

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

PROJETO DE PESQUISA:

**REVISÃO TAXONÔMICA DO GÊNERO *Esterhazyia* J. C.
MIKAN (OROBANCHACEAE)**

**Doutoranda: Jesiani Rigon
Orientador: Prof. Dr. Vinicius Castro Souza**

Revisão taxonômica do gênero *Esterhazyia* J. C. Mikan (Orobanchaceae)

Resumo

Esterhazyia J. C. Mikan (Orobanchaceae) é um gênero taxonomicamente complexo de hemiparasitas de raízes. É representado por cinco espécies: *Esterhazyia macrodonta* (Cham.) Benth., *E. nanuzae* V.C.Souza, *E. splendida* J.C.Mikan, *E. caesarea* (Cham. & Schltl.) V. C. Souza, e *E. eitenorum* Barringer. distribuídas no Brasil, Paraguai e Bolívia. *E. splendida* e *E. macrodonta* são mais comuns e difundidas, enquanto *E. nanuzae*, *E. eitenorum*, e *E. caesarea* são espécies raras de ocorrência restrita a campos de altitudes. Este trabalho tem como objetivo principal a revisão taxonômica do gênero *Esterhazyia* e estudo filogenético do grupo. Será feita análise morfológica das partes reprodutivas e vegetativas com base em espécimes coletados em campo e exsicatas de herbários nacionais e internacionais, bem como análise dos resultados obtidos do sequenciamento de DNA. Também serão realizados estudos complementares com enfoque no complexo *E. splendida* que apresenta considerável heterogeneidade morfológica, prevendo-se estudos de anatomia e genética de populações em parceria com pesquisadores de outras instituições. Ao final do trabalho, serão apresentadas descrições das espécies, ilustrações, chave de identificação e mapas de distribuição geográfica.

Palavras-chave: anatomia, *Esterhazyia splendida*, filogenética, genética de populações, Scrophulariaceae.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. Posicionamento taxonômico da família Orobanchaceae Vent.

O gênero *Esterhazyia* J. C. Mikan tradicionalmente foi reconhecido como pertencente às Scrophulariaceae Juss. (Schmidt, 1862; Lawrence, 1977; Cronquist, 1981; Barroso *et al.*, 1984), na subfamília Rhinanthoideae, onde eram posicionados os demais gêneros hemiparasitas da família.

No entanto, Bellini (1907) foi o primeiro autor que propôs um desmembramento da família usando como critério a presença ou ausência do hábito parasítico, transferindo algumas tribos como Rhinanthae para Orobanchaceae Vent. Até então, essa família era formada apenas pelas espécies holoparasitas, distribuídas principalmente no hemisfério norte, Ásia e África, e representada por apenas dois gêneros na América do Sul, *Aphyllon* Mitch. e *Orobanche* L. (Heide-Jørsensen, 2008). Cronquist (1981) também reconheceu uma relação de proximidade entre algumas Scrophulariaceae e Orobanchaceae, considerando Orobanchaceae como uma família distinta e mais avançada, principalmente com relação ao parasitismo, originado provavelmente na subfamília Rhinanthoideae (Scrophulariaceae).

Os taxa de Orobanchaceae (holoparasitas) e os taxa parasitas de Scrophulariaceae coincidem na maioria das características florais, e as famílias eram usualmente distinguidas pela placentação e número de carpelos (Hutchinson, 1969 *apud* Juan *et al.*, 2000), sendo que Orobanchaceae seria diferenciada de Scrophulariaceae por possuir ovário unilocular e não ocorreria no Brasil (Souza & Lorenzi, 2008).

Estudos palinológicos (Minkin & Eshbaugh, 1989), morfológicos (Press & Graves, 1995; Juan *et al.*, 2000), anatômicos e, mais recentemente, estudos macromoleculares (Olmstead & Reeves, 1995; dePamphilis *et al.* 1997; Olmstead *et al.*, 2001; Oxelman *et al.*, 2005; Tank *et al.*, 2006) revelaram a natureza polifilética de

Scrophulariaceae, motivando a transferência dos gêneros de Rhinanthae e Buchnereae para Orobanchaceae (Heide-Jørsensen, 2008; APG III, 2009).

Na atual circunscrição, Orobanchaceae inclui membros com grande diversidade floral (Endress, 1999), incluindo holoparasitas, hemiparasitas, parasitas facultativas, não parasitas, como *Lindenbergia* Lehm. (Wolfe *et al.*, 2005, Bennett & Mathews, 2006) e epífitas, como *Pedicularis dendrothauma* R. R. Mill & D. J. Allard. A família é globalmente distribuída, possui aproximadamente 60 a 105 gêneros e cerca de 1700 a 2070 espécies (Nickrent, 2002; Heide-Jørsensen, 2008; Souza *et al.*, 2009), sendo a maior dentre as famílias de plantas parasitas (Heide-Jørsensen, 2008).

