

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

**Filogenia de Ayapaninae (Eupatorieae - Asteraceae), filogenia e revisão taxonômica de  
*Heterocondylus* R.M. King & H. Rob.**

Projeto de doutorado

Ana Claudia Fernandes (Universidade Federal de Minas Gerais)

Orientador: Prof. Dr. João Aguiar Nogueira Batista (Universidade Federal de Minas Gerais)

Belo Horizonte, Março de 2010

## Revisão bibliográfica

A tribo Eupatorieae, pertencente à família Asteraceae, inclui cerca de 2.400 espécies e 180 gêneros, a maioria dos quais segregada do grande gênero *Eupatorium* (Bremer, 1994). A subtribo Ayapaninae, de Eupatorieae, possui 13 gêneros e 90 espécies, com distribuição na América tropical (tab. 1) (King & Robinson, 1980). Um destes gêneros é *Heterocondylus*, com 16 espécies, de ocorrência principal no Brasil (tab. 2), sendo um daqueles segregados de *Eupatorium s.l.* (King & Robinson, 1972).

O sistema de classificação, em que *Eupatorium s.l.* foi desmembrado em vários gêneros, baseia-se principalmente em caracteres micromorfológicos. Não se sabe, porém, se estes caracteres são úteis na separação das subtribos e gêneros e, para a maioria das subtribos, se estes sustentam grupos monofiléticos (King & Robinson, 1987).

Os trabalhos com abordagem molecular para a tribo são poucos e incluem poucas ou nenhuma espécie brasileira ou sul-americana. Indicam, porém, que uma delimitação mais restrita de *Eupatorium* é válida (Schilling *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2000a e b; Schmidt & Schilling, 2000). Ayapaninae é considerada próxima de Alomiinae, por King e Robinson (1987), e próxima de Disynaphiinae, Eupatoriinae, Alomiinae, Critoniinae e Hebecliniinae, por Bremer (1994). Esta questão permanece sem uma resposta definitiva, pois nenhum trabalho foi realizado após estes, para definição dos grupos mais relacionados a Ayapaninae. Não se sabe também se *Heterocondylus* é um grupo monofilético e qual sua relação com os demais gêneros de Ayapaninae. Um trabalho de revisão taxonômica deste gênero também é necessário, para uma melhor circunscrição das espécies, preenchimento das lacunas da distribuição geográfica e produção de chaves atualizadas para as mesmas.

**Tabela 1.** Gêneros da subtribo Ayapaninae, com respectivos números táxons descritos ao nível específico e distribuição geográfica

<b>Gênero</b>	<b>Número de táxons descritos</b>	<b>Distribuição</b>
<i>Alomiella</i> R.M. King & H. Rob.	2	Brasil
<i>Ayapana</i> Spach	21	neotrópicos
<i>Ayapanopsis</i> R.M. King & H. Rob.	20	América do Sul
<i>Condylidium</i> R.M. King & H. Rob.	2	neotrópicos
<i>Gongrostylus</i> R.M. King & H. Rob.	2	Costa Rica, Panamá, Equador e Colômbia
<i>Gymnocondylus</i> R.M. King & H. Rob.	1 ( <i>G. galeopsifolius</i> (Gardner) R.M. King & H. Rob.)	Brasil
<i>Heterocondylus</i> R.M. King & H. Rob.	16	Américas Central e do Sul
<i>Isocarpha</i> R. Br.	21	Sul dos EUA até o Brasil
<i>Lepidesmia</i> Klatt	1 ( <i>L. squarrosa</i> Klatt)	Cuba, Colômbia e Venezuela
<i>Monogereion</i> G.M. Barroso & R.M. King	1 ( <i>M. carajensis</i> G.M. Barroso & R.M. King)	Brasil (PA)
<i>Parapiqueria</i> R.M. King & H. Rob.	1 ( <i>P. cavalcantei</i> R.M. King & H. Rob.)	Brasil
<i>Polyanthina</i> R.M. King & H. Rob.	1 ( <i>P. nemorosa</i> (Klatt) R.M. King & H. Rob.)	Costa Rica, Colômbia, Equador, Venezuela, Bolívia e Peru
<i>Siapaea</i> Pruski	1 ( <i>S. liesneri</i> Pruski)	Venezuela

