

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Doutorando: **Eduardo Pasini**

Orientadora: **Dr^a. Sílvia T. S. Miotto**

Co-orientadora: **Dr^a. Tatiana Teixeira de Souza-Chies**

Colaboradora: **Dr^a. Liliana Katinas**

Filogenia, biogeografia e conservação do gênero *Trichocline*
Cass. (Asteraceae, Mutisieae)

1. Introdução

1.1. Abordagem sistemática

Asteraceae é uma das principais famílias botânicas dentre as angiospermas por apresentar o maior número de espécies descritas e aceitas até o momento. Estimativas mostram que apesar das 24.000 espécies já descritas, pode haver um total de 30.000 em 1600 a 1700 gêneros distribuídos ao redor do globo, com exceção da Antártida (Funk *et al.* 2009). As relações filogenéticas dentro da família estão cada vez mais claras, devido a trabalhos de biologia molecular (e.g. Jansen *et al.* 1991; Karis *et al.* 1992; Karis 1993; Kim & Jansen 1995; Kim *et al.* 2005; Panero & Funk 2008). Os resultados de tais trabalhos apontam uma natural dicotomia representada por dois grupos monofiléticos, a subfamília Barnadesioideae (Bremer & Jansen 1992), como o grupo mais cedo divergente, e o restante das Asteraceae. Atualmente, reconhece-se 12 subfamílias e 43 tribos (Funk *et al.* 2009).

A subfamília Mutisioideae representa grandes desafios na elucidação das relações filogenéticas da família, uma vez que é parafilética e juntamente com a subfamília Barnadesioideae constitui o clado-irmão dos demais agrupamentos (Funk *et al.* 2009). Atualmente, são aceitas duas classificações principais da subfamília, uma compreendida por estudos de natureza morfológica e

outra sustentada por evidências filogenéticas. O primeiro conceito (*Mutisioideae sensu lato*) compreende 74 gêneros e 865 espécies, distribuídas em três tribos, Mutisieae, Nassauvieae e Stifftieae (Katinas *et al.* 2008). O segundo (*Mutisioideae sensu stricto*) reconhece 44 gêneros e 630 espécies e divide o grupo em três clados ou tribos, *Mutisia* (tribo Mutisieae), *Nassauvia* (tribo Nassauvieae) e *Onoseris* (tribo Onoserideae) (Funk *et al.* 2009). O gênero *Trichocline* Cass. pertence à tribo Mutisieae.

A tribo Mutisieae passou por diversas mudanças em sua classificação, sendo de mais amplo uso a realizada por Cabrera (1977), o qual caracterizou a tribo por sua corola bilabiada, anteras caudadas e forma do estilete. Apesar de ter delimitado a tribo em quatro subtribos (Nassauvinae, Mutisiinae, Barnadesiinae, Gochnatiinae), o autor enfatizou que a circunscrição de muitos gêneros necessitava de revisões mais precisas. Dessa forma, Hansen (1991) realizou a primeira análise morfológica da tribo indicando a monofilia da mesma, através de caracteres celulares como sinapomorfias. Entretanto, o estudo morfológico realizado por Karis *et al.* (1992) deixou clara a parafilia da tribo, uma vez que demonstrou que a relação entre Gochnatiinae e Mutisiinae não era sustentada. Atualmente, a tribo Mutisieae é constituída por 43 gêneros e 500 espécies predominantemente sul-americanas com representantes na América Central, Ásia, África e Austrália (Katinas *et al.* 2008).