No Brasil ocorrem 10 gêneros e cerca de 50 espécies exclusivamente em formações não florestais, sendo relativamente comuns em campos rupestres. Dentre os representantes nativos do Brasil, destacam-se os gêneros *Agalinis* Raf., *Buchnera* L., *Esterhazyia* e *Physocalyx* Pohl. (Souza & Lorenzi, 2008).

1.2. O parasitismo em Orobanchaceae

Cerca de 1% das plantas com flores (4500 espécies) apresentam algum grau de parasitismo (Nickrent, 2002; Heide-Jørsensen, 2008). Aproximadamente 88 gêneros de Orobanchaceae são hemiparasitas e 17 holoparasitas. O hemiparasitismo em Scrophulariaceae foi reconhecido inicialmente por Decaisne (1847), que percebeu que certas Rhinantháceas eram parasitas capazes de reduzir as colheitas. O haustório primário ocorre apenas nas holoparasitas e em gêneros hemiparasitas mais avançados como *Striga* Lour., considerada uma importante praga da agricultura, uma vez que a eficiente absorção de água e nutrientes pode levar seu hospedeiro a morte (Nickrent, 2002; Heide-Jørsensen, 2008). Na fase de plântula, *Striga* causa alteração no balanço hormonal estimulando a produção de raízes no hospedeiro (Mulsseman & Press, 1995).

Os haustórios secundários são numerosos e pequenos, com menos de 1mm a 5mm de diâmetro, são aderidos as raízes de diversos hospedeiros através de um apressório ou de pêlos radiculares modificados que secretam uma substância pegajosa. Anatomicamente, apresenta três regiões distintas: 1) o núcleo vascular , uma ponte xilemática formada por uma a cinco séries de células, 2) corpo hialino, incluindo os vasos (feixes axiais que o atravessam) e 3) o endófito, que é a parte do haustório contida dentro do hospedeiro (Elias *et al.*, 2005; Heide-Jørgensen & Kuijt 1995; Riopel & Timko, 1995).

As hemiparasitas são frequentemente generalistas na escolha de seus hospedeiros, já as holoparasitas são mais ou menos específicas, podendo ser especializadas em um único hospedeiro (Molau, 1995). Diversos estudos têm demonstrado que as Orobanchaceae requerem reconhecimento químico do hospedeiro para formação e desenvolvimento de um haustório funcional (Kuijt, 1977; Chang & Lynn, 1986; Yoder, 1999). Em *Striga* e *Orobanche* L. a germinação é estimulada mediante a percepção de sinais moleculares de strigolactonas, substancias presentes nas raízes de espécies como o sorgo, o milho e o arroz, que atua na sinalização para estabelecimento se simbiose com fungos micorrízicos (Yoneyama *et al.*, 2010).

Com relação à evolução do parasitismo, as hemiparasitas facultativas são consideradas as formas mais ancestrais, acreditando-se que o hábito na família tenha evoluído uma vez no grupo e seguida por várias origens independentes de holoparasitas a partir de ancestrais hemiparasitas (Young *et al.*, 1999).

1.3. O gênero *Esterhazy* J. C. Mikan

O gênero *Esterhazy* foi descrito pelo botânico austríaco Johann Christian Mikan (1769-1844), a partir de coleta realizada por ele durante expedição ao Brasil e nomeada em homenagem ao príncipe Esterhazy. Inicialmente o gênero foi descrito com uma única espécie, *Esterhazy splendida* e incluída na tribo Gerardieae (Bentham, 1846; Schmidt

1862; Baillon, 1887), nome alterado por Pennell (1935) para Buchnereae. Chamisso & Schlechtendal (1828) consideraram as espécies de *Esterhazyia* na circunscrição do gênero *Gerardia* (= *Agalinis*). Já Martius (1829), reconheceu *Esterhazyia* na sinonímia de *Virgularia*. O gênero foi revalidado por Benthham (1846) como *Esterhazyia*.

Benthham (1846), Schmidt (1862) e Barroso (1952) consideraram três espécies, *Esterhazyia splendida* com algumas variedades, *Esterhazyia nervosa* e *Esterhazyia macrodonta*, espécie similar a *E. splendida*, exceto pelo ápice das sépalas acuminado. Barbosa-Rodrigues (1883) tendo conhecimento de *E. macrodonta* e *E. splendida* com suas variedades, faz referência à coleta de um único exemplar nas serras do Lenheiro e São Gonçalo em São João d'El-Rey (MG) que ele nomeou de *Esterhazyia superba*: “ao encontrar-me com esta nova planta exultei de júbilo; tinha ante mim senão uma variedade distinta, uma espécie rara ou nova”, não sendo encontrado por ele nenhum registro de sua publicação. O material tipo deste nome foi perdido, assim como outros materiais de Barbosa-Rodrigues e possivelmente será necessária a sua neotipificação que, de acordo com o conceito de Souza & Giulietti (2009), seria um sinônimo de *E. splendida*.

Barringer (1985) descreveu duas novas espécies, *E. eitenorum* Barringer e *E. petiolata* Barringer. Moura & Alves (1999) descreveram também *Esterhazyia triflora* R.B.Moura & R.J.V. Alves para o Sul do Brasil. O primeiro destes nomes é aceito por Souza & Giulietti (2009), mas os dois últimos foram reconhecidos por estes mesmos autores como sinônimos de *E. splendida*.

