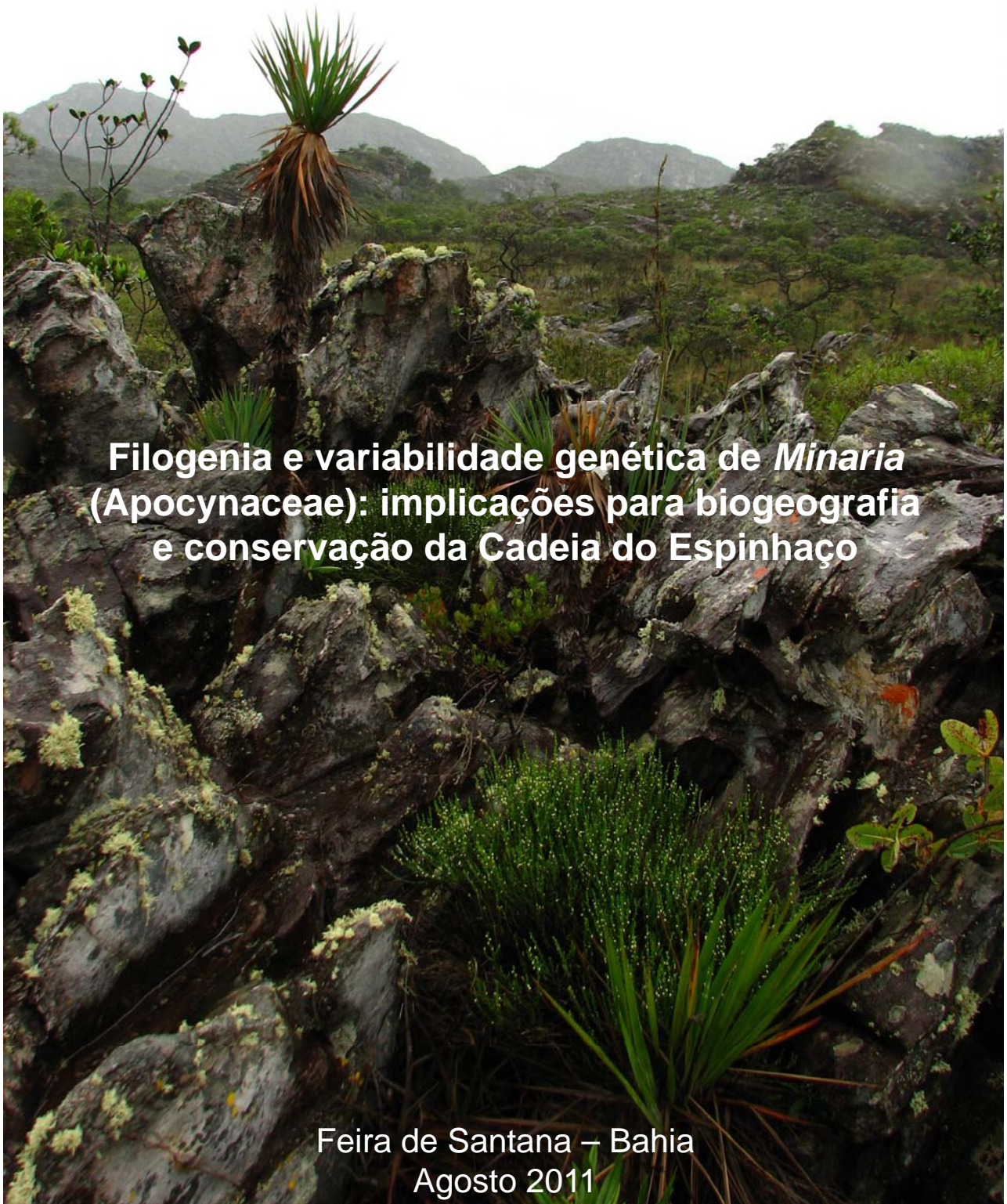


**Patrícia Luz Ribeiro**



**Filogenia e variabilidade genética de *Minaria*  
(Apocynaceae): implicações para biogeografia  
e conservação da Cadeia do Espinhaço**

Feira de Santana – Bahia  
Agosto 2011

Patrícia Luz Ribeiro

**Filogenia e variabilidade genética de *Minaria*  
(Apocynaceae): implicações para biogeografia e  
conservação da Cadeia do Espinhaço**

Feira de Santana – Bahia  
Agosto 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA



# Filogenia e variabilidade genética de *Minaria* (Apocynaceae): implicações para biogeografia e conservação da Cadeia do Espinhaço

Patrícia Luz Ribeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Rapini (UEFS)  
Co-orientador: Prof. Dr. Cássio van den Berg (UEFS)

Feira de Santana – Bahia  
Agosto 2011

*“The preservation of biological diversity depends upon an understanding of both the processes that create new species and those that determine species persistence.”*

*Bevill & Louda, 1999*

## **Agradecimentos**

À equipe de apoio financeiro...

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela bolsa no momento inicial do projeto e pelo apoio ao projeto “Diversidade e Filogenia das Asclepiadoideae (Apocynaceae) brasileiras, com ênfase na flora do Nordeste”. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida no final do doutorado, que permitiu o desenvolvimento deste projeto em regime de dedicação exclusiva.

À CAPES, pelo apoio mediante o projeto “Rede interdisciplinar de pesquisa botânica na Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado (Edital PNADB 17/2009-CAPES)”.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), pelo apoio através do projeto “Núcleo de excelência em sistemática e variabilidade molecular de plantas e fungos (PRONEX)”.

Aos projetos PPBIO e IMSEAR, pelo apoio nas coletas.

À Pós-graduação, pelo apoio nas diárias de coleta e cursos externos realizados.

À equipe de apoio...

Aos funcionários do Lamol, Ricardo e Jonildison, e do HUEFS.

Às funcionárias da secretaria da pós, Adriana e Gardênia.

Aos amigos aos quais passei um pouco da minha experiência como orientadora no Lamol: Herlon, Juliana, Lara e Norma. Obrigada pela grande ajuda!

Ao pessoal do Grupo de Discussão da UEFS, pelas colaborações em correções e valiosas discussões dos temas relacionados à tese.

Ao IBAMA, pelo licenciamento e incentivo às coletas nos Parques Nacionais da Serra do Cipó, Serra da Canastra, Sempre Vivas, Chapada dos Veadeiros, Chapada dos Guimarães e Chapada Diamantina.

Ao Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais, por toda atenção e colaboração para o licenciamento de coletas nos Parques Estaduais de Minas Gerais; entre eles, Biribiri, Rio Preto e Rola Moça.

Ao Professor Gert Hatshbach, pelo apoio logístico em coletas no Paraná.

Ao Professor Alessandro Rapini, primeiro por aceitar me orientar, mesmo que não se achasse preparado, por todos os ensinamentos, discussões e apoio constantes.

Ao Professor Cássio van den Berg, por todo apoio logístico no laboratório, auxílio nas análises e revisão dos manuscritos.

À Leilton Danascena, o mestre dos mapas, pelo apoio, amizade, e pelo capricho nas imagens e análises ecológicas.

À torcida organizada...

Aos familiares, meus pais e irmãos, sogros e cunhados, pelo carinho e apoio sempre. Aos amores, Romualdo Júnior e João Pedro, por todo amor, compreensão e apoio incondicional.

Aos amigos do curso e da UEFS em especial àqueles com os quais compartilhei termocicladores, géis, pipetas e experiências no Lamol, dentre eles: Alisson, Andréa Karla, Cláudia, Élvia, Fabrício Moreira, Floriano, Maria Cristina, Paulo Ricardo, Sabrina Lambert, Silvana Ferreira, Sílvia Letícia, Tarciso Maia e Uiara Catharina.

Aos amigos da 'sala de estudos', ou quase isso, por todos os momentos de descontração e valiosas colaborações de alimentos do corpo e da mente. Aline, Ana Luiza, Anderson, Ariane, Cristiane, Fábio, Marla, Tuti, Juliana, Hibert, Sâmia e muitos outros.

## Índice

Resumo.....	i
-------------	---

### Capítulo 1: **Filogenia e análise espacial da diversidade filogenética de *Minaria* (Apocynaceae): acessando áreas prioritárias para conservação na Cadeia do Espinhaço, Brasil**

Resumo.....	2
Introdução .....	3
Sistemática de <i>Minaria</i> .....	5
Busca por marcadores filogenéticos .....	6
Material e métodos	
Extração do DNA total, amplificação e sequenciamento.....	9
Seleção dos marcadores .....	10
Dados morfológicos .....	13
Amostragem.....	13
Análises filogenéticas.....	13
Congruência entre dados e árvores .....	14
Análise espacial da diversidade filogenética .....	15
Resultados	
Marcadores moleculares.....	15
Congruência entre dados e árvores .....	20
Reconstrução filogenética .....	22
Análise espacial da diversidade filogenética .....	29
Discussão	
Variação molecular .....	37
Congruência entre conjunto de dados e topologias.....	38
Relações filogenéticas em <i>Minaria</i> .....	39
Distribuição da diversidade filogenética e implicações para conservação ..	41
Literatura Citada.....	44
Anexos .....	45

### Capítulo 2: (Submetido) **Do model-based phylogenetic analyses perform better than parsimony? A response illustrated with *Minaria* (Apocynaceae) phylogenetics**

Abstract.....	62
Introduction .....	63
Material and Methods.....	64
Results.....	66
Discussion .....	78
Final Remarks .....	84
References .....	86
Appendix .....	92

### Capítulo 3: **Diversificação na Cadeia do Espinhaço com base na biogeografia de um gênero predominantemente endêmico dos campos rupestres**

Resumo.....	97
Introdução .....	99
Material e métodos	
Datação .....	101
Análises biogeográficas.....	102
Resultados .....	105
Discussão	
Diversificação de <i>Minaria</i> .....	111
Diversificação na Cadeia do Espinhaço.....	115
Conclusão .....	117
Referências .....	117
Suplementos .....	123

### Capítulo 4: **Variabilidade genética de espécies de *Minaria* (Apocynaceae) com diferentes extensões de distribuição**

Resumo.....	131
Introdução .....	132
Material e métodos	
Amostragem, extração e amplificação.....	133
Análises dos dados .....	134
Resultados .....	141
Discussão	
Diversidade genética .....	146
Estrutura genética populacional.....	147
Considerações finais.....	149
Referências .....	150
Anexos .....	156



## Resumo

Espécies cosmopolitas são raras; por motivos históricos e biológicos, a maioria das espécies está restrita a uma determinada região geográfica. Áreas com alta diversidade de endemismos representam unidades evolutivas que merecem atenção especial e sua conservação está intimamente relacionada à origem e manutenção dos processos biológicos que elas abrigam. Linhagens microendêmicas, especialmente representadas por espécies de distribuição restrita, tendem a apresentar baixa variabilidade genética e fenótipos especializados, geralmente se mantendo isoladas em ilhas e topos de morros. Elas estão frequentemente ameaçadas por atividades antrópicas que levem à destruição de seu habitat, mas também por razões naturais, como a perda contínua de variabilidade por endogamia e as consequências intrínsecas deste processo.