Trichocline é representado por ervas perenes, rosuladas, de escapo monocefálico e flores do raio com corola bilabiado-liguladas, apresentando estaminódios. Atualmente são conhecidas cerca de 22 espécies com distribuição predominantemente sul-americana, ocorrendo em duas regiões bem definidas, a andina, a oeste da Bolívia, Chile e oeste da Argentina até o norte da Patagônia, e a sul-brasileira e países adjacentes. Zardini (1975) sugere que as espécies sul-brasileiras sejam as mais basais, sendo a região andina um centro de diversificação secundário. Apesar da distribuição principalmente sul-americana, o gênero possui uma curiosa disjunção geográfica, com apenas uma espécie na Austrália, *Trichocline spathulata* (A. Cunn. ex DC.) J. H. Willis. A espécie possui um confuso histórico nomenclatural, uma vez que já esteve circunscrita no gênero monotípico *Amblyperma*, descrito por Bentham em Endlicher *et al.* (1837). Atualmente Katinas (2004) indica que a espécie deva ser incluída em *Trichocline*, devido à falta de caracteres diagnósticos que separem os dois gêneros, colocando *Amblyperma* em sinonímia. Apesar disso, Keighery (2005) descobriu uma nova espécie de Mutisieae australiana colocando-a no gênero *Amblyperma*, fato que coloca em dúvida a real circunscrição do gênero.

Atualmente, o gênero *Trichocline* está inserido no Complexo-*Gerbera* (Jeffrey 1967, Hansen 1985, 1990), um grupo monofilético representado por sete gêneros (*Chaptalia* Vent., *Gerbera* L., *Leibnitzia* Cass., *Lulia* Zardini, *Perdicium* L., *Piloselloides* L. e *Uechtrizia* Freyn.) da subtribo

Mutisiinae (Mutisieae), os quais apresentam escapos monocefálicos e hábito herbáceo como características em comum. As relações genéricas ainda encontram-se em constante fluxo, uma vez que são poucos os caracteres que delimitam os gêneros. Além disso, alguns caracteres utilizados mostram-se variáveis dentro do grupo, como a presença ou ausência de estaminódios nas flores do raio. Estas características fizeram com que as relações infragenéricas de espécies como *Gerbera hintonii* (Bullock) Katinas fossem arduamente discutidas (Katinas 1998, 2004; Nesom 2004a, b). Embora muito tenha sido discutido, as relações genéricas continuam incertas e somente serão solucionadas quando todos os gêneros do complexo forem tratados individualmente (Katinas 2004).

1.2. Estudos filogenéticos moleculares

Através do advento da biologia molecular, estudos sobre a sistemática dos organismos tornaram-se mais precisos, de forma que o histórico e as relações evolutivas entre os táxons puderam ser analisados minuciosamente. Por muito tempo, naturalistas e taxonomistas clássicos, obtiveram informações sobre o parentesco e a relação entre os táxons através de características organolépticas, de forma criteriosa, porém subjetiva. Dados morfológicos, biogeográficos e ecológicos podem ser de grande importância para separar táxons, entretanto podem não refletir suas reais relações de parentescos. Atualmente esses estudos podem ser complementados através da análise das taxas de mutação dos táxons, por meio de técnicas de biologia molecular. Um exemplo disso é o estudo da variabilidade de sequências de aminoácidos em proteínas, as quais são pouco variáveis ao longo do tempo em diferentes linhagens e podem ser aplicadas no estudo de evolução de sequências de DNA (Schneider 2007). Eventos de mutação no DNA, acumulados ao longo da escala evolutiva dos táxons, são informativos na inferência do tempo de divergência entre os mesmos. A fim de calibrar a origem da árvore filogenética, dados de registros fósseis ou geológicos podem ser utilizados e comparados com as diferentes taxas de mutação dos nós ao longo da árvore.

Estudos moleculares são baseados em três tipos diferentes de genoma, o plastidial, o mitocondrial e o nuclear. Para estudos sistemáticos em grandes grupos de plantas o genoma plastidial é o mais utilizado, uma vez que apresenta baixas taxas de mutação, é muito abundante na célula e é facilmente isolado em grandes quantidades. Algumas das sequências mais comumente utilizadas em filogenias são: *matK*, *ndhD*, *ndhF*, *ndhI*, *rbcL* e *rpoB*. Genes plastidiais como *rbcL* e *ndhF* foram amplamente utilizados para inferência de níveis supragenéricos e até mesmo para subfamílias de Asteraceae (Kim & Jansen 1995; Jansen & Kim 1996; Panero & Funk 2008). Entretanto, para inferências filogenéticas entre táxons próximos, como populações de uma mesma espécie, ou relações infragenéricas é necessário a utilização de genes com taxas de mutações mais elevadas como as regiões ITS e que intercalam os genes do rDNA do genoma nuclear (Judd *et al.*