Souza (2001) reconheceu uma nova espécie, *E. nanuzae* V. C. Souza, distinguida das demais pelas folhas apressas ao caule e densa deposição de cera e apresentou uma nova combinação, *Esterhazyia caesarea*, antes posicionada em *Gerardia*.

Com base nos trabalhos mais recentes (Souza, 2003; 2009; Souza & Giulietti, 2009; Souza, 2010) são reconhecidas cinco espécies: *Esterhazyia macrodonta* (Cham.) Benth., *E. nanuzae* V.C.Souza, *E. splendida* J.C.Mikan, *E. caesarea* (Cham. & Schltdl.) V.

C. Souza, e *E. eitenorum* Barringer. O gênero é restrito a Bolívia, Paraguai e Brasil (Wolfe *et al.*, 2005), onde ocorre desde a Bahia e Mato Grosso até o Rio Grande do Sul. Os taxa mais comuns e difundidos são *E. splendida* e *E. macrodonta* em campos e cerrados, enquanto *E. nanuzae*, *E. eitenorum* e *E. caesarea* ocorrem em áreas mais restritas como em campos de altitudes e são consideradas espécies raras (Souza *et al.*, 2009).

Caracterização morfológica do gênero *Esterhazyia*.

Ervas a arbustos hemiparasitos, eretos, geralmente bastante ramificados, sistema subterrâneo bem desenvolvido. **Folhas** opostas, raramente alternas ou verticiladas, sésseis a curtamente pecioladas, cartáceas a coriáceas, geralmente lineares a elípticas, lanceoladas ou oblanceoladas, margem inteira, glabras, uninérveas ou raramente com nervura secundária evidente. **Inflorescências** em racemo geralmente não bem definido ou apenas flores solitárias, axilares, concentradas nas terminações dos ramos; brácteas foliáceas; bractéolas ausentes. **Flores** vistosas; cálice pentâmero, gamossépalo, cilíndrico a campanulado, cartáceo a subcoriáceo; corola creme, densamente tomentosa, com tricomas vermelhos a alaranjados, menos freqüentemente rosados, pentâmera, longamente tubuloso-infundibuliforme, bilabiada, lábio superior bilobado, inferior trilobado, fauce arredondada, cartácea, lobos em geral revolutos e reflexos; estames 4, iguais entre si, longamente exsertos, inseridos no tubo da corola, anteras basifixas, densamente vilosíssimas-lanuginosas, coniventes pelos tricomas, com tecas paralelas; grãos de pólen isopolares, radialmente simétricos, oblato-esferóides, subcirculares, 3-colpoidados, exina microrreticulada; ovário bilocular, pluriovulado, estilete cilíndrico, estigma subclavado, inteiro ou bipartido. **Fruto** tipo cápsula loculicida, bivalvar, valvas geralmente bipartidas, ovóide a globosa; sementes trigonais, com testa reticulada a cristado-reticulada, comumente negras (Ichaso & Barroso, 1970; Ichaso, 1978; Souza, 1990; Souza, 1996; Santos, 1997; Souza & Giuliatti, 2009).

As flores são polinizadas por beija-flores, no entanto em estudo realizado com *Esterhazyia macrodonta* foi registrada uma baixa visitação destas aves. As flores tem antese diurna e duram até seis dias, o estigma é receptivo logo que a flor se abre, mas o estilete é inicialmente menor que os estames com anteras já abertas, caracterizando proterandria. Autopolinização pode ocorrer, já que pequenas quantidades de pólen são expelidas pelo vento (Freitas & Sazima, 2001; 2006). A pilosidade da teca está provavelmente associada à retenção do pólen após deiscência da antera (Hesse *et al.*, 2000), aumentando o tempo de disponibilidade aos polinizadores. As sementes diminutas são dispersas passivamente pelo vento (Juan *et al.*, 2000).

Filogeneticamente *Esterhazyia* tem emergido como grupo irmão de *Agalinis* Raf., o que é consistente com o alto grau de similaridade morfológica entre os dois gêneros (Bennett & Mathews, 2006; Elias *et al.*, 2001). A principal diferença entre estes gêneros é a presença de estames exsertos e anteras vilosíssimas de *Esterhazyia* em oposição aos estames inclusos ou atingindo a fauce e anteras glabras a subglabras de *Agalinis*. No entanto, existem exceções, como *Agalinis angustifolia* (Mart.) D'Arcy, em que os estames são glabros, mas atingem a fauce ou são exsertos (Souza & Giuliatti, 2009), e de acordo com recentes trabalhos com filogenia de Scrophulariaceae, a separação entre *Esterhazyia* e *Agalinis* não se mostram suficientemente consistentes (Souza *et al.*, “no prelo”).