**Tabela 2.** Táxons descritos para o gênero *Heterocondylus* e sua distribuição geográfica.

<b>Táxon</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<i>Heterocondylus alatus</i> (Vell.) R.M.King & H.Rob.	Brasil (MT, GO, MS, MG, ES, RJ, SP, PR, SC)
<i>Heterocondylus amphidictyus</i> (DC.) R.M.King & H.Rob.	Brasil (GO, MG, SP)
<i>Heterocondylus decipiens</i> (Baker) R.M.King & H.Rob.	Brasil (MG)
<i>Heterocondylus didymus</i> (Klatt) R.M.King & H.Rob.	Bolívia
<i>Heterocondylus grandis</i> (Sch.Bip. ex Baker) R.M.King & H.Rob.	Brasil (MG, SP, PR, SC, RS), Paraguai e Argentina
<i>Heterocondylus inesiaie</i> R. Esteves	Brasil (MG, SP)
<i>Heterocondylus itacolumiensis</i> (Baker) R.M.King & H.Rob.	Brasil (MG)
<i>Heterocondylus jaraguensis</i> (B.L.Rob.) R.M.King & H.Rob.	Brasil (MG, SP)
<i>Heterocondylus leptolepis</i> (Baker) R.M.King & H.Rob.	Brasil (RS)
<i>Heterocondylus lysimachioides</i> (Chodat) R.M.King & H.Rob.	Brasil (MS, SP) e Paraguai
<i>Heterocondylus macrocephalus</i> H.Rob.	Brasil (MG)
<i>Heterocondylus pandurifolius</i> (Baker) R.M.King & H.Rob.	Brasil (MG, SP)
<i>Heterocondylus pumilus</i> (Gardner) R.M.King & H.Rob.	Brasil (MG, SP)
<i>Heterocondylus reitzii</i> R.M.King & H.Rob.	Brasil (PR, SC)
<i>Heterocondylus vitalbis</i> (DC.) R.M.King & H.Rob.	Brasil (PA, MA, PI, SE, BA, MT, GO, MS, MG, RJ, SP, PR, SC), Honduras, Nicarágua, Costa Rica, Guatemala, Panamá, Colômbia, Venezuela, Suriname, Equador, Peru, Bolívia, Paraguai

## **Objetivos**

Este projeto tem como objetivos, portanto, avaliar o monofiletismo da subtribo Ayapaninae e do gênero *Heterocondylus*, testar a utilidade dos caracteres micromorfológicos na delimitação dos grupos e realizar a revisão taxonômica deste gênero. Caracteres moleculares (dos DNAs nuclear e plastidial) e estruturais serão obtidos para a

reconstrução da filogenia de Ayapaninae e *Heterocondylus*. O estudo da morfologia das flores e cípselas de *Heterocondylus*, utilizando-se microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz, auxiliará no teste da utilidade dos caracteres micromorfológicos e na caracterização taxonômica das espécies. O trabalho de revisão taxonômica de *Heterocondylus* será realizado com base em revisão de herbários e excursões ao campo, para o conhecimento da distribuição geográfica e variabilidade intra-específica das espécies. O material genético para a realização de análises moleculares e o material para análise de microestrutura serão coletados durante as excursões ao campo. A análise dos caracteres vegetativos e reprodutivos das espécies será feita para a elaboração de descrições e chaves para as espécies encontradas.

### **Justificativa**

Se por um lado, o desmembramento do grande gênero *Eupatorium* gerou matrizes de trabalho mais acessíveis (Bremer, 1994) em revisões e filogenias, também suscitou dúvidas na delimitação das subtribos e dos gêneros, para os estudiosos da família Asteraceae. Além disso, como o sistema de classificação proposto por King e Robinson (1987) baseia-se, principalmente, em caracteres florais micromorfológicos, há dificuldades na determinação das espécies e designação destas às subtribos e aos gêneros criados por estes autores.

A subtribo Ayapaninae, de acordo com King e Robinson (1987), é mais próxima de Alomiinae, com a qual compartilha a forma do involúcro, dos lobos da corola e a base alargada do estilete. Já na filogenia com caracteres morfológicos de Bremer (1994), gêneros das subtribos Eupatoriinae, Gyptidinae e Praxeliinae estão posicionados como os mais próximos de Ayapaninae. Esta questão permanece em aberto, pois nenhum trabalho filogenético foi realizado após estes, para definição dos grupos mais relacionados a Ayapaninae.