2008). Apesar disso, Panero & Funk (2008) indicam que genes plastidiais como o *matK* também podem ser utilizados com sucesso para estudos de natureza intragenéricas e infragenéricas na família Asteraceae, citando trabalhos de Susanna *et al.* (2006), Wagstaff *et al.* (2006) e Watanabe *et al.* (2006) como exemplos.

Estudos de filogenia molecular tratando os gêneros do Complexo-*Gerbera* são escassos. Kim *et al.* (2002) com finalidade de inferir relações filogenéticas entre os gêneros da tribo Mutisieae, analisaram parte dos gêneros do Complexo-*Gerbera*, resultando no agrupamento monofilético de *Chaptalia*, *Gerbera* e *Leibnitzia*. Apesar da ampla variedade de táxons analisados, os autores não incluíram todos os gêneros do complexo, não sendo possível testar a monofilia dos mesmos. Recentemente, Baird *et al.* (2010) analisaram a filogenia e biogeografia histórica das espécies de *Leibnitzia* e algumas espécies dos gêneros *Chaptalia*, *Gerbera* e *Trichocline*, utilizando *Mutisia orbygniana* Wedd. como grupo-externo. Dentre os resultados obtidos através da análise de DNA plastidial e nuclear, o agrupamento de *Chaptalia*, *Gerbera* e *Leibnitzia* mostrou-se irmão de *Trichocline*. Apesar disso, os autores apontam que não foi possível verificar sua monofilia devido à amostragem incompleta das espécies. Estudos filogenéticos moleculares sobre a evolução e biogeografia histórica que tratem especificamente de *Trichocline* inexistem.

2. Justificativa

2.1. Relações filogenéticas e biogeográficas

O gênero *Trichocline* apresenta espécies que ocorrem na América do Sul em dois principais centros de diversidade, o andino e o sul-brasileiro, além de uma espécie ocorrer na Austrália (Zardini 1975; Katinas *et al.* 2008). Entretanto as relações evolutivas entre as espécies, assim como o centro de origem do gênero ainda são incertas, sendo que o único trabalho abordando tais aspectos é o de Zardini (1975). Dados moleculares poderão elucidar as relações evolutivas dos táxons e indicar como ocorreram eventos de especiação e irradiação em um contexto filogenético e biogeográfico, assim como confirmar a circunscrição dos táxons, inclusive da espécie australiana. Além disso, análises biogeográficas quando comparadas ao cladograma gerado pelas análises filogenéticas, poderão indicar a provável área de origem do gênero e quais processos biogeográficos (dispersão, vicariância ou extinção) levaram a atual distribuição das espécies.

2.2. O Complexo-*Gerbera*

Os gêneros do Complexo-*Gerbera* encontram-se ainda com delimitação incerta e suas relações não foram esclarecidas. Isso pode ser observado através de muitos trabalhos taxonômicos que devido a caracteres variáveis dentro dos gêneros, propõem novas combinações nomenclaturais

para as espécies. Além disso, análises filogenéticas moleculares dos gêneros separadamente são escassas. A filogenia de *Trichocline* poderá fornecer dados sobre suas relações dentro do Complexo-*Gerbera*, assim como, rever a circunscrição das espécies do gênero.