A conservação da biodiversidade depende não apenas da proteção de indivíduos em unidades de conservação, mas principalmente da preservação dos processos responsáveis pela manutenção de suas populações a longo prazo. Dessa maneira, é imprescindível que sejam detectadas áreas relevantes à manutenção desses processos e reconhecidos fatores determinantes para a conservação das linhagens. O presente estudo teve como objetivo investigar a origem e a manutenção da diversidade nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, uma região rica em espécies e com altas taxas de endemismos, a partir da biogeografia filogenética de *Minaria* T.U.P. Konno & Rapini e da variabilidade genética de suas espécies. O gênero é composto predominantemente por espécies endêmicas dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, mas possui desde espécies com ampla distribuição geográfica até espécies confinadas a áreas bastante restritas.

A biodiversidade singular da Cadeia do Espinhaço vem estimulando o desenvolvimento de estudos florísticos em suas serras há décadas. Geralmente esta diversidade está associada aos campos rupestres que ocorrem acima de 900 m de altitude, é marcado pela presença de afloramentos rochosos quartzíticos e solo arenoso, abrigando diversas comunidades vegetais. Partindo de informações florísticas e dados de estruturação populacional, fica evidente que a região é caracterizada por uma alta diversidade beta em diferentes níveis. Dessa maneira, o conhecimento desigual e incompleto ao longo da Cadeia do Espinhaço pode levar à seleção de áreas que não necessariamente são as mais relevantes biologicamente. Elas podem representar simplesmente regiões mais conhecidas e talvez não sejam capazes de conservar uma parcela representativa da biodiversidade

regional a longo prazo. Atualmente, é necessário investir em estudos detalhados que sejam direcionados para a detecção de padrões e processos determinantes à dinâmica dos campos rupestres e suas linhagens.

O gênero *Minaria* foi detectado apenas após a utilização de dados moleculares em estudos filogenéticos e o reconhecimento deste clado revelou padrões morfológicos que até então vinham sendo negligenciados em favor da aplicação pragmática de caracteres florais na taxonomia das Asclepiadoideae neotropicais. O grupo foi delimitado com 19 espécies, facilmente reconhecidas pelo hábito subarborescente, com folhas e flores pequenas (Fig. 1). São arbustos eretos ou decumbentes, geralmente indumentados, com folhas cordadas a acerosas e frequentemente revolutas. A estabilidade morfológica dos caracteres vegetativos parece estar fortemente associada à sua distribuição restrita a ambientes abertos, salientando a conservação filogenética dessa linhagem aos campos rupestres. As flores são geralmente claras e a corola pode ir de urceolada a rotácea, indumentada de várias maneiras, principalmente em sua face adaxial. A corola pode ser dupla, simples ou estar ausente, e os frutos são folículos fusiformes (Fig. 2), alongados ou não no ápice, a depender da presença de coma nas sementes. Essa coma é uma característica comum em Asclepiadoideae, e sua ausência, aliada à redução do número de sementes por fruto (até duas vs. mais de seis sementes comosas), caracteriza um grupo de espécies de *Minaria* microendêmicas da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais.

Recentemente, análises mais abrangentes em Metastelmatinae contestaram o monofiletismo de *Minaria*. Duas espécies endêmicas do bloco Norte da Cadeia do Espinhaço, na Bahia, e até então incluídas em outros gêneros, emergiram em *Minaria*. No entanto, a falta de resolução e/ou baixo suporte para os nós basais de Metastelmatinae, associado a incongruências entre fontes de dados, estimularam o desenvolvimento de análises mais robustas para o grupo. No capítulo 1, nós delineamos um estudo filogenético para verificar a delimitação de *Minaria* e resolver suas relações internas. Foram utilizados dados moleculares, plastidiais e nucleares, bem como dados morfológicos. Todas as espécies do gênero foram incluídas e diversas análises foram conduzidas de modo a extrair o máximo de informação filogenética disponível.

O capítulo 2 mostra que a análise bayesiana é o método mais eficiente para a reconstrução de filogenias a partir de dados moleculares, recuperando mais clados supostamente corretos com confiança estatística. Os desempenhos dos principais métodos de inferência filogenética foram avaliados a partir da congruência entre resultados obtidos com diferentes fontes de dados (plastidiais e nucleares). Com base em uma quantidade

limitada de dados, a parcimônia apresentou menor resolução e mais incongruência entre as partições, sustentando resultados espúrios. A Máxima Verossimilhança apresentou resultados com propriedades híbridas, evidenciando mais clados que a Máxima Parcimônia, mas também incongruências, sustentando resultados espúrios. Ainda assim, as três análises apresentaram resultados semelhantes com base na matriz combinada dos dados moleculares, e a fusão de resultados obtidos independentemente por cada uma delas pode auxiliar a ampliar a resolução ou o suporte em alguns trechos da árvore. O capítulo recomenda que os estudos filogenéticos continuem adotando uma abordagem pluralista, especialmente quando lidarem com pouca informação filogenética e grupos com histórias complexas.

Os resultados filogenéticos (Capítulos 1 e 2) confirmaram a necessidade de se ampliar a circunscrição de *Minaria*, que passará a incluir 21 espécies, 75% delas endêmicas da Cadeia do Espinhaço. Com base nesses resultados, foram realizadas duas análises biogeográficas. Uma delas buscou avaliar a distribuição atual da diversidade filogenética de *Minaria* ao longo da Cadeia do Espinhaço (Capítulo 2); a outra buscou explorar a história da distribuição espacial e ecológica dessa linhagem (Capítulo 4).

A diversidade e o endemismo filogenéticos representam facetas ainda pouco exploradas da biodiversidade. Eles incluem medidas relativas do ponto de vista histórico e espacial que não podem ser extraídas simplesmente a partir do número de espécies ou de endemismos de uma região. Apesar de abordarem dois aspectos importantes para a conservação da biodiversidade, esses parâmetros ainda são raros para a grande maioria dos grupos. Isso porque essas análises exigem o conhecimento completo e detalhado sobre as relações filogenéticas no grupo e a distribuição geográfica de suas espécies. No Capítulo 1, foram detectadas quatro áreas com altos valores de endemismo filogenético na Cadeia do Espinhaço, com base nos comprimentos de ramos e na distribuição das espécies de *Minaria*: o Sul da Cadeia do Espinhaço, a Serra do Cipó, o Planalto de Diamantina e o sudoeste da Chapada Diamantina. Essas áreas abrigam a maior concentração de diversidade filogenética com distribuição restrita e por isso a conservação delas é essencial para a manutenção de uma ampla gama de processos evolutivos em *Minaria* e possivelmente de outras linhagens que compartilharam com ela uma história biogeográfica semelhante.

No capítulo 3, foi investigada a biogeografia histórica de *Minaria*. Mudanças cíclicas na órbita terrestre provocam mudanças climáticas na Terra há milhares de anos. No entanto, a influência desses ciclos parece ter se tornado mais marcante durante o

Quaternário. É inegável que essas oscilações são acompanhadas de mudanças ambientais, porém a extensão dessas mudanças e a influência delas em processos macroevolutivos são discutíveis. De qualquer maneira, a principal hipótese para se explicar o grande número de espécies e as altas taxas de endemismo na Cadeia do Espinhaço continuam sendo os ciclos sucessivos de expansão e contração dos campos rupestres motivados pelas oscilações climáticas durante o Pleistoceno. Neste contexto, a Cadeia do Espinhaço representa um refúgio para espécies campestres durante a expansão das florestas em períodos interglaciais. A análise espacial e ecológica apresentada focou o clado *Minaria*, buscando datar os principais eventos biogeográficos dessa linhagem e avaliar os fatores relacionados à origem e manutenção de seus endemismos. A acurácia das datações não é suficiente para que a influência dos ciclos pleistocênicos de 43 e 100 mil anos que predominaram durante o Quaternário possa ser testada com rigor. No entanto, os resultados sugerem um cenário para a história de *Minaria* diferente daquele que tem sido apresentado para a flora da Cadeia do Espinhaço.

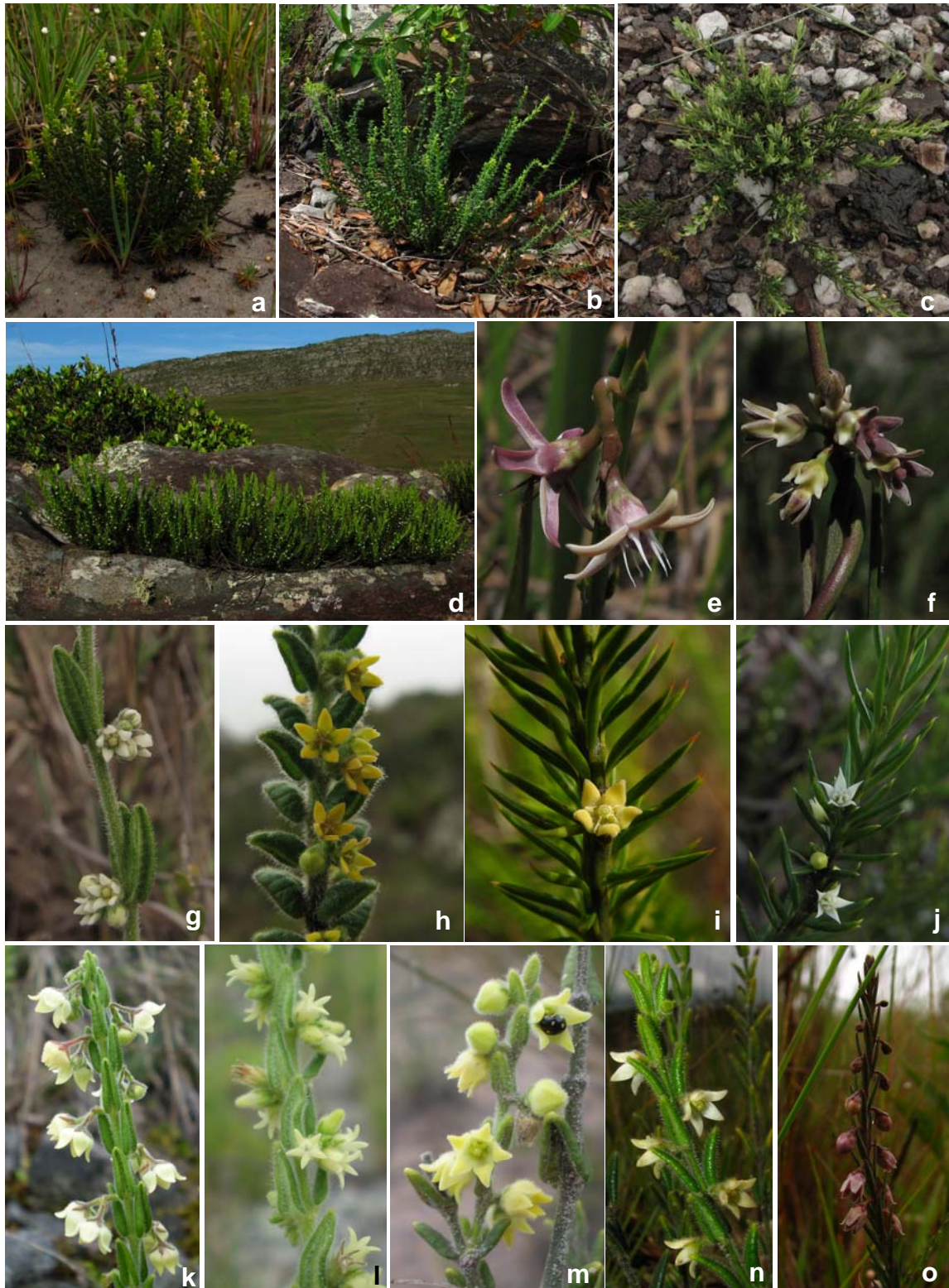
Durante o Plioceno, uma linhagem de Metastelmatinae se diferenciou na Cadeia do Espinhaço, dando origem a *Minaria*. Desde então, sua história tem sido regida por uma tendência contínua à retração geográfica, interrompida apenas por pulsos relativamente curtos de expansão. Durante este processo, a Terra continuava sob uma longa tendência à queda de temperatura e aumento da aridez. Este período marcou também a expansão das gramíneas com fotossíntese C<sub>4</sub> nas áreas mais quentes do globo e o estabelecimento do regime do fogo nos cerrados modernos. Juntos esses fatores ambientais podem ter limitado a distribuição de *Minaria*. A linhagem irradiou-se no Pleistoceno, como resultado dessas retrações. Populações isoladas geograficamente na Cadeia do Espinhaço (mas também fora dela), principalmente na região do Planalto de Diamantina, se diferenciaram e deram origem a linhagens com distribuições restritas. Duas delas, no entanto, se dispersaram recentemente para fora do Espinhaço e apresentam ampla distribuição atualmente.