Segundo King e Robinson (1987), *Heterocondylus* possui espécies tão variáveis que a unidade do grupo não é inicialmente óbvia. Suas espécies têm hábito muito diverso, incluindo desde formas herbáceas, micrófilas e monocéfalas, até as quase arbustivas. As brácteas involucrais de *H. vitalbae* e *H. grandis* são amplas e subiguais, o que as difere das outras espécies. Apesar disso, estes autores argumentam que as duas espécies não são

relacionadas entre si, com base em outros caracteres micromorfológicos. Várias questões relacionadas à circunscrição das espécies e designação destas às subtribos estão em aberto porque nenhum trabalho revisional foi feito com este gênero após sua validação e o trabalho compilatório de King e Robinson (1987).

Poucos trabalhos com abordagem molecular foram feitos para a tribo Eupatorieae. Schilling e colaboradores (1999), Ito e colaboradores (2000a e b) e Schmidt e Schilling (2000), através de análises com DNA plastidial e seqüências ITS do DNA nuclear, indicam que uma delimitação mais restrita de *Eupatorium* é válida, como a proposta por King e Robinson (1987). Porém, os gêneros segregados de *Eupatorium s.l.* inclusos nas análises foram poucos, com subamostragem principalmente dos representantes das Américas Central e do Sul. Apesar disso, aqueles que foram incluídos mostram uma tendência a se agrupar como monofiléticos.

Percebe-se, então, a necessidade de um trabalho de revisão do gênero *Heterocondylus*, para melhor circunscrição das espécies e preenchimento das lacunas da distribuição geográfica destas. Como este gênero e a subtribo Ayapaninae não foram inclusos ainda em análises filogenéticas com dados moleculares, morfológicos e anatômicos, é interessante também que um trabalho desta natureza seja feito. É proposto, portanto, além da revisão de *Heterocondylus*, também a reconstrução das filogenias das espécies do gênero e da subtribo, para testar se estes grupos são monofiléticos.

A maioria das espécies de *Heterocondylus* ocorre no Brasil central, principalmente no bioma Cerrado, o qual vem sofrendo severo impacto antrópico nos últimos anos. Este bioma foi, inclusive, eleito como uma área de *hotspot*, área de alta diversidade biológica, que vem sofrendo acelerada perda de hábitat (Myers *et al.*, 2000). Realizar uma revisão taxonômica deste gênero é fundamental para auxiliar no conhecimento dos locais de ocorrência destas espécies, com localização de possíveis espécies novas. Além disso, o conhecimento do *status* de conservação de cada espécie pode auxiliar no manejo de áreas de Cerrado onde estas ocorrem.

## **Material e métodos**

### **Amostragem, visitas aos herbários e identificação das espécies**

Para a elaboração da filogenia e da revisão taxonômica de *Heterocondylus*, serão incluídos todos os táxons descritos para o gênero (tab. 2), assim como espécies dos demais gêneros da subtribo (tab. 1). Para a reconstrução da filogenia da subtribo Ayapaninae, serão tomadas espécies de todos os gêneros listados na tabela 1, bem como espécies das subtribos Alomiinae, Disynaphiinae, Eupatoriinae, Gyptidinae e Praxeliinae, as quais são tidas como próximas de Ayapaninae por King e Robinson (1987) e Bremer (1994). Para todos os gêneros amostrados, procurar-se-á, sempre que possível, incluir material da espécie tipo nos estudos.

Serão realizadas, para a obtenção das amostras, expedições de coleta para Minas Gerais, São Paulo, Paraná (***H. reitzii* – Parque Estadual de Vila Velha e Parque Estadual do Cerrado**), e alguns estados da região Centro-Oeste. Material extra-brasileiro será obtido a partir de colaborações com instituições ou pesquisadores de outros países. Para *Heterocondylus*, as coletas serão feitas de modo a amostrar a distribuição geográfica e variabilidade intra-específica de cada espécie. O material testemunho coletado será incorporado ao herbário da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB).

Será pedido material de empréstimo dos principais herbários brasileiros e materiais tipo ou imagens dos tipos dos herbários estrangeiros nos quais estes estão depositados. Os herbários que forem importantes para a realização deste trabalho e não enviarem material, serão visitados.

### **Extrações de DNA, ampliações por PCR e seqüenciamento**

O DNA total será extraído de folhas frescas ou secas, de acordo com Doyle e Doyle (1987). As ampliações de PCR serão realizadas sob condições padronizadas de acordo com as necessidades do material e de cada *primer* utilizado.