2.3. Conservação das espécies

As espécies do gênero *Trichocline* ocorrem em ambientes campestres, ou transicionais entre campo e floresta. Essas formações encontram-se atualmente ameaçadas, devido a impactos como a prática do fogo com manejo impróprio, a presença intensiva de gado, coleta de material *in situ* para fins medicinais e principalmente o cultivo de espécies exóticas. Durante a revisão do gênero *Trichocline* no Rio Grande do Sul (Pasini & Ritter, em prep.), concluiu-se que algumas espécies levantadas encontram-se em algum grau de ameaça conforme os parâmetros da IUCN (2001), devido às atividades antrópicas observadas nos locais de ocorrência das populações. Além disso, algumas dessas espécies podem ser consideradas endêmicas de acordo com o detalhamento ecológico (e.g. fitogeográfico, altitudinal, edáfico), como *T. catharinensis* Cabrera, *T. cisplatina* E.Pasini & M.R.Ritter, *T. macrocephala* Less. e *T. maxima* Less. Entretanto dados sobre o estado de conservação das demais espécies são escassos ou até mesmo inexistentes. Dessa forma, análises relacionadas a conservação dos habitats e das espécies, conforme os critérios da IUCN (2001), são necessárias para eleger áreas prioritárias para a conservação.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Inferir uma filogenia para o gênero através de marcadores moleculares, auxiliando na compreensão dos processos de especiação e relação evolutiva entre as espécies.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar o monofiletismo de *Trichocline*;
- Propor hipóteses biogeográficas através da filogenia do gênero;
- Fornecer dados moleculares que auxiliem na elucidação das relações genéricas e infragenéricas no Complexo-*Gerbera*;
- Resolver problemas nomenclaturais no gênero;
- Fornecer dados sobre a conservação das espécies.

4. Hipóteses

- O gênero *Trichocline* é monofilético;
- Os dois grandes grupos de *Trichocline* na América do Sul (andino e sul-brasileiro) formam dois clados separados;
- Os processos biogeográficos que ocasionaram a separação do gênero em dois grupos na América do Sul foram de vicariância e dispersão a longa distância. Em relação à espécie australiana, por apresentar características morfológicas similares com *T. aurea*, espécie do norte do Chile, acredita-se que pode ter havido um evento de dispersão a longa distância das populações ancestrais por meio das ilhas do Pacífico localizadas entre os dois continentes;
- *Trichocline* está circunscrito no Complexo-*Gerbera*;
- A maior parte das espécies encontram-se em risco de extinção, de acordo com observações a campo e informações das exsicatas dos herbários já revisados.

5. Materiais e métodos

5.1. Material vegetal e amostragem dos táxons

Será coletado material vegetal das 22 espécies de *Trichocline*, através de coletas em sílica-gel, assim como de espécies dos gêneros do Complexo-*Gerbera*, para analisar as relações filogenéticas de *Trichocline* dentro do complexo. Como grupo-externo serão utilizadas espécies do gênero *Brachyclados* D. Don, grupo-irmão de *Trichocline*, conforme Panero & Funk (2008). Dentre as espécies que serão analisadas do gênero *Trichocline*, dez ocorrem no sul e sudeste do Brasil (PR, RS, SC e SP) e regiões adjacentes (Argentina, nas províncias de Corrientes, Entre Rios e Misiones, Paraguai e Uruguai); aproximadamente 12 espécies ocorrem na região andina (Argentina, Bolívia, Chile e Peru) e central da Argentina até o norte da Patagônia e apenas uma na Austrália. Categorias infra-específicas como forma, subespécie ou variedade não serão consideradas. As informações serão complementadas com a utilização de sequências disponíveis no Genbank (National Center for Biotechnology Information, website www.ncbi.nlm.nih.gov), assim como de sequências disponíveis em bancos de dados de DNA. Dentre as espécies que apresentam sequências depositadas no Genbank estão: *T. aurea* Reiche, *T. boecheri* Cabrera, *T. catharinensis*, *T. macrocephala* e *T. speciosa* Less. Materiais de exsicatas poderão também ser utilizados para extrações de DNA.

O material coletado será depositado no herbário ICN e duplicatas serão enviadas para herbários de instituições envolvidas no projeto. As espécies serão coletadas em diferentes Unidades de Conservação; dentre as brasileiras destacam-se: Parque Estadual Vila Velha; Estação Ecológica do Caiuá; Estação Ecológica Guaraguacú; Parque Estadual de Campinhos; Parque Estadual de Ibicatu; Parque Estadual de Guartelá; Parque Estadual Mata dos Godoy; Parque Estadual Pico

Marumbi; Parque Estadual Rio Guarani (Paraná); Parque Nacional de Aparados da Serra; Parque Nacional da Serra Geral; Floresta Nacional de São Francisco de Paula (Rio Grande do Sul).