O gênero apresenta poucos caracteres morfológicos aplicáveis na diferenciação das espécies. Barroso (1952) usou como critério a morfologia das folhas e lacínios do cálice. Souza & Giuliatti (2009), além destes caracteres, utilizaram também a coloração da corola. No entanto, a coloração que em estudos de campo tornam os taxa claramente discerníveis, são perdidas após herborização, devido à presença de orobanquina (um tipo de composto iridóide) que tornam as plantas enegrecidas após secagem (Judd *et al.*, 2009; Souza, 2009).

1.4. O complexo *Esterhazyia splendida*

De acordo com Souza & Giuliatti (2009), *Esterhazyia splendida* é uma espécie polimórfica e bastante complexa do ponto de vista taxonômico. Estes mesmos autores reconheceram alguns “padrões” para a espécie que foram assinalados como possíveis espécies distintas. O padrão “1” apresenta folhas lineares a oblanceoladas e são provenientes das restingas dos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo; o padrão “2” apresenta folhas lanceoladas e ocorre nos arredores de Linhares (ES); o padrão “3” possui folhas linear-lanceoladas e ocorre na Serra dos Órgãos (RJ); o padrão “4” possui folhas elípticas e ocorre do Mato Grosso até São Paulo; o padrão “5” possui folhas oblanceoladas e ocorre na região Sul do Brasil; o padrão “6” possui folhas lineares e flores muito pequenas, ocorrendo na região da Serra de Ouro Branco (MG) e o padrão “7” possui folhas elípticas e menores, distribuído pela Chapada Diamantina (BA).

Esta complexidade já havia sido reconhecida por Schmidt (1862), na Flora Brasiliensis, que identificou grande variabilidade nesta espécie, e também por Barringer (1985) que observou que *E. splendida* continha todo material não facilmente colocado em outros taxa do gênero.

2. OBJETIVO GERAL

Revisão taxonômica do gênero *Esterhazyia*, auxiliando na elucidação dos problemas existentes na circunscrição de suas espécies e do gênero como um todo.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a consistência dos padrões reconhecidos por Souza & Giuliatti (2009) para *E. splendida*;
- b) Realizar estudos filogenéticos de *Esterhazyia*, procurando verificar o monofiletismo do gênero e relações com gêneros próximos;

- c) Fornecer dados morfológicos que contribuam na delimitação mais precisa das espécies;
- d) Contribuir para o conhecimento da Sistemática das Orobanchaceae Neotropicais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estudos morfológicos

Para este trabalho serão examinadas exsicatas do gênero *Esterhazyia* de diversos herbários nacionais e internacionais, que serão visitados e/ou solicitado empréstimo, tendo sido preliminarmente considerados os seguintes:

Herbários nacionais:

ALCB- Universidade Federal da Bahia, Salvador- BA;
 BHCb- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte- MG;
 BOTU- Universidade Estadual Paulista, Botucatu- SP;
 CEN- EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília- DF;
 CEPEC- CEPEC, CEPLAC, Itabuna- BA;
 CESJ- Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora- MG;
 COR- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Corumbá- MS;
 CPAP- EMBRAPA, Corumbá- MS;
 EAC- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza- CE;
 EAN- Universidade Federal da Paraíba, Areia,- PA;
 ESA- Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP, Piracicaba- SP;
 ESAL- Universidade Federal de Lavras; Lavras- MG;
 FUEL- Universidade Estadual de Londrina; Londrina- PR;
 HB- Herbarium Bradeanum, Rio de Janeiro- RJ;
 HBR- Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí- SC;
 HRB- IBGE, Salvador- BA;
 HRCB- Universidade Estadual Paulista, Rio Claro- SP;
 HUCC- Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba- PR;
 HUEFS- Universidade Estadual de Feira de Santana; Feira de Santana- BA;
 HUFU- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia- MG;
 HURG- Universidade do Rio Grande, Rio Grande- RS;
 IAN- Embrapa Amazônia Oriental, Belém- PA;
 ICN- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS;
 INPA- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus- AM;
 IPA- Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, IPA, Recife- PE;
 JPB- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB;
 MBM- Museu Botânico Municipal de Curitiba, Curitiba- PR;
 MBML- Museu de Biologia Mello Leitão, Santa Tereza- ES;
 MG- Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, PA.
 OUPR- Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG;
 PACA- Herbarium Anchieta. São Leopoldo-RS,
 PEL- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas- RS;
 PEUFR- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife- PE;
 R- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro- RJ;

RB- Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro- RJ;
SMDB- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria- RGS;
SP- Instituto de Botânica, São Paulo- SP;
SPF- Universidade de São Paulo, São Paulo- SP;
SPSF- Instituto Florestal, São Paulo- SP;
TEPB- Universidade Federal do Piauí, Teresina- PI;
UB- Universidade de Brasília, Brasília- DF;
UEC- Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP;
UPCB- Universidade Federal do Paraná, Curitiba- PR;
VIC- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG;
VIES- Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória- ES;

Herbários internacionais

B- Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem, Berlin, Alemanha;

BM- British Museum, Londres-Inglaterra;

K- Royal Botanical Garden, Kew Herbarium, Richmond-Inglaterra;

M- Botanische Staatssammlung, Munique-Alemanha;

MO- Missouri Botanical Garden, Saint Louis, E.U.A;

NY- New York Botanical Garden, New York, E.U.A;

US- Smithsonian Institution, Washington-E.U.A. (siglas de acordo com *Index*

Herbariorum).