O aumento da seca e da incidência do fogo, acentuados com a sazonalidade crescente na direção sul-norte da distribuição de *Minaria*, parecem atuar de maneira determinante na biogeografia do grupo. As áreas de altitude da Cadeia do Espinhaço apresentam menor sazonalidade, com estações secas mais brandas devido à umidade orográfica. Elas são mais frias, dominadas por afloramentos rochosos e por plantas com fotossíntese C<sub>3</sub>, o que dificulta o alastramento de queimadas. Dessa maneira, os campos rupestres da Cadeia do Espinhaço oferecem ambientes menos sujeitos a sazonalidade que caracteriza o Cerrado e a Caatinga no seu entorno. Eles oferecem abrigos contra a seca e o

fogo para linhagens que não estão adaptadas às condições instauradas com o estabelecimento dos cerrados nas áreas mais baixas.

No Capítulo 4, foram investigadas as características genéticas de três espécies de *Minaria* com origem e história de vida semelhantes, porém com extensões diferentes de distribuição. Os resultados mostraram que elas apresentam variabilidade genética similar, porém a estruturação interpopulacional delas é maior nas espécies de mais ampla distribuição geográfica. Esse padrão se adequa ao modelo biogeográfico proposto para *Minaria*. Neste corte, existem evidências de uma expansão rápida seguida de retração. Apesar de apresentarem distribuição atualmente distinta, as três espécies parecem ter surgido de populações confinadas ao Planalto de Diamantina e possuem praticamente a mesma idade. A semelhança em relação à diversidade genética parece refletir essa origem a partir de linhagens com extensões semelhantes de distribuição. A expansão deve ter ocorrido recentemente, acompanhada por fluxo gênico contínuo facilitado pela formação de corredores de distribuição, o que não permitiu o acúmulo significativo de variação genética em relação à população ancestral. Atualmente, as linhagens de distribuição mais ampla se encontram estruturadas, denotando uma diminuição ou mesmo interrupção do fluxo gênico entre elas e as populações do Espinhaço e de fora do Espinhaço, formando *pools* gênicos distintos. Essa divisão sugere que o isolamento da Cadeia do Espinhaço é o primeiro a se estabelecer tão logo as linhagens de *Minaria* comecem seu processo de retração geográfica.

Mudanças ambientais podem desencadear processos distintos conforme o grupo. Ainda assim, existem padrões biogeográficos que refletem a história de toda uma comunidade. Eles devem ser compartilhados por vários de seus elementos e por isso podem ser reconstruídos a partir do estudo biogeográfico de seus representantes. Esse trabalho procurou resgatar em *Minaria* informações que pudessem refletir parte da história dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, ajudando a elucidar processos envolvidos na origem e manutenção dos endemismos dessas serras. Apesar das incertezas inerentes a investigações desse tipo, o cenário construído para a dinâmica dos campos rupestres a partir desses dados empíricos transcende as conjecturas teóricas formuladas até aqui para explicar os padrões biogeográficos associados à biodiversidade dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. No entanto, sua pertinência deverá ser verificada com base no acúmulo de dados e novas informações e, principalmente, a partir de estudos similares em outros grupos.



**Figura 1.** Diversidade morfológica de *Minaria*. Hábito de *M. parva* (a), *M. decussata* (b), *M. diamantinensis* (c) e *M. magisteriana* (d). Flores e folhas de '*Barjonia*' *harleyi* (e) e '*Hemipogon harleyi*' (f), *M. lourteigiiae* (g), *M. decussata* (h), *M. hemipogonoides* (i), *M. magisteriana* (j), *M. campanuliflora* (k), *M. cordata* (l), *M. cordata* var. *virgata* (m), *M. abortiva* (n) e *M. polygaloides* (o). Fotos de A. Rapini e P. L. Ribeiro.



**Figura 2.** Diversidade morfológica dos frutos e sementes de *Minaria*: *M. refractifolia* (a), *M. parva* (b), *M. cordata* (c), *M. grazielae* (d) e *M. semirii* (e) *M. magisteriana* (f), *M. grazielae* (g), *M. ditassoides* (h, i). Fotos de A. Rapini e P. L. Ribeiro.

# **Capítulo 1**

**Filogenia e análise espacial da diversidade  
filogenética de *Minaria* (Apocynaceae): acessando  
áreas prioritárias para conservação na Cadeia do  
Espinhaço, Brasil**



## **Filogenia e análise espacial da diversidade filogenética de *Minaria* (Apocynaceae): acessando áreas prioritárias para conservação na Cadeia do Espinhaço, Brasil**

**Resumo** A detecção de áreas que abriguem grande parte da diversidade evolutiva retida nas linhagens geograficamente isoladas tem se tornado cada vez mais relevante para a conservação da biodiversidade. Entretanto, a distribuição da diversidade filogenética ainda é desconhecida para a maioria dos grupos, o que restringe sua utilização como critério-chave na seleção de áreas prioritárias para a conservação. Para este propósito é importante se obter uma hipótese filogenética que inclua toda a diversidade conhecida de uma linhagem. Dificuldades de amostragem muitas vezes impedem a reconstrução adequada da filogenia, sendo necessário unir evidências que ajudem a revelar a história do grupo. Nós inferimos a filogenia de *Minaria*, cuja diversidade é centrada na Cadeia do Espinhaço, leste do Brasil, para avaliar a distribuição da diversidade e dos endemismos filogenéticos e identificar as áreas desta Cadeia que abrigam a maior concentração de diversidade evolutiva exclusiva. Foram detectadas quatro áreas de alta diversidade e endemismo filogenético: Rio de Contas, na Bahia; Planalto de Diamantina, Serra do Cipó e Sul da Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais. Dentre estas, o Planalto de Diamantina e a Serra do Cipó são as regiões mais relevantes abrigando 10 espécies exclusivas e algumas delas encontram-se desprotegidas e vulneráveis à perturbações antrópicas. Existe um alto grau de ameaça de extinção de *M. monocoronata*, única espécie endêmica do sul da Cadeia do Espinhaço, descendente de uma linhagem endêmica e de distribuição restrita, encontrada exclusivamente em cangas, um dos ambientes mais ameaçados desta cadeia de montanhas.

**Palavras-chave:** Asclepiadoideae; conservação de linhagens; endemismo filogenético; variação molecular, unidades de conservação

\* Manuscrito formatado para submissão à revista Taxon.

## INTRODUÇÃO

O reconhecimento de espécies ou grupos de espécies proximamente relacionadas que representem linhagens filogeneticamente isoladas e a detecção de áreas que abriguem uma proporção significativa da diversidade evolutiva retida nessas linhagens tem se tornado cada vez mais relevantes para a conservação da biodiversidade (Vane-Wright & al., 1991; Williams & al., 1991; Faith, 1992, 2008; O'Brien, 1994; Mooers & al., 2005; Cadotte & Davies, 2010). Nesse sentido, o número de espécies não é o único, nem necessariamente o melhor critério para a indicação de áreas prioritárias. Muitas vezes, é preferível selecionar áreas menos ricas, porém com um maior número de espécies endêmicas. Ainda assim, nem todas as espécies endêmicas são igualmente relevantes; a representatividade filogenética (eventualmente refletida na distinção taxonômica) dessas espécies é um fator extremamente importante e que também deve ser considerado. A extinção de uma espécie ou de um grupo de espécies proximamente relacionadas representa o fim daquela linhagem e essa perda será tanto maior quanto mais antiga (isolada filogeneticamente) ela for. Ao considerar relações de parentesco, portanto, a diversidade filogenética oferece um componente de biodiversidade intrínseco, acumulado durante a história evolutiva da linhagem.

A diversidade filogenética pode ser estimada com base na quantidade de nós (e.g., McGoogan & al., 2007) ou no comprimento de ramos (e.g., Rosauer & al., 2009), eventualmente corrigidos de modo a representar a idade das linhagens (e.g., Sechrest & al., 2002; Forest & al., 2007). Apesar de sua relevância, a distribuição da diversidade filogenética ainda encontra-se obscura para a maioria dos grupos e por isso continua pouco utilizada como critério-chave na seleção de áreas prioritárias para a conservação. São raros os estudos filogenéticos que incluem toda a diversidade conhecida de uma linhagem e poucos são capazes de propor hipóteses filogenéticas realistas, resolvidas para todas as espécies analisadas. Estudos filogenéticos abrangentes e precisos esbarram em dificuldades que nem sempre podem ser solucionadas a contento. Espécies raras, especialmente importantes neste contexto, podem não ser encontradas no campo e podem estar representadas apenas por materiais antigos nos herbários, impossibilitando a extração de DNA de qualidade e até mesmo o exame detalhado de suas características morfológicas. Além disso, a variação molecular e morfológica obtida no grupo pode não ser suficiente

para que as relações sejam completamente resolvidas e sustentadas, e fontes de dados diferentes nem sempre convergem para uma mesma resposta (veja Capítulo 2).