5.2. Extração de DNA

A extração de DNA será feita utilizando folhas secas coletadas em sílica-gel. As amostras extraídas serão depositadas no Banco de DNA do herbário ICN da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Banco de DNA do Museo de La Plata, Argentina. As sequências resultantes serão depositadas no Genbank. A extração de DNA será feita através do método de CTAB descrito por Doyle & Doyle (1987). Aproximadamente 20-50 mg de folhas secas serão utilizadas para a extração de DNA. Caso necessário, amostras de exsicatas poderão ser utilizadas para completar a amostragem.

Para verificar a qualidade do DNA extraído e também quantificá-lo, uma alíquota será submetida à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X, corado com GelRed. Juntamente com as amostras, serão aplicados padrões de quantificação de DNA Lambda para que a concentração do DNA extraído possa ser inferida. Os DNAs serão igualmente quantificados em espectrofotômetro Nanodrop.

5.3. Amplificação e Sequenciamento

Após extração, o DNA será amplificado através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os espaçadores internos ITS1 e ITS2 e o gene que codifica RNA ribossomal 5.8S, os genes *matK*, *ndhF*, *trnQ-rps16* e o íntron *trnL-rpl32* serão amplificadas inicialmente em um número pequeno de amostras. Os primers utilizados para cada sequência serão conforme indicados por Baldwin (1992) para os espaçadores internos ITS1 e ITS2 e 5.8S; Panero & Funk (2008) para os genes *matK* e *ndhF* e Baird *et al.* (2010) para o íntron *trnL-rpl32*. Estes marcadores mostram-se apropriados para melhores resoluções em táxons proximamente relacionados em Asteraceae conforme os estudos de Jansen (1991); Baldwin (1992); Kim *et al.* (2002); Susanna *et al.* (2006); Wagstaff *et al.* (2006) e Watanabe *et al.* (2006).

As reações de PCR serão feitas num volume final de 25 µL, contendo cerca de 30 ng de DNA, 1 mM de dNTPs, Tampão 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 2 mM MgCl₂), 10 pmol de cada primer e 1 U de *Taq* DNA polimerase. As amplificações serão feitas sob as seguintes condições: ITS: 5 minutos de desnaturação à 94°C, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 10 minutos para amplificação; *matK*: 2 minutos de desnaturação a 95°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 a 60 segundos a 55-57°C para anelamento dos *primers*, 2 minutos a 72°C e finalizando com 7 minutos de amplificação a

72°C; *ndhF*: 30 ciclos por 1 minuto à 94°C para desnaturação, 1 minuto à 94°C para o anelamento e 2 minutos à 72°C para a amplificação; íntron *trnL-rpl32*: 6 ciclos de 1 minuto à 94°C para desnaturação, 34 ciclos à 52°C por 1 minuto de anelamento e 1 minuto à 58°C e 2 minutos e 30 segundos à 72°C para amplificação.

Com o intuito de verificar o resultado da amplificação das regiões selecionadas, 5 µL de cada reação serão submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed. Será utilizado um padrão de peso molecular, ou Ladder 100pb, para confirmar o tamanho do amplicon gerado.

Os produtos de PCR serão purificados (Qiagen PCR Purification kit, Qiagen Ltd.) e, posteriormente, sequenciados nos dois sentidos com os mesmos primers usados na amplificação. Os sequenciamentos serão feitos em sequenciador automático.

5.4. Análise das sequências

As sequências serão analisadas para verificação de sua qualidade e posteriormente serão editadas, conforme a necessidade. O programa utilizado para as análises será o ChromasPro™ (Technelysium Pty Ltd). As sequências serão alinhadas por meio do aplicativo ClustalW (Thompson *et al.* 1994) implementado no programa BioEdit (Hall 1999).

