiz, S.; Bonifacino, J.M.; Crisci, J.V.; Funk, V.A., Hansen, H.V.; Hind, D.J.N.; Katinas, L.; Roque, N.; Sancho, G.; Susanna, A. & Tellería, M.C. 2009. The basal grade of Compositae: Mutisieae (*sensu* Cabrera) and Carduoideae. Pp 193-213. *In: V.A. Funk; A. Susanna; T.F. Stuessy & R.J. Bayer. Systematics, Evolution, and Biogeography o Compositae. Viena: International Association for Plant Taxonomy.*
- Panero, J. L. & Funk, V. A. 2007. New infrafamilial taxa in Asteraceae. *Phytologia*, 89 (3): 356-360.
- Panero, J.L. & Funk, .A. 2008. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of Asteraceae are revealed. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47 (2): 757-782.
- Panero, J.L. & Funk, V. 2002. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 115(4): 909-922.
- Peterson, A.T. 2003. Predicting the geography of species' invasions via ecological niche modeling. *Quarterly Review of Biology* 78: 419-433.
- Prance, G.T. 1994. Systematics and Conservation (P.L. Forey, C.J. Humphries and R.I. Vane-Wright eds.) 50: 145-163.
- Pruski, J.F. & Sancho, G. 2004. Asteraceae. Pp. 33-39. *In: N. Smith et al. (eds.). Flowering Plants of the Neotropics. Princeton University pres.*
- Pruski, J.F. 1991. Compositae of the Guayana Highland-V. The Mutisieae of the lost World of Brasil, Colombia and Guyana. *Boletim do Museu Paraense "Emilio Goeldi." Nova Serie, Botânica* 7: 335-392.
- Robinson, H. 1981. A revision of the tribal and subtribal limits in the Heliantheae (Asteraceae).

Smithsonian Contributions to Botany 51: 1-102.

- Robinson, H. 1992. Notes on *Lychnophorinae* from Minas Gerais, Brazil, a Synopsis *Lychnophoriopsis* Sch. Bip., and a new genera *Antheremanthus* and *Minasia* (Vernonieae: Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 105: 640-652.
- Rodrigues, A.S.L.; Brooks, T.M. & Gaston, K.J. 2005. Integrating phylogenetic diversity in the selection of priority areas. Pp.101-119. *In*: A. Purvis; J. Gittleman & T. Brooks (Eds.). *Conservation Biology 8: Phylogeny and conservation*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Roque, N. & Pirani, J.R. 1997. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Compositae- Barnadesieae e Mutisieae. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 16: 151-185.
- Sanderson, M.J.; Thorne, J.L.; Winkstrom, N. & Bremer, K. 2004. Molecular evidence on plant divergence times. *American Journal of Botany* 91: 1656-1665.
- Schwarzacher, T.; Ambros, P. and Schweizer, D. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analyses. *Plant Systematics and Evolution* 134: 293-97.
- Schweizer, D. 1980. Fluorescent chromosome banding in plants: Applications, mechanisms and implications for chromosome structure. Pp. 61-72. *In*: Davis, D.R & Hopwood, D.A. (Eds.). *The Plant Genome*. Norwich: The John Innes Charity.
- Schweizer, D. 1981. Counterstain-enhanced chromosome banding. *Human Genetics* 57: 1-14.
- Shaw, J.; Lickey, E.B.; Schilling, E.E.; Small, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275-288.
- Sinclair, E.A.; Pérez-Losada, M. & Crandall, K.A. 2005. Molecular phylogenetics for conservation biology. Pp.19-56. *In*: A. Purvis, J. Gittleman & T. Brooks (Eds.). *Conservation Biology 8: Phylogeny and conservation*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Snowdon R.J.; Friedrich T.; Friedt, W. & Köhler, W. 2002: Identifying the chromosomes of the A and C genome diploid *Brassica* species *B. rapa* (syn. *campestris*) and *B. oleracea* in their amphidiploid *B. napus*. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 533-538.
- Staden R. 1996. The Staden Sequence Analysis Package. *Molecular Biotechnology* 5: 233-241.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, Oxford, England 22: 2688-2690.
- Stevens, P. F. 2001 (onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008 [and more or less continuously updated since]. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Summer, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- Swofford, D.L. 2000. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4.0b. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24(8): 1596-1599.
- Tellería, M.C. 2008. Taxonomic significance of pollen types in the Guyana Highland-centred composite genera of Mutisioideae (Asteraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 156(2): 327-340.
- Thiers B. 2010. Índice herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's virtual herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/ih/>.
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Wagenitz, G. 1976. Systematic and Phylogeny of Compositae (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution*, 125:29-46.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. *In*: Innis, M.; Gelfand, D.; Sninsky, J.;

White, T. J. (Eds.). PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego, California: Academic Press.