As identificações serão feitas pela comparação e análise das exsicatas com o material tipo, bem como com informações das diagnoses e ilustrações disponíveis na literatura. Serão realizadas viagens a diversas localidades na época de floração e frutificação das espécies, para coleta de material botânico para herborização, e fixação de partes reprodutivas e vegetativas em álcool 70% ou FAA 50, e conservação em sílica gel.

As seguintes áreas serão visitadas com finalidade de encontrar os referidos “padrões”, sendo:

1) Chapada Diamantina, Bahia (*E. macrodonta*, *E. splendida* padrão 7);

2) Chapada dos Veadeiros e Serra dos Pirineus, Goiás, e região de Brasília no Distrito Federal (*E. macrodonta*, *E. splendida* padrão 4);

3) Serra de Ibitipoca, Serra do Cabral e porção sul da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais (*E. caesarea*, *E. macrodonta*, *E. nanuzae*, *E. splendida* padrão 6);

4) região central do Paraná e regiões serranas de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (*E. macrodonta*, *E. splendida* padrão 5);

- 5) Serras do Itatiaia e dos Órgãos, Rio de Janeiro (*E. eitenorum*, *E. macrodonta*, *E. splendida* padrão 3);
- 6) restingas do Rio de Janeiro e Espírito Santo (*E. splendida* padrões 1 e 2);
- 7) Serras da Mantiqueira e da Bocaina em São Paulo (*E. eitenorum*, *E. macrodonta*, *E. splendida* padrão 4);

As espécies serão observadas em campo para complementação de características importantes na delimitação dos taxa, mas perdidas após processo de herborização, como a coloração da corola, bem como, obtenção de fotografias das plantas em seu habitat natural. As espécies coletadas serão tombadas no herbário da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESA), e as duplicatas enviadas a herbários de outras instituições.

Serão realizados estudos morfológicos das partes vegetativas e reprodutivas a partir de material coletado e de exsicatas, sendo neste caso, as partes reprodutivas hidratadas e dissecadas (quando houver permissão dos (as) curadores (as) dos herbários).

As ilustrações serão feitas pela autora, os desenhos do hábito das plantas serão feitos preferencialmente por meio de observação direta do espécime vivo em campo, senão, de exsicatas. O detalhamento de caracteres florais será feito a partir de material fixado ou material herborizado hidratado com auxílio de câmara clara. As pranchas serão finalizadas em nanquim sobre papel fabriano usando a técnica aguada.

Serão elaboradas chaves de identificação e mapas de distribuição para as espécies com base nos dados de etiquetas, além da inclusão de comentários, dados de floração e frutificação.

3.2 Estudos filogenéticos

As amostras serão obtidas em coletas de campo, a partir de populações naturais. De acordo com o protocolo de extração desenvolvido por Doyle & Doyle (1987) embora seja necessária para a realização das análises somente 30-50mg de material seco, uma

quantidade significativamente maior será obtida, com o intuito de realizar repetições do método, caso haja necessidade. Priorizar-se-á a coleta de folhas jovens e saudáveis, as quais serão fragmentadas em tiras pequenas, rapidamente incluídas em frascos contendo sílica gel para uma rápida desidratação dos tecidos, de acordo com o procedimento de Chase & Hills (1991). Estima-se ainda, que o tempo entre a coleta das amostras e o início das atividades de extração de DNA não ultrapasse 3 meses, a fim de evitar perdas.

As amostras serão processadas e analisadas no Laboratório de Biologia e Sistemática Molecular pertencente ao Departamento de Botânica do Instituto de Biociências (Universidade de São Paulo). As amostras serão submetidas aos procedimentos usuais de análise de DNA segundo Doyle & Doyle (1987) e Palmer et al. (1989), sendo composta basicamente por três etapas: extração, amplificação por PCR e sequenciamento.

Segundo trabalhos recentes com filogenia de Scrophulariaceae, como o de Souza *et al.* (no prelo), os dados macromoleculares serão baseados, neste projeto, em três genes: *trnL-F*, *matK* e ITS.

Os dados macromoleculares e morfológicos obtidos para posterior análise filogenética serão ordenados fazendo-se uso da metodologia de Grupo Externo (Wathous & Wheeler, 1981; Nixon & Carpenter, 1993). Neste projeto, deverão ser utilizadas espécies de *Agalinis* e *Buchnera* (ambas Orobanchaceae) como grupo externo.

Uma vez montada a matriz de dados com todos os dados disponíveis, será efetuada a análise cladística, utilizando-se o programa PAUP.

Esta parte do projeto será conduzido em parceria com a Pq.C. Maribeth Latvis, da Universidade da Califórnia, que já vem estudando a filogenia de *Agalinis*, gênero mais proximamente relacionado a *Esterhazyia*.