5.5. Análise filogenética

As análises filogenéticas serão feitas através de programas com diferentes abordagens, aplicando-os separadamente em todo o conjunto de dados.

Será utilizado o programa PAUP* 4 (Swofford 2003) para análises de máxima verossimilhança, realizando buscas heurísticas das árvores mais parcimoniosas com adição aleatória de sequências (opção RANDOM) com 1000 réplicas, com retenção de múltiplas árvores mais parcimoniosas. As árvores de consenso estrito e de maioria serão inferidas para cada análise, e os valores de bootstrap serão inferidos usando algoritmos de busca heurística. Para as árvores mais parcimoniosas serão calculados índices de consistência (IC), de retenção (IR) e de consistência rescalonado (RC). Os dados serão analisados de forma combinada através do Teste de Homogeneidade de Partição (THP) (Farris *et al.* 1994), indicando se a combinação dos dados é adequada para a montagem de uma árvore filogenética.

A análise bayesiana será realizada através do programa MrBayes 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001), estimando os parâmetros iniciais pelo AIC em cada conjunto de dados, utilizando o programa ModelTest 3.7 (Posada & Crandall 1998). Serão usadas 5.000.000 de gerações, com quatro cadeias, com amostragem a cada 100 gerações. As gerações anteriores à convergência das cadeias serão excluídas e uma árvore de consenso de maioria (50%) será computada a partir das árvores amostradas depois da convergência. As probabilidades posteriores serão usadas como valores de suporte para os agrupamentos.

Para analisar o monofiletismo do gênero serão testadas hipóteses de agrupamento alternativas às mostradas pela árvore filogenética. Nos testes serão usadas restrições, onde grupos monofiléticos *a priori* serão forçados.

Será feita uma matriz de dados morfológicos através do programa Nexus Data Editor (Page 2001), com intuito de compreender a evolução de caracteres no gênero, analisando a matriz de dados através do programa MacClade 4.0 (Maddison & Maddison 2001). Os caracteres morfológicos serão elencados de acordo com Zardini (1975), Katinas *et al.* (2008) e observações das espécies em materiais coletados ou de herbários.

5.6 Análises biogeográficas

A distribuição das espécies será dividida em nove áreas de endemismos: norte da Argentina, leste da Argentina (Corrientes, Entre Rios, Misiones), sul da Argentina, oeste da Bolívia, sul do Brasil (PR, RS, SC), sudeste do Brasil (MG, RJ, SP), Chile, Uruguai e sudoeste da Austrália. A área ancestral será reconstruída usando o programa DIVA 1.1 (Ronquist 1996), de acordo com o método de dispersão-vicariância (Ronquist 1997; Crisci *et al.* 2003). O método utilizado otimiza eventos de vicariância e minimiza o número de eventos de dispersão e extinção, permitindo observar as múltiplas relações entre as áreas elencadas.

5.7. Conservação das espécies

As espécies serão analisadas conforme seus graus de endemismos e presença e ausência em áreas onde ocorrem impactos antrópicos. Serão utilizados os parâmetros propostos pela IUCN (2001) para enquadrar as espécies de acordo com seus graus de ameaça, auxiliando na tomada de decisões para conservação das mesmas.

6.. Lista de atividades e respectivos cronogramas

Atividades	2012		2013		2014		2015	
	1º Semestre	2º Semestre	1º Semestre	2º Semestre	1º Semestre	2º Semestre	1º Semestre	2º Semestre
1. Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	
2. Prova de proficiência em língua estrangeira	X							
3. Elaboração do projeto definitivo	X							
3. Disciplinas	X	X						
4. Revisão de herbários	X	X	X	X				

5. Trabalho de campo	x	x	x	x				
6. Extração e análise de DNA		x	x					
7. Doutorado Sanduíche *					x	x		
8. Análise dos dados				x	x	x	x	x
9. Qualificação						x		
10. Redação da tese				x	x	x	x	x
11. Submissão de artigos **						x	x	x
12. Defesa da tese								x

* Será solicitada uma bolsa para Doutorado Sanduíche no primeiro semestre de 2014. O objetivo do intercâmbio é analisar os resultados obtidos, com a Dr^a Liliana Katinas, da Divisão de Plantas Vasculares do Museo de La Plata, Argentina. A colaboração já foi estabelecida e o intercâmbio aceito, objetivando também o treinamento em métodos para análises biogeográficas e relacionadas à conservação das espécies.