Serão seqüenciadas duas a três regiões do genoma plastidial (cpDNA) e uma região do genoma nuclear, a partir de pares de *primers* previamente testados para escolha daqueles que apresentarem maior variabilidade. Os produtos de PCR serão analisados em eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, com tampão TAE, corados com brometo de etídio e visualizados por iluminação com luz ultravioleta. O tamanho molecular dos fragmentos será estimado através da utilização de marcador de massa molecular de 100 bp (*Life Technologies*). O seqüenciamento será realizado por meio de serviço de companhias

especializadas na área. Todas as sequências serão depositadas no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)).

### **Análise filogenética dos dados moleculares**

Os eletroferogramas serão editados com o programa STADEN (Bonfield *et al.*, 1995), as seqüências alinhadas utilizando o programa MUSCLE ([www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html)) e ajustadas através de alinhamento manual usando o programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007). Serão utilizadas, na filogenia de *Heterocondylus* e da subtribo Ayapaninae, espécies das subtribos Alomiinae, Disynaphiinae, Eupatoriinae, Gyptidinae e Praxeliinae, as quais são tidas como próximas de Ayapaninae por King e Robinson (1987) e Bremer (1994).

Os alinhamentos resultantes serão analisados utilizando-se critérios de optimalidade de parcimônia de Fitch (Fitch, 1971) no programa PAUP 4.0 (Swofford, 1998) e análise bayesiana (com o software Mr. Bayes) com modelos de máxima verossimilhança (Huelsenbeck *et al.*, 2001). Os modelos serão escolhidos de acordo com as matrizes de dados com o software MODELTEST 3.0. As matrizes de cada gene serão avaliadas em separado e conjuntamente, de forma a detectar possíveis incongruências entre os diferentes conjuntos de dados. O suporte estatístico dos resultados obtidos em cada uma das análises será avaliado utilizando-se *bootstrap* de caracteres (Felsenstein, 1985).

### **Morfologia e estrutura das flores e cipselas em Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Luz**

Para análise da micromorfologia de superfície, amostras serão preparadas utilizando-se flores em antese e cipselas maduras, coletadas nos locais de ocorrência das espécies e fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2. Após desidratação em série etílica, o material será desidratado ao ponto crítico utilizando CO<sub>2</sub> segundo protocolo padrão (Robards, 1978). Os fragmentos serão colados em *stubs*, cobertos com ouro em metalizador e a captura de imagens será obtida em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200. Quando não for possível coletar amostras frescas, serão processados fragmentos obtidos de exsiccatas, os quais serão montados diretamente em *stubs*, metalizados com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura.

Para estudos anatômicos, amostras de flores, ovários e cipselas serão fixadas em mistura de Karnovsky por 24 horas (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica, incluídas em metacrilato Leica®, conforme indicação do fabricante, seccionadas em micrótomo rotativo com 5 a 10 µm de espessura nos planos adequados, coradas com azul de toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'Brien *et al.*, 1964), sendo que as lâminas serão montadas com resina sintética. A observação será realizada em microscópio de luz, através do qual serão obtidas imagens digitais.

### **Revisão taxonômica de *Heterocondylus***

A revisão taxonômica de *Heterocondylus* será realizada com base nos resultados obtidos para as filogenias de Ayapaninae e deste gênero. O levantamento florístico e as análises taxonômicas serão realizados, em um primeiro momento, através de revisão da literatura e das exsicatas pedidas aos herbários, onde se encontram coletas do gênero *Heterocondylus*. Tal revisão servirá de base para a elaboração de um plano de excursões ao campo, visando a otimização e o direcionamento destas, além de estabelecerem-se critérios para a identificação dos táxons.

As coletas serão planejadas no sentido de coletar todos as espécies do gênero e preencher as lacunas existentes na amostragem em relação à presença e riqueza das espécies do gênero, buscando-se abranger a maior área possível, principalmente em Estados e Regiões onde as informações são escassas ou faltantes. As informações tanto de material dos herbários quanto das coletas servirão de base para o enquadramento das espécies de *Heterocondylus* em categorias *status* de conservação, de acordo com os critérios adotados pela IUCN.

As coletas serão feitas seguindo-se os métodos tradicionais em Taxonomia Vegetal, coletando-se, preferencialmente, espécimes em estágio reprodutivo (com flores e/ou frutos). Os dados de localização georreferenciada, hábitat, hábito, caracteres ecológicos e fenológicos das espécies serão obtidos no campo e das exsicatas analisadas. Será feita, ainda, a documentação em campo dos táxons através de fotografias, para registro de hábito, coloração natural e hábitat dos mesmos. Além das finalidades já citadas, as coletas serão fundamentais para a obtenção de material fresco para a análise da micromorfologia da superfície das flores e dos frutos em microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz e a extração de material genético que será usado para a reconstrução das filogenias.