Winkworth, R.C. & Donoghue, M.J. 2005. *Viburnum* phylogeny base on combined molecular data: implications for taxonomy and biogeography. American Journal of Botany 92: 653-666.

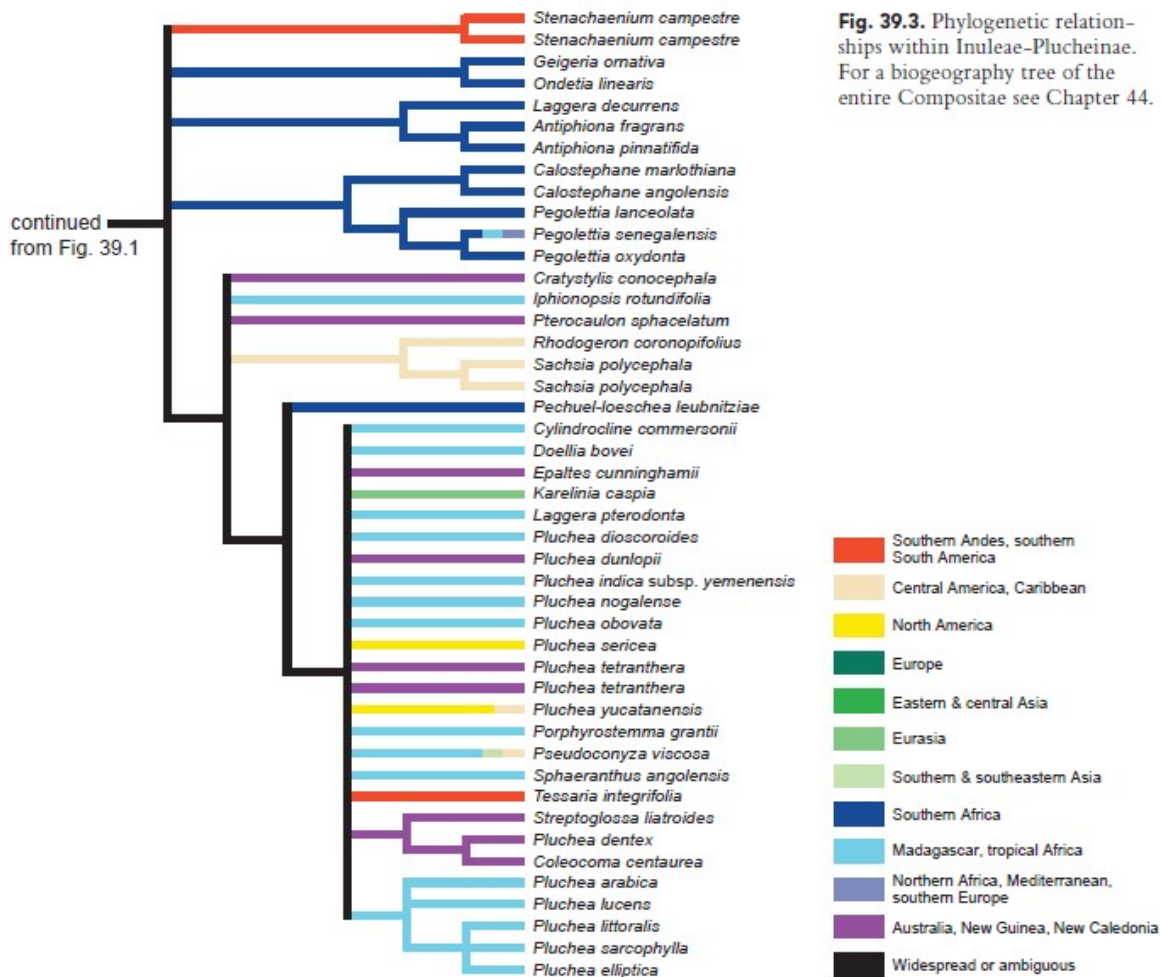


Figura 1: Árvore filogenética retirada de Anderberg (2009)