No Brasil, a Cadeia do Espinhaço é uma região montanhosa nos estados de Minas Gerais e Bahia, ampla e historicamente conhecida pelas altas taxas de espécies vegetais exclusivas, grande parte delas com distribuição bastante restrita, e que por isso encontram-se vulneráveis (Rapini & al., 2008). A Cadeia está situada na divisa dos biomas da Mata Atlântica (a sudeste), Cerrado (a sudoeste) e Caatinga (ao norte), ocupando uma área de aproximadamente 120.000 km<sup>2</sup>, orientada por cerca de 1.000 km na direção Norte-Sul. Sua flora abriga cerca de 4.000 espécies (Giulietti & al., 1997), o que corresponde a aproximadamente 10% das espécies de plantas do Brasil (40.982 espécies, incluindo fungos; Forzza & al., 2010); ainda assim, esse número parece subestimado (Rapini & al., 2008). Em média, 30% das espécies de angiospermas do Espinhaço são endêmicas (Giulietti & al., 1987), mas essa concentração é bem maior para alguns grupos, como Eriocaulaceae (85%; Costa & al., 2008), por exemplo.

A flora da Cadeia do Espinhaço vem sendo estudada desde que os primeiros naturalistas visitaram o Brasil, porém alguns grupos vêm recebendo atenção mais intensa nos últimos anos, dentre eles as Asclepiadoideae (Apocynaceae; Rapini & al., 2001, 2002; Rapini, 2010). Das cerca de 3.000 espécies da subfamília, 392 ocorrem no Brasil (Rapini & al., 2010a) e 133 estão representadas na Cadeia do Espinhaço, sendo 30% delas exclusivas (Rapini, 2010). A importância dessa região para a diversidade do grupo é evidente, afinal um terço das espécies brasileiras de Asclepiadoideae ocorrem ali e 10% delas são endêmicas. Esses endemismos estão associados principalmente aos campos rupestres, vegetação aberta, sob solos quartzíticos, marcada por afloramentos rochosos e que começa a despontar principalmente a partir de 900 m s.n.m.

Recentemente, 2.291 espécies raras (definidas como restritas a 10.000 km<sup>2</sup>) foram utilizadas para indicar áreas chaves de biodiversidade no Brasil (Giulietti & al., 2009). Nesse levantamento, os estados de Minas Gerais e Bahia se destacaram como os mais ricos em espécies raras, principalmente devido à flora da Cadeia do Espinhaço (Rapini & al., 2009). Ali, os endemismos estão concentrados predominantemente nas regiões da Serra do Cipó e do Planalto de Diamantina, em Minas Gerais (e.g., Echternach & al., 2011); mas a Chapada Diamantina, na Bahia, também se destaca como um importante centro de

endemismos (Conceição & al., 2005). A grande quantidade de endemismos e o conhecimento desigual da diversidade florística ao longo da Cadeia do Espinhaço, no entanto, fazem com que cada região ao longo de sua extensão seja única e potencialmente importante para conservação. Dessa maneira, o mais prudente seria a conservação integral de toda a Cadeia (Rapini & al., 2002; Conceição & al., 2005), pelo menos até que o acúmulo de estudos filogenéticos e ecológicos possibilite uma melhor compreensão acerca dos processos históricos e das interações biológicas responsáveis pela origem e manutenção de sua biodiversidade (Rapini & al., 2008).

A detecção de áreas ricas em endemismos é um passo importante para a conservação da biodiversidade. No entanto, o acesso no nível de espécie não é eficaz em termos de diversidade filogenética. As áreas que armazenam a maior quantidade de herança evolutiva são aquelas com valores mais altos de endemismo filogenético (*sensu* Rosauer & al., 2009), e o reconhecimento dessas áreas depende tanto de dados acurados sobre a distribuição das espécies, como de uma boa hipótese filogenética (Faith, 2008). Até onde sabemos, não há ainda nenhum estudo delineado para se avaliar a distribuição da diversidade filogenética ao longo da Cadeia do Espinhaço. Sendo assim, nosso objetivo é fazer uma primeira avaliação sobre a distribuição de endemismos filogenéticos na região utilizando *Minaria* (Apocynaceae), gênero bem diversificado ao longo da Cadeia e com várias espécies microendêmicas. A delimitação de *Minaria* foi reavaliada e suas relações internas definidas a partir de análises filogenéticas baseadas em dados moleculares e morfológicos. A partir da árvore filogenética de *Minaria* foram identificadas, então, as regiões do Espinhaço que abrigam a maior concentração de diversidade evolutiva exclusiva.

**Sistemática de *Minaria* T.U.P. Konno & Rapini.** *Minaria* foi originalmente estabelecido com 19 espécies (Konno & al., 2006), tendo sido evidenciado somente a partir de estudos filogenéticos com dados moleculares (Rapini & al., 2003, 2006; Liede-Schumann & al., 2005). O clado é bem sustentado, porém várias de suas espécies não haviam sido amostradas nas primeiras análises moleculares. É caracterizado pelo hábito subarborescente, com folhas diminutas e ampla variação floral, apresentando corola urceolada a rotácea, corona dupla, simples ou ausente, e frutos alongados no ápice ou não, dependendo da presença de coma nas sementes. Pertence à subtribo Metastelmatinae (Asclepiadeae) e possui centro de diversidade primário na Cadeia do Espinhaço de Minas

Gerais (Konno & al., 2006). A maioria de suas espécies possui distribuição restrita e dez delas são microendêmicas (Rapini & al. 2009).

Estima-se que Metastelmatinae tenha surgido nos cerrados, durante o Mioceno Tardio (há cerca de 7 Milhões de anos), e se diversificado a partir de 4 Ma, no Plioceno. *Minaria* divergiu neste período (ca. 4 Ma), porém se irradiou apenas no Pleistoceno (1,8 Ma) (Capítulo 3). A diversificação relativamente rápida e recente em Metastelmatinae parece ter gerado uma assincronia entre os padrões morfológicos utilizados na taxonomia do grupo e as relações filogenéticas detectadas em estudos moleculares. A presença recorrente de polimorfismos em cópias de marcadores nucleares (Rapini & al., 2006) e o grande número de homoplasias morfológicas em Metastelmatinae têm dificultado reconstruções filogenéticas confiáveis no grupo e a delimitação precisa de seus gêneros. Ainda assim, o aumento da amostragem em Metastelmatinae, permitiu identificar mais duas espécies, dessa vez microendêmicas da porção do Espinhaço na Bahia (*'Barjonia' harleyi* e *'Hemipogon' harleyi*) proximamente relacionadas a *Minaria*; a posição de *M. polygaloides*, por outro lado, não pode ser confirmada (Silva, 2009; Silva & al., em revisão).

Análises moleculares e morfológicas mais aprofundadas enfocando as relações filogenéticas em Metastelmatinae ainda são necessárias para que se possa determinar a circunscrição de *Minaria* e suas relações internas. Isso possibilitará uma melhor compreensão da evolução morfológica no grupo e da representatividade filogenética dessa linhagem ao longo da Cadeia do Espinhaço. Inicialmente, foi realizada uma bateria de testes em busca de marcadores filogenéticos e com base nos marcadores selecionados, foram feitas várias análises com diferentes partições e métodos a fim de recuperar o máximo do sinal filogenético disponível na amostragem e construir uma árvore resolvida com todas as espécies de *Minaria*. Essa árvore foi então combinada com a distribuição das espécies de modo a localizar regiões com maior representatividade evolutiva, segundo o endemismo filogenético, medido com base no comprimento dos ramos e pesagem relativa de sua restrição espacial (Rosauer & al., 2009).

**Busca de marcadores filogenéticos para *Minaria*.** O sucesso de uma análise filogenética começa pela seleção de marcadores com variação adequada para o nível em que se está trabalhando. Avaliações preliminares em busca de regiões moleculares são geralmente realizadas, mas raramente apresentadas nos artigos. O resultado desses

experimentos, no entanto, pode ser útil para outros grupos, especialmente em Apocynaceae, e serão apresentados com mais detalhes aqui.

Atualmente, existe uma grande quantidade de regiões do genoma de plantas com taxas de substituição relativamente altas, e que portanto, são especialmente promissoras para se inferir relacionamentos entre espécies proximamente relacionadas (Small & al., 1998; Crawford & Mort, 2004; Mort & Crawford, 2004; Shaw & al., 2005, 2007; Whithall & al., 2006; Li & al., 2008; Levin & al., 2009). No entanto, muitos desses marcadores moleculares ainda não foram devidamente explorados e a real utilidade deles é desconhecida para a maioria dos grupos.

No genoma plastidial, regiões não codificantes são geralmente as mais úteis para inferências filogenéticas de espécies proximamente relacionadas, pois possuem menor conteúdo funcional em relação às regiões codificantes (Gielly & Taberlet, 1994; Shaw & al., 2005) e, sob menor restrição seletiva, costumam acumular variações mais rapidamente. Os marcadores plastidiais mais utilizados são *rps16*, *rpl16*, *trnK-matK-trnK* e *trnT-trnL-trnF* (Shaw & al., 2005), porém eles geralmente apresentam pouca resolução em clados mais derivados, sobretudo em Asclepiadoideae (Liede & Tauber, 2000; Meve & Liede, 2001; Rapini & al., 2003, 2006; Liede-Schumann & al., 2005; Thiv & Meve, 2007; Krings & al., 2008).

A popularização de marcadores plastidiais mais variáveis como *psbA* (Sang & al., 1997) e *trnS-G* (Hamilton, 1999) veio com a publicação de Shaw & al. (2005), que descreveram 21 regiões potencialmente úteis para inferências filogenéticas. Posteriormente, Shaw & al. (2007) reavaliaram esses marcadores e descreveram mais 13, totalizando 34 regiões com diferentes níveis de variação. Regiões plastidiais também têm sido utilizadas como código-de-barras de DNA (Chase & al., 2007). São sequências geralmente curtas, com *primers* universais e variação suficiente para distinguir espécies cogenéricas (Robba & al., 2006; Scheffer & al., 2006) e que podem se mostrar úteis na detecção de relações filogenéticas de grupos recentes. Até aqui, no entanto, a maioria desses marcadores plastidiais não havia sido testada em grupos neotropicais de Asclepiadoideae.

Dentre os marcadores nucleares, os mais utilizados para reconstrução filogenética são os espaçadores internos transcritos (ITS) da região gênica ribossomal. Isso porque eles apresentam *primers* universais, altas taxas de mutação e um grande número de cópias no

genoma, características que facilitam enormemente sua amplificação até mesmo a partir de material herborizado (Álvarez & Wendel, 2003; Mort & Crawford, 2004; Mort & al., 2007; Calonje & al., 2009). Em contrapartida, as diversas cópias de ITS podem não estar homogeneizadas por evolução em concerto, apresentando informações diferentes em um mesmo indivíduo (Álvarez & Wendel, 2003; Bailey & al., 2003). Ainda assim, este marcador poderá ser utilizado para reconstruções filogenéticas, caso suas cópias coalesçam dentro das espécies (e.g., Wanntorp & al., 2006).