Serão elaboradas chaves analíticas para determinação dos táxons, descrições e ilustrações. As fotografias feitas em campo, assim como, aquelas obtidas em laboratório (de estruturas importantes para a diagnose dos táxons) acompanharão as descrições. Para cada espécie também serão incluídos dados de distribuição, habitat, fenologia e comentários taxonômicos.

#### 4. Cronograma

Atividade/Semestre	2010		2011		2012		2013	
	1º	2º	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Créditos das disciplinas	x	x						
Solicitação de material herborizado	x	x						
Visitas aos herbários				x	x			
Viagens de coleta		x	x	x	x			
Análise dos caracteres macromorfológicos		x	x	x	x	x		
Extrações de DNA		x	x	x	x	x		
Amplificações por PCR			x	x				
Sequenciamento				x				
Análise filogenética dos dados moleculares				x				
Análise dos caracteres anatômicos e micromorfológicos					x	x		
Revisão taxonômica de <i>Heterocondylus</i>						x	x	
Exame de Qualificação						x		
Redação da tese/artigos					x		x	x
Defesa da tese								x

#### Referências bibliográficas

BONFIELD, J.K.; SMITH, K.F.; STADEN, R. A new DNA sequence assembly program. **Nucleic Acids Res.** v. 24, p. 4992-4999. 1995.

BREMER, K. **Asteraceae: Cladistics and classification**. Portland: Timber Press. 1994. 752 p.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. v. 19, p. 8-11. 1987.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. **Evolution**. v. 39, p. 783-791. 1985.

FITCH, W.M. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. **Systematic Zoology**. v. 20, p. 406-416. 1971.

GenBank. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)>. Acesso em: mar/2010.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F.; NIELSEN, R.; BOLLBACK, J.P. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**. v. 294, p. 2310-2314. 2001.

ITO, M.; WATANABE, K.; KITA, Y.; KAWAHARA, T.; CRAWFORD, D.J.; YAHARA, T. **a**. Phylogeny and phytogeography of *Eupatorium* (Eupatorieae, Asteraceae): insights from sequence data of the nrDNA ITS regions and cpDNA RFLP. **J. Plant Res.** v. 113, p. 79–89. 2000.

ITO, M.; YAHARA, T.; KING, R.M.; WATANABE, K.; OSHITA, S.; YOKOYAMA, J.; CRAWFORD, D.J. **b**. Molecular phylogeny of Eupatorieae (Asteraceae) estimated from cpDNA RFLP and its implication for the polyploid origin hypothesis of the tribe. **J. Plant Res.** v. 113, p. 91–96. 2000.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**. v.27, p. 137A-138A. 1965.

KING, R.M.; ROBINSON, H. Studies in the Eupatorieae (Asteraceae). CV. A new genus, *Heterocondylus*. **Phytologia**. v.24 (5), p.389-392. 1972.

- KING, R.M.; ROBINSON, H. Studies in the Eupatorieae (Asteraceae). CXCII. Validation of subtribes. **Phytologia**. v.46 (7), p.446-450. 1980.
- KING, R.M.; ROBINSON, H. The Genera of the Eupatorieae (Asteraceae). **Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.** v. 22, p. 1-581. 1987.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. v. 403, p. 853-858. 2000.
- MUSCLE. Disponível em: <[www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html)>. Acesso em: mar/2010.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**. v. 59, p. 368-373. 1964.
- ROBARDS, A.W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: **Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells**. HALL, J.L. (Ed.). New York: Elsevier. 1978. p. 343-403.
- SCHILLING, E.E.; PANERO, J.L.; COX, P.B. Chloroplast DNA restriction site data support a narrowed interpretation of *Eupatorium* (Asteraceae). **Plant Syst. Evol.** v. 219, p. 209–223. 1999.
- SCHMIDT, G.J.; SCHILLING, E.E. Phylogeny and biogeography of *Eupatorium* (Asteraceae: Eupatorieae) based on nuclear ITS sequence data. **Am. J. Bot.** 87(5): 716–726. 2000.
- SWOFFORD, D.L. PAUP 4.0. Phylogenetic analysis using parsimony. Sunderland, MA: Sinauer Publications. 1998.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, p. 1596-1599. 2007.