3.3. Estudos complementares

Considerando a complexidade do gênero e as dificuldades que os diversos autores encontraram na delimitação dos taxa, está prevista a realização de estudos complementares envolvendo o gênero ou determinadas espécies, em parceria com pesquisadores de diferentes instituições. O estudo de genética de populações será conduzido em parceria pesquisadora Tânia Maria de Moura, doutoranda da UNICAMP, a respeito da estrutura genética populacional em *Esterhazyia*, especialmente nos padrões observados em *E. splendida* por Souza (1996). Em contatos feitos com a pesquisadora, é possível realizar cálculos para determinação da divergência genética e o fluxo gênico entre populações correlacionadas à distância geográfica (Rohlf, 1992 *apud* Moura, 2007), e que são obtidos através do estudo do material de DNA, baseado em marcadores microssatélites e aplicação de análises estatísticas. Assim, os resultados obtidos neste estudo genético poderão contribuir nas decisões taxonômicas em *Esterhazyia*, especialmente em *E. splendida*.

Também estão previstos estudos anatômicos das folhas, visando buscar caracteres complementares para o reconhecimento dos táxons e para as análises filogenéticas. Essa parte do projeto será feito em parceria com o Prof. Marcílio de Almeida da Universidade de São Paulo, USP.

4. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Uma vez estabelecida às parcerias, a autora ficará responsável pela coleta e identificação dos materiais em campo, pela participação nas etapas de laboratório e pela discussão dos dados, como taxonomista. Podendo concentrar seus esforços nas atividades de campo e no estudo morfológico das espécies, principalmente no que se refere à morfologia da flor, pouco explorada em estudos anteriores, participando dos trabalhos de laboratório apenas de forma complementar e não como tarefa central da tese. Considera-se que, assim, poderá haver uma perfeita conciliação entre os prazos estabelecidos para a

conclusão de seu doutorado, aprendizagem de técnicas que auxiliam nos estudos taxonômicos, além de compartilhar uma parceria com pesquisadores e estudantes de outros laboratórios.

O projeto será desenvolvido ao longo de 3 anos, tendo início em agosto de 2011 e término em agosto de 2014.

Cronograma

5. Resultados esperados

ANO	MESES	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
2011	Disciplinas								•	•	•	•	•
	Revisão bibliográfica								•	•	•	•	
	Visita aos herbários nacionais									•	•	•	
	Coletas de material em campo										•	•	
	Análises morfológicas									•	•	•	
	Ilustrações											•	•
2012	Disciplinas			•	•	•	•	•	•	•	•	•	
	Revisão de material de herbário	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	Coletas de material em campo		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	Estudos morfológicos		•	•	•	•	•	•	•	•	•		
	Estudos anatômicos		•	•	•	•	•	•	•	•	•		
	Ilustrações		•	•	•	•	•	•	•	•			•
2013	Revisão de material de herbário	•	•	•	•	•	•	•	•				
	Visita aos herbários internacionais									•	•	•	
	Coleta das espécies em campo	•	•	•	•	•	•	•	•				
	Análises morfológicas	•	•	•	•	•	•	•	•				
	Análises anatômicas				•	•	•	•	•				
	Extração e amplificação de DNA	•	•	•	•	•	•						
	Sequenciamento e análise de DNA								•	•	•	•	•
	Ilustrações	•	•	•	•	•	•	•	•				
2014	Análise cladística	•	•	•									
	Análise dos dados	•	•	•	•	•	•						
	Elaboração de chaves dicotômicas	•	•										
	Redação e formatação do texto	•	•	•	•	•	•						
	Defesa									•			

Em sua forma final, o trabalho resultará:

- a) Estudo taxonômico das espécies de *Esterhazyia* J.C. Mikan, em que serão apresentadas descrições, ilustrações, mapas de distribuição geográfica, chaves de identificação para as espécies e comentários.
- b) Filogenia do gênero *Esterhazyia* J.C. Mikan, incluindo as relações entre as espécies do gênero, a fim de verificar o monofiletismo do grupo, bem como a relação com os gêneros próximos em Orobanchaceae neotropicais, como *Agalinis* e *Buchnera*.

Uma vez obtidos os resultados, prevê-se a publicação dos trabalhos em revistas científicas de circulação nacional e internacional. Além de publicações independentes de espécies novas e novidades taxonômicas.