Os íntrons nucleares têm fornecido boa resolução filogenética para alguns grupos (Mason-Gamer & al., 1998; Oh & Potter, 2005), semelhante àquela de marcadores plastidiais e de ITS, e também são abundantes no genoma (Whitall & al., 2006). Todavia, a dificuldade de se isolar cópias ortólogas faz com que esses marcadores ainda sejam pouco explorados em estudos filogenéticos (Doyle & al., 2003; Mort & Crawford, 2004; Whitall & al., 2006; Calonje & al., 2009). Regiões com uma única ou poucas cópias, como LEAFY, GBSSI, ADH, PEPC, NCPGS e Pistilata, também podem ser úteis para reconstruções filogenéticas de grupos recentes (Mason-Gamer & al., 1998; Li & al., 2008), porém exigem DNA de boa qualidade, geralmente obtido a partir de amostras recentes (Krings & al., 2008). Finalmente, os genes COS (Conserved Ortholog Set), únicos ou com poucas cópias, permanecem relativamente conservados em diversas linhagens de dicotiledôneas (Li & al., 2008), mas ainda não foram devidamente investigados (Wu & al., 2006; Li & al., 2008) e poderão despontar como ferramentas promissoras para sistemática filogenética (Levin & al., 2009).

O genoma mitocondrial é estruturalmente dinâmico na evolução das plantas, principalmente pela transferência de genes para o núcleo e incorporação de DNA nuclear e plastidial. No entanto, suas sequências possuem taxas de evolução baixa (Wolfé & al., 1987; Freeland, 2005), sendo informativas para o estabelecimento de relações antigas (Knoop, 2004), mas não para espécies proximamente relacionadas, no nível de gênero, por exemplo.

Os caracteres morfológicos já vinham perdendo espaço nas análises filogenéticas nas últimas décadas (Donoghue, 1994) e, atualmente, os dados moleculares são os mais utilizados em reconstruções filogenéticas (Scotland & al., 2003), cabendo à morfologia sobretudo o papel de diagnosticar grupos convenientes para a classificação. Todavia, dados

morfológicos, sobretudo quando examinados com o devido rigor, podem adicionar caracteres relevantes para a sustentação de alguns clados e posicionar filogeneticamente grupos que não contam com sequências de DNA disponíveis, como fósseis e espécies raras, permitindo análises mais abrangentes (Wiens, 2004).

Tendo em vista que árvores de genes não necessariamente representam árvores de espécies, dada a possibilidade de fixações estocásticas de alelos polimórficos em diferentes linhagens (Maddison, 1997; Li & al., 2008; Levin & al., 2009), especialmente em linhagens recentes e que se diversificaram rapidamente (Whittall & al., 2006), o ideal é que mais de um marcador seja utilizado em reconstruções filogenéticas. Regiões diferentes podem apresentar topologias incongruentes (Knowles, 2009), seja por razões analíticas ou biológicas (Rokas & al., 2003, van der Niet & Linder, 2008). Dentre os fatores analíticos mais frequentes estão insuficiência amostral, critério inadequado de optimalidade promovendo atração de ramos longos (Felsenstein, 1978; Gatesy & al., 2007; Drábková & Vlček, 2010) e modelos de substituição de nucleotídeos incorretos (Maddison, 1997; Rokas & al., 2003). Dentre os processos biológicos que podem gerar esse tipo de conflito estão a paralogia (Bailey & al., 2003; Álvarez & Wendel, 2003), reticulação (Bell & Hyvöner, 2010) provocada por hibridação (van der Niet & Linder, 2008; Willyard & al., 2009) ou transferência horizontal de genes, e a fixação incompleta de alelos dentre as linhagens (*incomplete lineage-sorting*) (Maddison, 1997; Pelsner & al., 2010).

## MATERIAL E MÉTODOS

***Extração do DNA total, amplificação e sequenciamento dos marcadores moleculares.*** O DNA de cada amostra foi extraído de folhas desidratadas conforme protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987), que utiliza tampão CTAB 2% (brometo de cetilmetil amônio) e purificação com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), adaptado para microtubos. O DNA genômico total foi usado para amplificação através da PCR. A amplificação dos fragmentos foi testada com diversos protocolos, mas principalmente com aqueles propostos originalmente pelos autores dos *primers*. Os protocolos que apresentaram sucesso com a maioria dos *primers* foram 1 µL de DNA genômico, 1× tampão, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,2 mM de *primer*, 10 ng BSA, *Taq* DNA polimerase (Phonetrutria) – 1,25 unidades para fragmentos plastidiais e 0,75 para os nucleares – complementando a



solução com água ultrapura até 25µL; para amplificação das regiões ITS e ETS, 1,0 M betaína e 2% DMSO foram adicionados à reação. Para a maioria das espécies, a amplificação das regiões Agt1 (nuclear COS) e *rpL32-trnL* exigiu o uso do mix TopTaq (Quiagen).

Os produtos da PCR foram purificados em reação enzimática EXO-SAP (Amersham Biosciences) ou com PEG (Polietileno glicol) e sequenciados diretamente usando os mesmos *primers* da PCR. O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático (ABI 3130XL Genetic Analyzer) usando DyeEnamic ET® Dye Terminator Kit (Amersham-Biosciences) ABI. As sequências foram editadas no Pacote Staden (Staden & al., 2003) e alinhadas no BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), sendo posteriormente depositadas no GenBank.

Para os dados nucleares, foram clonados os produtos da PCR de alguns espécimes que apresentaram polimorfismo aparente no eletroferograma como *M. graziellae*, *M. hemipogonoides*, *M. polygaloides*, *M. semirii* e *Blepharodon pictum*. A clonagem foi realizada com o kit pGEM® -T, obedecendo as especificações do fabricante (Promega). Pelo menos cinco clones de cada espécie foram amplificados diretamente da placa, utilizando os mesmos *primers*. Foi utilizada apenas uma sequência por espécie, pois as sequências produzidas pela clonagem formaram clados bem sustentados (dados não mostrados), indicando que elas coalescem ainda em suas respectivas espécies. As regiões ETS e ITS são adjacentes e suas topologias foram congruentes. Como o ETS não apresentou eletroferogramas com evidências de polimorfismos, não houve necessidade de cloná-lo.

**Seleção de marcadores moleculares.** Foram triadas na literatura regiões do genoma de plantas com taxas de substituição supostamente altas o suficiente para se inferir filogenias no nível de espécies (Tabela 1). Em média, cinco espécies de *Minaria* foram sequenciadas para cada região testada, geralmente duas espécies afins e três mais distintas. O mínimo de espécies utilizadas para esse teste foi três, suficiente para se estimar a quantidade de informação de um marcador em investigações filogenéticas (Shaw & al., 2005). Espécies adicionais foram eventualmente incluídas, quando necessário, para se inferir o padrão de alguns marcadores.

Sempre que o número de táxons permitiu, as regiões foram comparadas quanto ao número de caracteres variáveis (i.e., Potential Informative Characters; PIC), percentual de variabilidade e número de caracteres Informativos para a Parcimônia (IP) (Mort & al., 2007; Shaw & al., 2007). O valor de PIC reúne a informação do número de inserções/deleções (indels; I), de substituições nucleotídicas (S) e de inversões (Iv) ( $PIC = I + S + Iv$ ). Os valores de PIC são geralmente considerados na escolha de regiões para análises filogenéticas, mesmo quando poucos táxons são comparados, enquanto a avaliação por IP exige a comparação de pelo menos quatro táxons. O percentual de variabilidade, ou proporção de eventos mutacionais de cada região, foi calculado usando a fórmula  $(PIC/L) \times 100$  (O'Donnell, 1992; Gielly & Taberlet, 1994, modificada por Shaw & al., 2007), onde L = comprimento das sequências alinhadas. O IP foi calculado no programa PAUP (Swofford, 2000), que desconsidera a informação dos indels.

Nas análises filogenéticas, foram utilizados os marcadores mais variáveis e mais informativos para parcimônia (Tabela 2). Eles foram analisados individualmente e em conjunto, formando partições representando os genomas plastidial e nuclear (para os vouchers dos materiais utilizados nos sequenciamentos e autoria das espécies veja o Anexo 1). Porções das matrizes que apresentaram alinhamento dúbio foram excluídas das análises.

Tabela 1. Regiões do genoma plastidial e nuclear testadas com espécies de *Minaria*, referência original e *primers*.

Genoma	Região	Referência	Sequência dos Primers
<b>Plastidial</b>	<i>psbA-trnH</i>	Hamilton, 1999; Shaw & al., 2005	<b>psbA</b> GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C <b>trnH</b> CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAA TC
	<i>rpoB-trnC</i>	Shaw & al., 2005	<b>rpoB</b> CKA CAA AAY CCY TCR AAT TG <b>trnC</b> CAC CCR GAT TYG AAC TGG GG
	<i>trnD-T</i>	Demessure & al., 1995; Shaw & al. 2005	<b>trnD</b> ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC <b>trnT</b> CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG
	<i>atpF-H</i>	Barcode Kew	<b>atpF</b> ACT CGC ACA CAC TCC CTT TCC <b>atpH</b> GCT TTT ATG GAA GCT TTA ACA AT
	<i>psbK-I</i>	Barcode Kew	<b>psbK</b> AGA GTT TGA GAG TAA GCA T <b>psbI</b> TTA GCC TTT GTT TGG CAA G
	<i>rps16</i>	Oxelman & al., 1997; Shaw & al., 2005	<b>1F</b> GTG GTA GAA AGC AAC GTG CGA CTT <b>2R</b> TCG GGA TCG AAC ATC AAT TGC AAC
	<i>trnL-F</i>	Taberlet & al., 1991; Shaw & al., 2005	<b>C</b> AGA AAT CGG TAG ACG CTA CG <b>F</b> ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG
	<i>trnS-G</i>	Shaw & al., 2005	<b>trnS</b> GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC <b>trnG</b> GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C
	<i>trnQ-rps16</i>	Shaw & al., 2007	<b>trnQ</b> GCG TGG CCA AGY GGT AAG GC <b>rpS16x1</b> GTT GCT TTY TAC CAC ATC GTT T
	<i>rps16-trnK</i>	Shaw & al., 2007	<b>rpS16x2F2</b> AAA GTG GGT TTT TAT GAT CC <b>trnKx1</b> TTA AAA GCC GAG TAC TCT ACC
	<i>rpl32-trnL</i>	Shaw & al., 2007	<b>trnL</b> CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT <b>rpL32-F</b> CAG TTC CAA AA A AAC GTA CTT C
	<i>trnV-ndhC</i>	Shaw & al., 2007	<b>trnV</b> GTC TAC GGT TCG ART CCG TA <b>ndhC</b> TAT TAT TAG AAA TGY CCA RAA AAT ATC ATA TTC
	<i>ndhF-rpl32</i>	Shaw & al., 2007	<b>ndhF</b> GAA AGG TAT KAT CCA YGM ATA TT <b>rpL32-R</b> CCA ATA TCC CTT YTT TTT CCA A
	<i>psbD-trnT</i>	Shaw & al., 2007	<b>psbD</b> CTC CGT ARC CAG TCA TCC ATA <b>trnT</b> CCC TTT TAA CTC AGT GGT AG
	<i>psbJ-petA</i>	Shaw & al., 2007	<b>psbJ</b> ATA GGT ACT GTA RCY GGT ATT <b>petA</b> AAC ART TYG ARA AGG TTC AAT T
	<i>atpI-atpH</i>	Shaw & al., 2007	<b>atpI</b> TAT TTA CAA GYG GTA TTC AAG CT <b>atpH</b> CCA AYC CAG CAG CAA TAA C
<b>Nuclear</b>	ITS	White & al., 1990; Sun & al., 1994	<b>17SE</b> ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG <b>26SE</b> TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC
	ETS	Beardsley & Olmstead, 2002; Baldwin & Markos, 1998	<b>ETS_B</b> ATA GAG CGC GTG AGT GGT G <b>18S-IGS</b> GAG ACA AGC ATA TGA CTA CTG GCA GGA TCA ACC AG
	GBSSI2-8	Peralta & Spooner, 2001; Levin & Miller, 2005	<b>622B</b> CAC TGC TAT AAA CGT GGG GTT GA <b>CRmod</b> GGC ATA GTA TGG GCT CAC AGT AA
	GBSSI8-12	Winkwork & Donoghue, 2004	<b>wax81F</b> CAA TCT ACC TGA TCA ATA TAA G <b>wax 121R</b> ACA ATA GGC ACC TGT TCC A <b>wax 82F</b> CAA TCT CCC TGA CGA GTT A <b>wax 122R</b> TAA GCA TTG AAC TGA AAG CAA
	agt1	Li & al., 2008	<b>Agt1F</b> GAT TTC CGH ATG GAT GAN TGG GG <b>Agt1R</b> CCA YTC CTC CTT CTG HGT GCA GTT
	at103	Li & al., 2008	<b>At103F</b> CTT CAA GCC MAA GTT CAT CTT CTA <b>At103R</b> TTG GCA ATC ATT GAG GTA CAT NGT MAC ATA
	eif3E	Li & al., 2008	<b>Eif3EF</b> TTT GAA TGT GGC AAC TAY TCT RGT GCT GC <b>Eif3ER</b> ACC TCT TCA CAC TCY YTC ATC TT
	aroB	Li & al., 2008	<b>aroBF</b> GCATTC TAC CAA RCW CAR TGT GT <b>aroBR</b> GCT TTG TTT TCA CAT GAW CKC TTD ATA GCA
	sqD	Li & al., 2008	<b>sqDF</b> CTT GGG ACS ATG GGT GAR TAT GG <b>sqDR</b> CCW ACA GCA GCY TGM ACA CAG AAC C