** Através dos resultados objetiva-se publicar quatro artigos científicos em periódicos internacionais como American Journal of Botany, Annals of Botany, Systematic Botany e Molecular Phylogenetics and Evolution.

7. Infra-estrutura e recursos necessários

Ítems	Valor unitário	Quantidade	Total
Combustível	R\$ 2,60	700 litros	R\$ 1.820,00
Diárias para excursões de coleta	R\$ 177,00	35 diárias	R\$ 6.195,00
Passagens de avião	R\$ 1.000,00	5 passagens internacionais	R\$ 5.000,00
Reagentes para extração, amplificação e purificação de DNA	-	-	R\$ 5.000,00
Sequenciamento de DNA	-	-	R\$ 10.000,00
Total geral			R\$ 28.015,00

Para obtenção de financiamento, o presente projeto será submetido a editais das principais agências de fomento do país: CNPq, CAPES e FAPERGS.

9. Previsão de publicações

Através dos resultados objetiva-se publicar quatro artigos científicos em periódicos internacionais como *American Journal of Botany*, *Annals of Botany*, *Systematic Botany* e *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Os assuntos abordados nos artigos serão referentes à filogenia do gênero, biogeografia, conservação e novidades taxonômicas e nomenclaturais.

10. Referências bibliográficas

Baldwin, B. G. (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 3–16.

Bentham, G. (1837) *Amblysperma*. P. 67 in: Endlicher, S. L., Fenzl, E., Bentham, G. & Schott, H. W. (eds.), *Enumeratio Plantarum*. F. Beck, Vienna.

Bremer, K. & Jansen, R.K. (1992) A new subfamily of the Asteraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79: 414–415.

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. Academic Press, London.

Crisci, J. V., Katinas, L.; Posadas, P. (2003) *Historical biogeography: an introduction*. Boston: Harvard University Press.

Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.

Farris, J. S.; Kallersjo, M.; Kluge, A. G. & Bult, C. (1994) Testing Significance of Incongruence. *Cladistics* 10(3): 315-319.

Funk, V.A., *et al.* (eds.) (2009) *Systematics, Evolution and Biogeographics of Compositae*. IAPT, Vienna, 965 pp.

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.

Hansen, H.V. (1985) Notes on *Gerbera* sect. *Pseudoseris* (Compositae-Mutisieae). *Nordic Journal of Botany* 5: 451–453.

Hansen, H.V. (1990) Phylogenetic studies in the *Gerbera*-complex (Compositae, tribe Mutisieae, subtribe Mutisiinae). *Nordic Journal of Botany* 9: 469–485.

Hansen, H.V. (1991) Phylogenetic studies in Compositae tribe Mutisieae. *Opera Botanica* 109: 1-50.

Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8): 754-5.

IUCN (2001) *IUCN red list categories and criteria*, version 3.1. IUCN Red List Unit, Cambridge U.K. Available from: http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/red_list/about_the_red_list/ (accessed: 20 Aug 2011).

Jansen, R.K., Wallace, R.S., Kim, K.-J. & Chambers, K.L. (1991) Systematic implications of chloroplast DNA variation in the subtribe Microseridinae (Asteraceae: Lactuceae). *American Journal of Botany* 78: 1015–1027.

Jansen, R.K. & Kim, K.-J. (1996) Implications of chloroplast DNA data for the classification and phylogeny of the Asteraceae. Pp. 317–339 in: Hind, D.J.N. & Beentje, H.J. (eds.), *Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994*, vol. 1, *Compositae: Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew.