6. Referências bibliográficas

- APG III (Angiosperm Phylogeny Group). 2009. An update of the Angiosperm phylogeny Group classification for orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- Baillon, H. 1887. *Histoire des Plantes*. Paris :Librairie Hachette, 500p.
- Barringer, K. 1985. Two new species of *Esterhazyia* (Scrophulariaceae) from Brazil. *Brittonia*, 37 (2), 195-198.
- Barroso, G. M. 1952. Scrophulariaceae indígenas e exóticas do Brasil. *Rodriguésia*, 15 (27): 1-64.
- Barroso, G. M.; Peixoto, A. L. Costa, C. G.; Ichaso, C. L. F.; Guimarães, E. F.; Lima, H. C. 1984. *Sistemática das angiospermas do Brasil*, v. 2. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 377p.
- Bellini, R. 1907. Criteri per una nuova classificazione delle Personatae (Scrophulariaceae et Rhinanthaceae) *Annali di Botanica*, 6: 131-145.
- Bennett, J. R.; Mathews, S. 2006. Phylogeny of the parasitic plant family Orobanchaceae inferred from phytochrome A. *American Journal of Botany*, 93 (7): 1039-1051.
- Bentham, G. 1846. Scrophularinae. In A. De Candolle, *Prodr.* 10: 186-586.
- Chamisso, L.A.; Schlechtendal, D.F.L. 1828. De plantis expeditione expeditione speculatoria Romanzoffiana observatis disserere pergunt: Scrophularinae. *Linnaea* 3: 1-24.
- Chang, M.; Lynn, D. G. 1986. The haustorium and the chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. *Journal of Chemical Ecology*, 12, (2), 561-579.
- Chase, M.W. & Hills, H.G. 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of samples for DNA studies. *Taxon* 40: 215-220.
- Cronquist, A. 1981. *The evolution and classification of flowering plants*. The New York Botanical Garden. New York. 1262p.
- Decaisne, M. J. 1847 Sur le parasitisme des Rhinanthacées. *Ann. Sci. Nat.*, Sér 3, 8: 5-9
- dePamphilis, C. W.; Young, N. D.; Wolfe, A. D. 1997. Evolution of plastid gene rps2 in a lineage of hemiparasitic and holoparasitic plants: Many losses of photosynthesis and complex patterns of rate variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 7367-7372.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Endress, P. 1999. Symmetry in Flowers: Diversity and Evolution. *Int. J. Plant Sci.* 160 (6 Suppl.):S3-S23.
- Elias, S. I.; Souza, V. C.; Appezzato-da-Glória, B. 2001. Anatomical Confirmation of Root Parasitism in Brazilian *Agalinis* Raf. Species (Scrophulariaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 44 (3): 303-311.
- Freitas, L.; Sazima, M. 2001. Nectar Features in *Esterhazyia macrodonta*, a Hummingbird-Pollinated Scrophulariaceae in Southeastern Brazil. *J. Plant Res.* 114, 187-191.

- Freitas, L.; Sazima, M. 2006. Pollination biology in a tropical high-altitude grassland in Brazil: Interactions at the community level. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 93: 465–516
- Heide-Jørgensen, H. S. 2008. *Parasitic Flowering Plants*. Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands. 438p.
- Heide-Jørgensen, H. S.; Kuijt J. 1995. The haustorium of the root parasite *Triphysaria* (Scrophulariaceae), with special reference to xylem bridge ultrastructure. *Amer. J. Bot.* 82: 782-797.
- Hesse, M.; Vogel, S.; Halbritter, H. 2000. Thread-forming structures in angiosperm anthers: their diverse role in pollination ecology. *Plant Syst. Evol.* 222, 281-292.
- Ichaso, C.L.F. & Barroso, G.M. 1970. Escrofulariáceas. In *Flora Catarinense* (Reitz, P. ed.). CNPq; Instituto Brasileiro Desenvolvimento Florestal; herbário “Barbosa Rodrigues”, Itajaí. 114 p.
- Ichaso, C.L.F. 1978. Tipos de sementes encontrados nas Scrophulariaceae. *Rodriguésia* 30 (45): 335-344.
- Index Herbariorum. Disponível em: <http://sweetgum.nybg.org> .Acesso 08 de agos de 2010.
- Juan, R.; Pastor, J.; Fernández, I. 2000. SEM and Light Microscope Observations on Fruit and Seeds in Scrophulariaceae from Southwest Spain and their Systematic Significance. *Annals of Botany*, 86: 323-338.
- Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F.; Donoghue, M. J. 2009. *Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético*. 3 ed. Porto Alegre, Artmed, 612p.
- Kuijt, J. 1977. Haustoria of Phanerogamic Parasites. *Ann. Rev. Phytopathol*, vol. 17, p. 91-118.
- Lawrence, G. H. M. 1977. *Taxonomia de plantas vasculares*. Vol 2, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. 854 p.
- Martius, C.F.P. 1829. *Nova genera et species plantarum*. vol 3 (1). Munique. 80 p.
- Minkin, J. P.; Eshbaugh, W. H. 1989. Pollen morphology of Orobanchaceae and rhinanthoid Scrophulariaceae. *Grana*, 28: 1-18.
- Molau, U. 1995. Reproductive ecology and biology. In Press M. C.; Graves, J. D. ed. *Parasitic Plants*. Chapman & Hall, New York.
- Musselman L. J.; Press, M. C. 1995. Introduction to parasitic plants In Press M. C.; Graves, J. D. ed. *Parasitic Plants*. Chapman & Hall, New York.
- Moura, R.B. & Alves, R.J.V. 1999. Uma nova espécie de Scrophulariaceae do Brasil. *Bradea* 8 (26): 145-148.
- Moura, R.B. 2007. Estrutura genética populacional em lobeira (*Solanum lycocarpum* A.St.-Hil., Solanaceae), em ambientes naturais e antropizados no estado de Goiás. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 97 p.
- Nickrent, D. L. 2002. *Parasitic Plants of the World*. p. 7-27 in: López-sáez, J. A.; Catalán, P.; Sáez, L. (eds), *Parasitic Plants of the Iberian Peninsula and Balearic Islands*. Mundi-Prensa Libros, S. A., Madrid.