**Dados Morfológicos.** A matriz morfológica conta com 34 caracteres, vegetativos e florais, que se mostraram informativos para a parcimônia (Anexos 2 e 3).

**Amostragem.** Cada partição dos dados moleculares foi analisada de maneira individual e combinada. Foram criadas quatro matrizes combinadas: uma incluindo apenas o conjunto de dados plastidiais (plastidial) e outra apenas o conjunto de dados nucleares (nuclear), uma combinando dados plastidiais e nucleares (combinada molecular), e outra com dados moleculares e morfológicos (evidência total).

O grupo interno nas análises moleculares foi composto por 18 espécies de *Minaria*, incluindo '*Barjonia*' *harleyi* e '*Hemipogon*' *harleyi*, sendo *M. cordata* representada por três populações de modo a amostrar com mais abrangência parte de sua variabilidade morfológica. Três das 21 espécies de *Minaria* (*M. monocoronata*, *M. inconspicua* e *M. bifurcata*) não puderam ser sequenciadas e foram incluídas apenas na análise morfológica e na evidência total. Representantes dos gêneros *Barjonia* Decne., *Blepharodon* Decne., *Ditassa* R.Br., *Nephradenia* Decne., *Hemipogon* Decne. e *Petalostelma* E.Fourn., todos pertencentes à Metastelmatinae foram incluídos como grupo interno, totalizando 41 espécies. *Blepharodon ampliflorum*, representante que teria divergido a partir da raiz de Metastelmatinae (Liede-Schumann & al., 2005; Rapini & al., 2006), foi utilizado como grupo externo na polarização das árvores combinadas plastidiais, nucleares e molecular combinada.

**Análises filogenéticas.** A análise de máxima parcimônia (MP) foi realizada no PAUP v. 4.0b10a (Swofford, 2000), a partir de busca heurística, utilizando o algoritmo TBR, com 1.000 replicações iniciadas com adição aleatória de táxons, retendo até 20 árvores por replicação. As árvores salvas foram, então, submetidas a uma nova busca com o limite de árvores fixado em 20.000. Os caracteres receberam pesos iguais e seus estados foram considerados não ordenados. O consenso estrito destas árvores foi calculado no PAUP. A sustentação dos clados foi avaliada através de *bootstrap* também no PAUP, com busca heurística a partir de 1.000 pseudo-replicações, com adição simples de terminais, TBR como algoritmo de reamostragem e limite de 15 árvores por pseudo-replicação.

A análise de máxima verossimilhança (MV) foi realizada no programa RAxML (Stamatakis 2006), implementado no Portal CIPRES v. 2.0 (Miller & al., 2010). O modelo GTR + CAT foi aplicado na análise de *bootstrap*, que utilizou 1.000 replicações e

algoritmo de *bootstrap* rápido (Stamatakis & al., 2008). Para a busca da árvore mais verossímil, foi utilizado o modelo GAMMA +P -Invar. O consenso de maioria das replicações para obter os valores de *bootstrap* foi gerado no PAUP.

Para a análise de Inferência Bayesiana (IB), foram estimados os modelos evolutivos mais adequados para cada partição utilizando o MrModeltest (Nylander, 2008). A análise foi conduzida no programa MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003), com 5 milhões de gerações, salvando uma árvore a cada 1.000 gerações, em duas corridas simultâneas, com quatro cadeias cada, três quentes e uma fria. Foram eliminadas as árvores anteriores à estabilização (*burn-in*) e o consenso de maioria das árvores restantes nas duas corridas foi calculado com auxílio do PAUP, de modo que a Probabilidade Posterior de cada clado foi indicada pela frequência dele no conjunto de árvores.

As árvores foram visualizadas e editadas no programa FigTree v. 1.2.2 (Rambaut, 2009). A evolução dos caracteres morfológicos de Metastelmatinae foi examinada no programa Mesquite (Madisson & Maddison, 2007) utilizando o critério de máxima parcimônia segundo a otimização ACCTRAN, a partir de 2.000 árvores obtidas na IB (as 1.000 últimas árvores de cada corrida) da análise de evidência total (plastídio + nuclear + morfológico). Neste caso, a frequência das otimizações para cada nó foi sumarizada de modo a refletir a incerteza filogenética dos respectivos estados de caracteres.

***Congruência entre dados e árvores.*** Foram realizados testes ILD (*Incongruence Length Difference*) (Farris & al. 1994), implementado como teste de Homogeneidade de Partição (HOMPART) no PAUP, para verificar a congruência entre as matrizes individuais de cada genoma e entre as matrizes combinadas de sequências plastidiais e nucleares. O teste foi conduzido a partir de 500 replicações, com adição randômica de 1 árvore por passo. Para reduzir a chance de falsos positivos (Hipp & al. 2004), apenas valores de  $P < 0,01$  foram considerados evidência significativa de incongruência entre os dados (Cunningham, 1997). Os filogramas obtidos a partir das análises de IB, MV e MP foram examinados visualmente e espécies com ramos desproporcionalmente longos foram excluídas da análise a fim de avaliar sua influência na topologia geral.

O grau de significância das diferenças entre as árvores geradas pelos três métodos (MP, MV e IB) foi avaliado segundo o teste de Shimodaira & Hasegawa (1999).

Finalmente, os conflitos topológicos foram examinados visualmente com auxílio de redes de partição (*split networks*), a partir das árvores de consenso de maioria da IB e do consenso estrito da MP, produzidas tanto com base nas matrizes individuais de cada região independente do genoma, quanto com base nas matrizes moleculares combinadas, refletindo as incongruências entre dados plastidiais e nucleares. Para isso, foi utilizado o método supernetwork com filtro no programa SplitsTree v. 4.11.3 (Huson & Bryant, 2006).

**Análise espacial da diversidade filogenética.** A distribuição geográfica das espécies de *Minaria* foi obtida a partir de 762 espécimes, depositados nos principais herbários brasileiros, europeus e norte-americanos, e também com base em trabalhos de campo. Foram considerados apenas materiais com localização acurada, priorizando aqueles com informações completas sobre a localidade ou com coordenadas do sistema de posicionamento global (GPS). As coordenadas foram confirmadas e/ou obtidas no programa Google Earth (© 2010 Google).

A árvore obtida na análise de IB com base na evidência total para todas as espécies de *Minaria* e a matriz de distribuição geográfica foram utilizadas para calcular os índices de diversidade filogenética (Faith, 1992) e endemismo filogenético (Rosauer & al., 2009) no programa Biodiverse v. 0.15 (Laffan & al., 2010). Foram utilizadas células de 0,05° para ilustrar a distribuição, com duas células de vizinhança para os cálculos de diversidade (Laffan & Crisp, 2003). Foram calculados, também, os índices de riqueza total e riqueza de endemismos com mesma vizinhança, utilizando o mesmo programa.

## RESULTADOS

**Marcadores moleculares.** Dos 16 marcadores plastidiais testados, 87% tiveram sucesso na amplificação e 68% no sequenciamento (Tabela 2). As regiões *trnV-ndhC* e *ndhF-rpl32* não foram amplificadas para espécies de *Minaria* apesar das inúmeras tentativas, e as regiões *trnQ-rps16*, *rps16-trnK* e *rpl32-trnL* não foram analisadas devido à má qualidade das sequências obtidas, possivelmente em decorrência de microssatélites, que impediram a obtenção de sequências bidirecionais para todas as amostras testadas. No caso do *rpl32-trnL*, por exemplo, existem pelo menos cinco microssatélites mononucleotídicos prejudicando a qualidade das sequências.

**Tabela 2.** Regiões do genoma plastidial e nuclear testadas para espécies de *Minaria*, seu sucesso na amplificação (Ampl.) e sequenciamento (Seq.). Caracteres quantitativos avaliados para escolha dos marcadores: L = comprimento das sequências alinhadas, Indels = gaps, Subst. = número de substituições nucleotídicas, Inv = inversões, PIC = caracteres potencialmente informativos, % variação = proporção de variabilidade em relação ao comprimento da sequência, IP = caracteres informativos para parcimônia e N = número de espécies analisadas. \* Amplificação em quantidade de DNA insuficiente para a reação de sequenciamento. # Sequências não aproveitadas. Em negrito, regiões selecionadas para as análises filogenéticas.