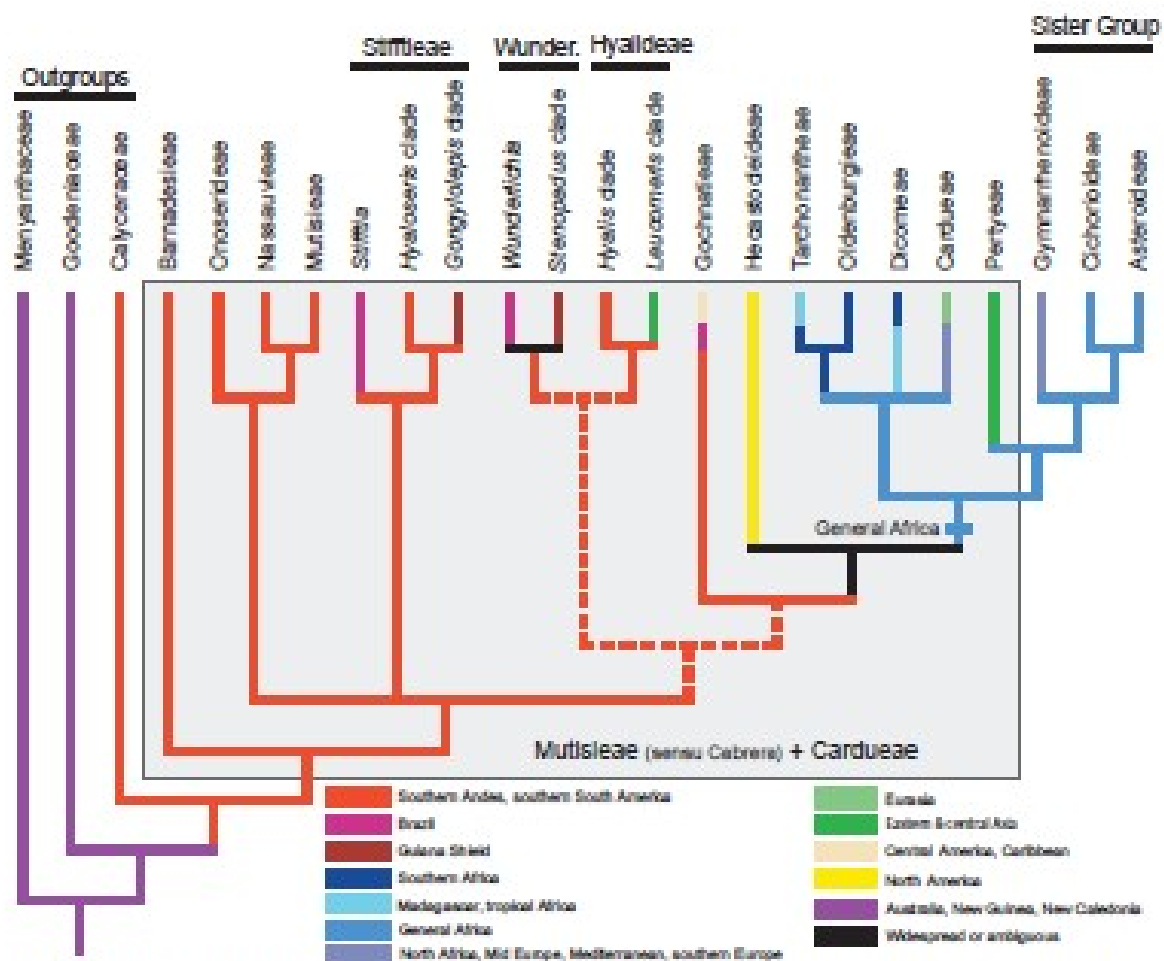


Fig. 12.1. A section of the Compositae phylogeny that highlights the basal grade of the family. A generic-level phylogeny can be found in Chapter 44. Wunder. = Wunderlichieae; the gray box denotes Mutisieae (sensu Cabrera). Cabrera never put Cardueae or Tarchonantheae into Mutisieae. Dashed lines indicate branches that are not as well supported as the remainder of the tree (Panero and Funk 2008): Wunderlichioideae have 52% bootstrap support in the parsimony tree and 91 posterior probability in the Bayesian tree; the branch connecting Wunderlichioideae to the rest of the family collapses in the parsimony tree and has a 97 posterior probability; the Gochniaceae branch has 65% bootstrap support and 100 posterior probability.

Figura 2: Árvore retirada de Ortiz *et al* (2009), baseada nos estudos de Panero & Funk (2008).