- Nixon, C.K. & Carpenter, J.M.N. 1993. On outgroups. *Cladistics* 9: 413-426.
- Olmstead, R. G.; dePamphilis, C. W.; Wolfe, A. D.; Young, N. D.; Elisons, W. J.; Reeves, P. A. 2001. Disintegration of Scrophulariaceae. *American Journal of Botany*, 88 (2): 348-361.
- Olmstead, R. G.; Reeves, P. A. 1995. Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplasr rbcL and ndhF sequences. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82: 176-193.
- Oxelman, B.; Kornhall, P.; Olmstead, R. G.; Bremer, B. 2005. Further disintegration of Scrophulariaceae. *Taxon*, 54 (2): 411-425.
- Palmer, J.D.; Jansen, R.K.; Michaels, H.J.; Chase, M.W. & Manhart, J.R. 1989. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 75: 1180-1206.
- Pennell, F.W. 1935. The Scrophulariaceae of eastern temperate North América. *Acad. Nat. Sci. Philadelphia Monogr.* 1: 1-650.
- Press, M. C.; Graves, J. D. 1995. *Parasitic Plants*. Malcolm C. Press and Jonathan D. Graves. London.
- Riopel, J. L.; Timko, M. P. 1995. Haustorial initiation and differentiation *In* Press M. C.; Graves, J. D. ed. *Parasitic Plants*. Chapman & Hall, New York.
- Rodrigues, J. B. 1883. *Esterhazyia superba*. Revista de Engenharia. 143-144.
- Santos, F.A.R. 1997. Scrophulariaceae do Brasil: morfologia polínica e suas implicações taxonômicas. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo. 187 p.
- Schmidt, J. A. 1862. Scrophularinae *In* Martius, C. F. P., Eichler, A.G. & Urban, I. (eds.). *Flora Brasiliensis* vol. 8(1): 229-340. Lipsiae Frid. Fleischer.
- Souza, V.C. 1990. Scrophulariaceae da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo. 339 p.
- Souza, V.C. 1996. Levantamento das espécies de Scrophulariaceae nativas do Brasil. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo. 391 p.
- Souza, V. C. 2001. Novidades taxonômicas em *Esterhazyia* J.C. Mikan (Scrophulariaceae). *Bradea* 8(36): 221-226.
- Souza, V.C. 2003. Scrophulariaceae *in* Wanderley, M.G.L. *et al.* (ed.), *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo* vol. 3: 297-321. São Paulo. FAPESP, Rima.
- Souza, V.C.; Lorenzi, H. 2008. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2 ed. Editora Plantarum, Nova Odessa. 704 p.
- Souza, V. C.; Andrade, M. J. G.; Giulietti, A. M. 2009. Orobanchaceae. *In* Giulietti, A. M.; Rapini, A.; Andrade, M. J. G.; Queiroz, L. P.; Silva, J. M. C. (org.) Plantas raras do Brasil. Belo Horizonte, MG : Conservação Internacional.
- Souza, V. C.; Giulietti, A. M. 2009. Levantamento das espécies de Scrophulariaceae sensu lato nativas do Brasil. *Pesquisas*, 60: 7-288.

Souza, V.C. 2010. Orobanchaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB012425>).

Tank, D. C.; Beardsley, P. M.; Kelchner, S. A.; Olmstead, R. G. 2006. Review of the systematics of Scrophulariaceae s.l. and their current disposition. *Australian Systematic Botany*. 19: 289-307.

Wathous, L.E. & Wheeler, Q.D. 1981. The outgroup comparison method of character analysis. *Syst. Zool.* 30 (1): 1-11.

Wolfe, A. D.; Randle, C. P.; Liu, L.; Steiner, K. E. 2005. Phylogeny and Biogeography of Orobanchaceae. *Folia Geobotanica*, 40: 115-134.

Yoder, J. L. 1999. Parasitic plant responses to host plant signals: a model for subterranean plant-plant interaction. *Current Opinion in Plant Biology*, 2:65–70.

Yoneyama, K.; Awad, A. A, Xie, X.; Yoneyama, K.; Takeuchi, Y. 2010. Strigolactones as Germination Stimulants for Root Parasitic Plants. *Plant Cell Physiol.* 51(7): 1095–1103.

Young, N. D.; Steiner, K. E.; Depamphilis, C. W. 1999. The Evolution of Parasitism in Scrophulariaceae/Orobanchaceae: Plastid Gene Sequences Refute an Evolutionary Transition Series. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86: 876-893.