Genoma	Região	Ampl.	Seq.	L (pb)	Indels	Subst	Inv	PIC	% variação	IP	N
<i>Plastidial</i>	<b><i>psbA-trnH</i></b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>436</b>	<b>3</b>	<b>10</b>		<b>13</b>	<b>2.98</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
	<i>rpoB-trnC</i>	Sim	Sim	1326	3	12		15	1.13	3	7
	<b><i>trnD-T</i></b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>1144</b>	<b>10</b>	<b>1</b>		<b>11</b>	<b>0.96</b>		<b>3</b>
	<i>atpF-H</i>	Sim	Sim	555	1	3		4	0.72	0	4
	<i>psbK-I</i>	Sim	Sim	240	1			1	0.42		5
	<b><i>rps16</i></b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>845</b>	<b>6</b>	<b>12</b>		<b>18</b>	<b>2.13</b>	<b>2</b>	<b>7</b>
	<i>trnL_F</i>	Sim	Sim	936	10	9		19	2.03	0	9
	<b><i>trnS-G</i></b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>671</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>73</b>	<b>90</b>	<b>13.41</b>	<b>3</b>	<b>8</b>
	<i>trnQ-rps16</i>	Sim	Sim <sup>#</sup>								4
	<i>rps16-trnK</i>	Sim	Sim <sup>#</sup>								4
	<i>rpl32-trnL</i>	Sim	Sim <sup>#</sup>								5
	<i>trnV-ndhC</i>	Não	Não	---							
	<i>ndhF-rpl32</i>	Não	Não	---							
	<i>psbD-trnT</i>	Sim	Sim	1297	2	1		3	0.23		3
	<i>psbJ-petA</i>	Sim	Sim	738	2	2	18	22	2.98	0	7
	<i>atpI-atpH</i>	Sim	Sim	923	2	3		5	0.54		3
	<i>Nuclear</i>	<b>ITS</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>782</b>	<b>60</b>	<b>32</b>		<b>92</b>	<b>11.76</b>	<b>16</b>
<b>ETS</b>		<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>516</b>	<b>42</b>	<b>19</b>		<b>61</b>	<b>11.82</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
GBSSI2-8		Sim	Sim	1097	9	26		34	3.10	3	4
GBSSI8-12		Não	Não								
agt1		Sim	Sim <sup>#</sup>								
at103		Não	Não								
eif3E		Não	Não								
aroB		Sim*	Não								
sqD	Não	Não									

Dos nove marcadores nucleares testados, apenas cinco amplificaram e três geraram sequências filogeneticamente úteis. Apesar de possuírem *primers* universais, nem todos os genes COS foram amplificados com sucesso. Apenas os genes *agt1* e *aroB* foram amplificados e o último apresentou quantidades mínimas de DNA-alvo, e somente para poucas espécies. A variação encontrada no gene *agt1* localiza-se no final da sequência, após um microssatélite que dificulta a obtenção de sequenciamentos bem definidos. Como a construção de *primers* internos é limitada pelo tamanho reduzido da região (ca. 400 pb), ela também foi descartada das análises. A região contendo os éxons 2 a 8 do gene *GBSSI* foi amplificada para seis espécies de *Minaria*, porém com dificuldade. Ainda assim, as sequências de duas espécies não mostraram semelhança com qualquer sequência do GenBank e foram descartadas. As regiões ITS e ETS foram amplificadas com sucesso para todas as espécies do gênero, exceto para aquelas amostradas exclusivamente a partir de espécimes herborizados. O ITS apresentou proporções relativamente altas de variação entre clones da mesma espécie, com 14 a 61 sítios polimórficos, grande parte deles devido à perda ou duplicação (gaps) de pequenos pedaços e uma minoria deles (2 a 7 sítios) por substituição nucleotídica.

As regiões que apresentaram os maiores valores de PIC foram o ITS (92), o *trnS-G* (90), o ETS (61), o GBSSI2-8 (34) e o *psbJ-petA* (22). Quando comparamos o percentual de variação (i.e., considerando o tamanho das sequências), o *psbA-trnH* também entra na lista e o *trnS-G* desponta como o mais variável (13,41%), seguido pelo ETS (11,82%), o ITS (11,76%), o GBSSI2-8 (3,10%), o *psbJ-petA* e o *psbA-trnH* (2,98%). No entanto, a grande variação do *trnS-G* deve-se a uma inversão de 73 pb autapomórfica em *M. refractifolia*, sem significado filogenético relevante para o universo das amostras testadas. Uma inversão também foi observada no marcador *psbJ-petA* (18 pb), porém compartilhada por mais de uma espécie. Ainda assim, essa foi a única variação encontrada nesta região.

Quando os indels não são codificados, as substituições nucleotídicas são as únicas consideradas pelo PAUP para o cálculo de caracteres IP. Baseado no número de caracteres IP, o ITS desponta como a região mais informativa (16), seguido pelo ETS e *psbA-trnH* (4), *trnS-G*, *rpoB-trnC* e GBSSI2-8 (3). Apesar da baixa variação dos marcadores plastidiais, o potencial informativo individual e cumulativo deles foram analisados e o relacionamento filogenético comparado com o dos marcadores nucleares.

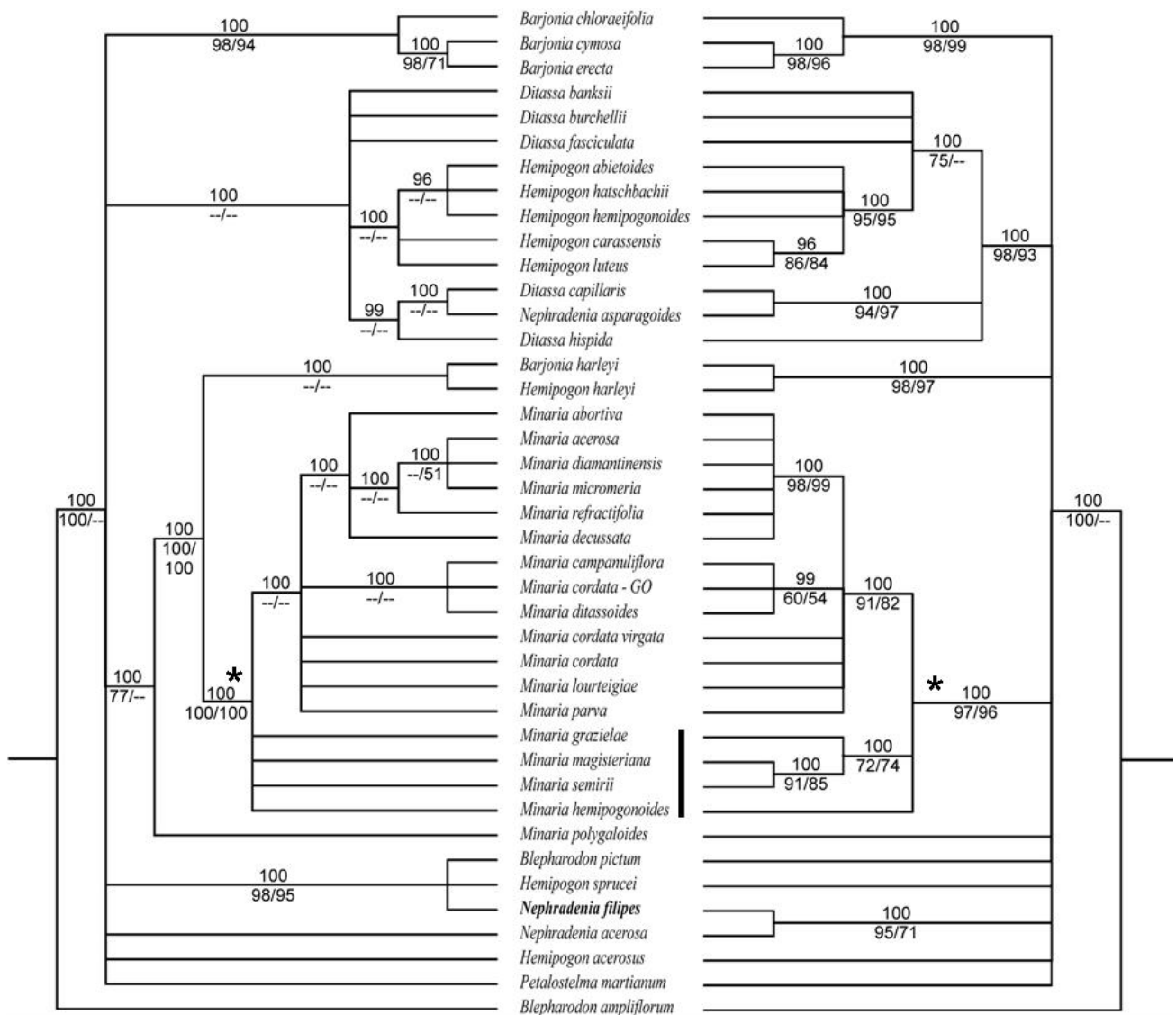


Dos marcadores plastidiais testados, quatro regiões foram utilizadas para inferir o relacionamento filogenético com todas as amostras, o *psbA-trnH*, o *trnS-trnG*, o *rps16* e o *trnD-T*. O *psbA* e o *rps16* apresentaram os maiores percentuais de variação (16,88% e 10,02%, respectivamente) (Tabela 3). Os marcadores plastidiais analisados individualmente produziram topologias pouco resolvidas. Por outro lado, a grande variação nucleotídica das regiões ITS e ETS revelaram-se úteis para inferências filogenéticas em *Minaria*.

**Tabela 3.** Resumo das características das matrizes e análises de máxima parcimônia.

<b>Características</b>	<b><i>psbA</i></b>	<b><i>trnS-G</i></b>	<b><i>trnD-T</i></b>	<b><i>rps16</i></b>	<b>ITS</b>	<b>ETS</b>	<b>Plastídio</b>	<b>Nuclear</b>	<b>Plastídio + nuclear</b>
Compr. da matriz (pb)	456	609	1418	768	861	444	3274	1335	4627
Caracteres analisados	456	609	1303	768	861	444	3157	1248	4409
Car. constantes	379	559	1233	691	688	330	2855	954	3815
Car. variáveis	77	50	70	77	173	114	209	178	382
Car. informativos p/ parcimônia	33	14	20	25	65	34	93	116	212
% variação (PIC/L x 100)	16,88	8,21	5,37	10,02	20,09	25,67	6,62	14,26	8,66
Número de árvores	105121	14610	10000	10000	1350	451036	20100	54	264
Índice de consistência	0,8713	0,9804	0,8659	0,8137	0,7992	0,8210	0,8163	0,7586	0,7528
Índice de retenção	0,9087	0,9853	0,8830	0,8373	0,7792	0,8054	0,8610	0,7922	0,7915

***Congruência entre dados e árvores.*** Dados de um mesmo genoma foram congruentes entre si ( $p=0,406$  entre dados plastidiais e  $p=0,416$  entre ITS e ETS). Porém, a concatenação entre os dados dos dois genomas mostrou-se incongruente ( $p=0,006$ ). Os testes de homogeneidade de partição excluindo táxons progressivamente demonstraram que os dados divergem principalmente em relação à posição de *Nephradenia filipes* Malme, pois sem ela a incongruência entre dados plastidiais e nucleares deixa de ser estatisticamente significativa ( $p=0,016$ ) (Fig. 1). A exclusão de táxons com ramos mais longos não alterou a resposta dos testes de incongruência entre partições genômicas, conforme indicado pelo teste ILD. Os dados plastidiais e nucleares se mostraram incongruentes, quando apenas as espécies de *Minaria* foram consideradas ( $p=0,002$ ), porém clados incongruentes não foram estatisticamente sustentados (Fig. 1). Na realidade, o teste ILD tende a superestimar diferenças, podendo indicar conflitos onde eles não existem. Além disso, ele é realizado tendo a parcimônia como critério de optimalidade, não se aplicando da mesma forma a análises baseadas em modelos evolutivos. Desse modo, a discussão sobre as relações em *Minaria* estarão concentradas nos resultados obtidos nas análises combinadas moleculares e de evidência total.