- Jeffrey, C. (1967) Notes on Compositae, III. The Cynareae in east tropical Africa. *Kew Bulletin* 22: 107–140.
- Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F. & Donoghue, M. J. (2002) *Plant systematics: a phylogenetic approach*. 2nd. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., xvi, 576 p.
- Katinas, L. (1998) The Mexican *Chaptaliahintonii* is a *Gerbera* (Asteraceae, Mutisieae). *Novon* 8: 380–385.
- Katinas, L. (2004) The *Gerbera*-complex (Asteraceae, Mutisieae): to split or not to split. *Sida* 21 (2): 935–940.
- Katinas, L., Pruski, J. F., Sancho, G. & Telleria, M.C. (2008) The subfamily Mutisioideae (Asteraceae). *Botanical Review* 74: 469–716.
- Karis, P. O. (1992) *Hoplophyllum* DC., the sister group to *Eremothamnus* O. Hoff m. (Asteraceae). *Taxon* 41: 193–198.
- Karis, P. O. (1993) Heliantheae *sensu lato* (Asteraceae), clades and classification. *Plant Systematics and Evolution* 188: 139–195.
- Keighery, G. J. (2005) A new species of *Amblysperma* (Asteraceae: Mutisieae). *Compositae Newsletter* 42: 26–31.
- Kim, K.-J. & Jansen, R.K. (1995) *NdhF* sequence evolution and the major clades in the sunflower family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 10379–10383.
- Kim, H.-G., Loockerman, D.J. & Jansen, R.K. (2002) Systematic implications of *ndhF* sequence variation in the Mutisieae (Asteraceae). *Systematic Botany* 27: 598–609.
- Kim, H.-G., Choi, K.-S. & Jansen, R.K. (2005) Two chloroplast DNA inversions originated simultaneously during the early evolution of the sunflower family (Asteraceae). *Molecular Biology and Evolution* 22: 1–10.

- Maddison, D. & Maddison, W. (2001) MacClade 4: Analysis of Phylogeny and Character Evolution. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Malme, G. O. A. N. (1931) Die Compositen der zweiten Regnellschen Reise I. Rio Grande do Sul. *Arkiv för Botanik* 24 (8): 50-52.
- Nesom, G. L. (2004a) Generic placement of *Chaptalia hintonii* (Asteraceae: Mutisieae). *Sida* 21 (2): 929-933.
- Nesom, G. L. (2004b) Response to “The *Gerbera*-complex (Asteraceae, Mutisieae): to split or not to split” by Liliana Katinas. *Sida* 21(2): 941–942.
- Page, R. D. M. (2001) NDE (NEXUS data editor for windows). Version 0.5.0 NDE- home page (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/NDE/nde.html>).
- Panero, J.L. & Funk, V.A. (2008) The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47:757–782.
- Posada, D. & Crandall, K. A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817-8.
- Ronquist, F. (1996) DIVA version 1.1. Computer program and manual available by anonymous FTP from Uppsala University (<ftp.uu.se> or <ftp.systbot.uu.se>).
- Ronquist, F. (1997) Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* 46: 195–203.
- Schneider, H. (2007) *Métodos de Análise Filogenética: Um Guia Prático*. 3a ed. Holos Editora Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, 200 p.
- Swofford, D. L. (2003) *PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony* (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.

Susanna, A., García-Jacas, N.T., Hidalgo, O., Vilatersana, R., Garnatje, T., (2006) The Cardueae (Compositae) revisited: insights from a ITS, trnL-trnF and matK nuclear and chloroplast DNA analysis. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 93: 150–171.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22 (22): 4673-80.

Wagstaff, S.J., Breitwieser, I., Swenson, U., (2006) Origin and relationships of the austral genus *Abrotanella* (Asteraceae) inferred from DNA sequences. *Taxon* 55: 95–106.

Watanabe, K., Kosuge, K., Simamura, R., Konishi, N., Taniguchi, K., 2006. Molecular systematics of Australian *Calotis* (Asteraceae: Astereae). *Austral. Syst. Bot.* 19: 155–168.

Zardini, E.M. 1975. Revisión del género *Trichocline* (Compositae). *Darwiniana* 19: 618–733.