**Figura 1.** Consenso de maioria das árvores produzidas pela inferência Bayesiana mostrando apenas os clados com Probabilidade Posterior (PP)  $\geq 95\%$ , baseadas nas matrizes combinadas de dados plastidiais (*psbA-trnH*, *trnS-G*, *trnD-T* e *rps16*), à esquerda, e nucleares (ITS e ETS), à direita. Os valores acima dos ramos indicam a PP do clado e aqueles abaixo o suporte de bootstrap da ML e da MP (BS\_ML/BS\_MP). Em negrito, está indicada a posição incongruente entre os dois cladogramas. Asterisco aponta o núcleo de *Minaria* e a barra preta, as espécies de sementes sem coma.

A diferença entre as árvores produzidas pelos conjuntos de dados plastidiais e nucleares é significativa ( $P < 0,01$ ), independente do método utilizado para produzi-las. As árvores produzidas pela IB e pela MV, tanto com base nos dados nucleares quanto com base nos dados moleculares combinados, não foram significativamente diferentes, e as árvores produzidas pela IB com base nos dados moleculares combinados (Fig. 1) e com base no conjunto de dados plastidiais não foram estatisticamente diferentes, o mesmo ocorrendo com a MP. A IB resolveu mais clados com sustentação  $PP \geq 95\%$  quando comparada à MP ou MV usando o corte de  $BS \geq 75\%$ . Ela se mostrou mais eficiente em recuperar clados corretos com acurácia, sobretudo quando apenas uma partição dos dados é utilizada nas análises (Capítulo 2). Ainda assim, as análises de IB, MV e MP com base nos dados moleculares combinados não apresentaram incongruências topológicas sustentadas.

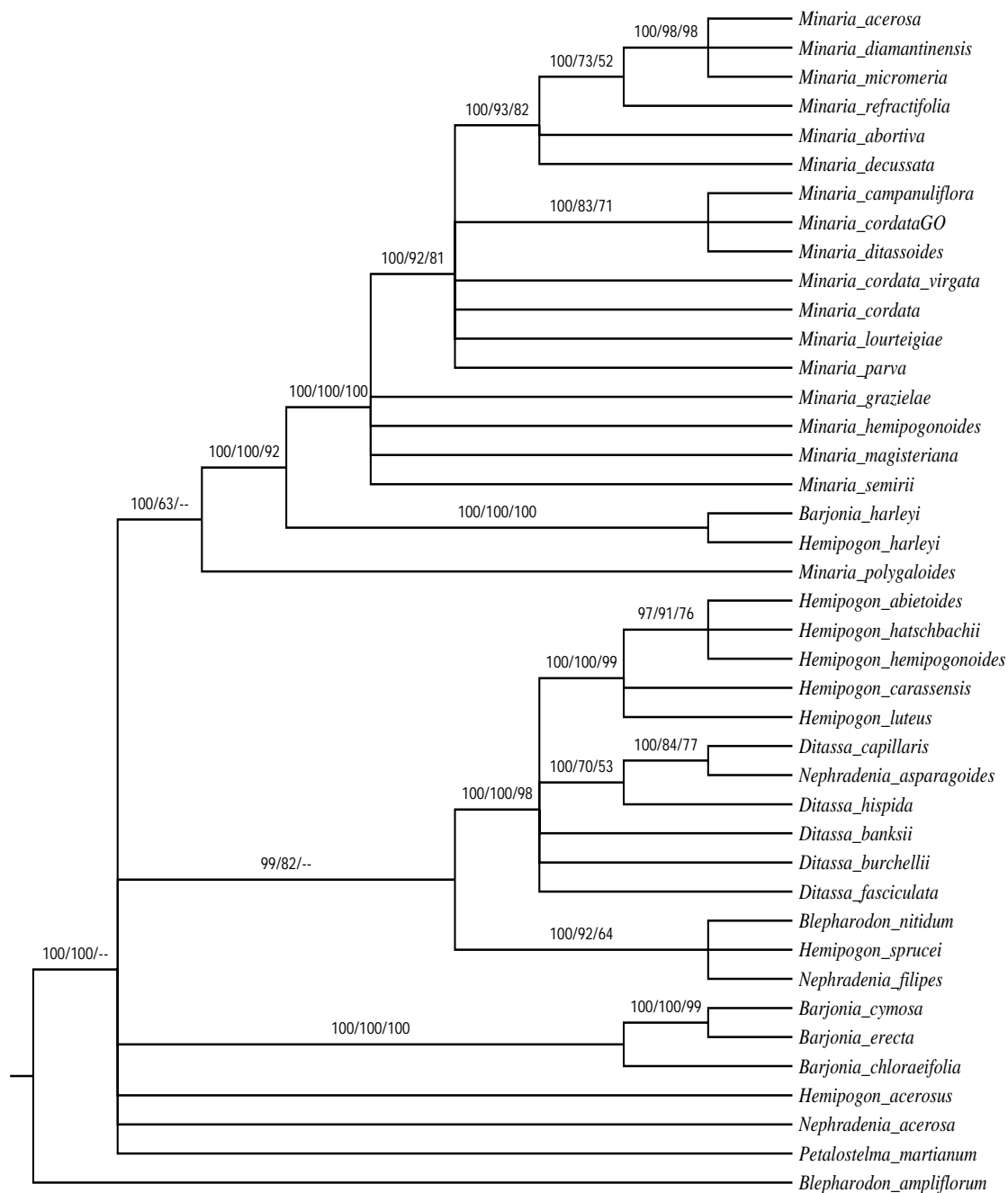
**Reconstrução filogenética.** A matriz plastidial contém sequências de quatro regiões (*psbA*, *trnS-G*, *rps16* e *trnD-T*) para 41 táxons, totalizando 3.274 caracteres, com 6,62% de sítios variáveis. A matriz combinada nuclear também compreende 41 táxons e abrange a porção completa do ITS (parte final do gene 18S, o ITS1, o gene 5.8S, o ITS2 e parte inicial do gene 26S) e a região que flanqueia cada cópia, o ETS, totalizando 1.335 caracteres, com 14,26% de sítios variáveis (para um resumo das características das matrizes veja a Tabela 3).

Os dados plastidiais divergem quanto à posição de *Minaria polygaloides*, '*Barjonia harleyi*' e '*Hemipogon harleyi*'. Apenas o marcador *trnS-G* apontou o monofilismo de *Minaria* com boa sustentação (100/84, PP/BS\_MP), enquanto os demais marcadores apenas sustentaram '*Barjonia harleyi*' e '*Hemipogon harleyi*' proximamente relacionadas ao núcleo de *Minaria* (*psbA*, 100/86) ou não apresentam resolução para essas linhagens. Combinados (Fig. 1), os dados plastidiais sustentam *M. polygaloides*, '*Barjonia harleyi*' e '*Hemipogon harleyi*' proximamente relacionadas às demais espécies de *Minaria*, formando um grupo monofilético (100/77/--; PP/BS\_MV/BS\_MP). Já a relação entre '*Barjonia harleyi*', '*Hemipogon harleyi*', e o núcleo de *Minaria* está muito bem sustentada (100/100/100). No núcleo de *Minaria* (100/100/100), emerge um clado composto pelas espécies com sementes comosas, porém sustentado apenas pela IB; as espécies sem coma não são resolvidas.

A principal diferença nos resultados obtidos entre as regiões ITS e ETS está relacionada à posição de *Hemipogon acerosus*, que aparece com *Minaria* baseado em ETS (94/60, PP/BS\_MP). O ITS, por sua vez, apresentou um alto suporte para a relação de *M. abortiva* com o clado de *M. acerosa* (100/99), morfologicamente distintos. A origem única das espécies com sementes sem coma (*M. hemipogonoides* + *M. grazielae* + *M. semirii* + *M. magisteriana*) foi indicada apenas pelo ITS, porém com baixa sustentação (89/57). A topologia gerada pelos dados nucleares combinados (Fig. 1) não define a relação entre *M. polygaloides*, '*Barjonia*' *harleyi* e '*Hemipogon*' *harleyi* e o núcleo *Minaria*. No entanto, apresenta forte sustentação para o clado formado pelas espécies endêmicas da Bahia, '*Barjonia*' *harleyi* e '*Hemipogon*' *harleyi* (100/98/97), já sinalizada pela IB com dados plastidiais (100/--/--). O núcleo de *Minaria* também é bem sustentado com dados nucleares (100/97/96) e algumas relações consistentes podem ser percebidas entre suas espécies. *Minaria magisteriana*, *M. semirii* e *M. grazielae* (100/72/74) formam um clado bem sustentado na base do núcleo de *Minaria*, sendo as duas primeiras mais relacionadas entre si (100/91/85). A posição de *M. hemipogonoides*, no entanto, não é resolvida. Um segundo clado bem sustentado (100/91/82) é formado pelas outras onze espécies do gênero, delimitando um grupo bastante diverso morfológica, geográfica e ecologicamente. Os três acessos de *M. cordata* inseridos na matriz contemplam parte de sua variação morfológica e geográfica e não formam um grupo monofilético. Um dos acessos, proveniente do Estado de Goiás, emerge juntamente com *M. campanuliflora* e *M. ditassoides* (99/60/54), e os demais assumem posições pouco resolvidas entre espécies do complexo morfológico que inclui *M. parva*, *M. lourteigiae*, *M. campanuliflora* e *M. ditassoides*. *Minaria abortiva*, que também está incluída neste complexo morfológico, aparece mais relacionada à *M. acerosa*, *M. refractifolia*, *M. micromeria*, *M. diamantinensis* e *M. decussata*, formando com elas um clado bem sustentado (100/98/99).

A análise combinada de dados plastidiais e nucleares (Fig. 2) revela o monofilismo de *Minaria* (100/63/--), incluindo '*Barjonia*' *harleyi* e '*Hemipogon*' *harleyi*, confirmando a relação delas com as demais espécies de *Minaria* (100/100/92) e entre si (100/100/100). No núcleo de *Minaria* (100/100/100), as espécies sem coma nas sementes (*M. grazielae*, *M. semirii*, *M. magisteriana* e *M. hemipogonoides*) permanecem não resolvidas na base, de onde emerge também um clado sustentado (100/92/81) que agrupa as

espécies do complexo de folhas cordadas, com *M. parva* divergindo na base, mas com as demais relações pouco resolvidas, apenas *M. campanuliflora*, *M. ditassoides* e *M. cordata* (de Goiás) formando um clado sustentado (100/83/71). A relação entre *M. abortiva*, *M. decussata*, *M. refractifolia* e as espécies de folhas acerosas é consistente nas análises individuais e também na molecular combinada (100/93/82). Um clado mais derivado e bem sustentado (100/98/98) reúne espécies de folhas acerosas mais semelhantes morfológicamente, *M. acerosa*, *M. micromeria* e *M. diamantinensis*. A combinação dos dados moleculares combinados recupera com boa sustentação todos os cladogramas presentes nas análises com as partições plastidial e nuclear, com exceção do clado de *M. grazielae*, presente apenas na topologia obtida com dados nucleares.

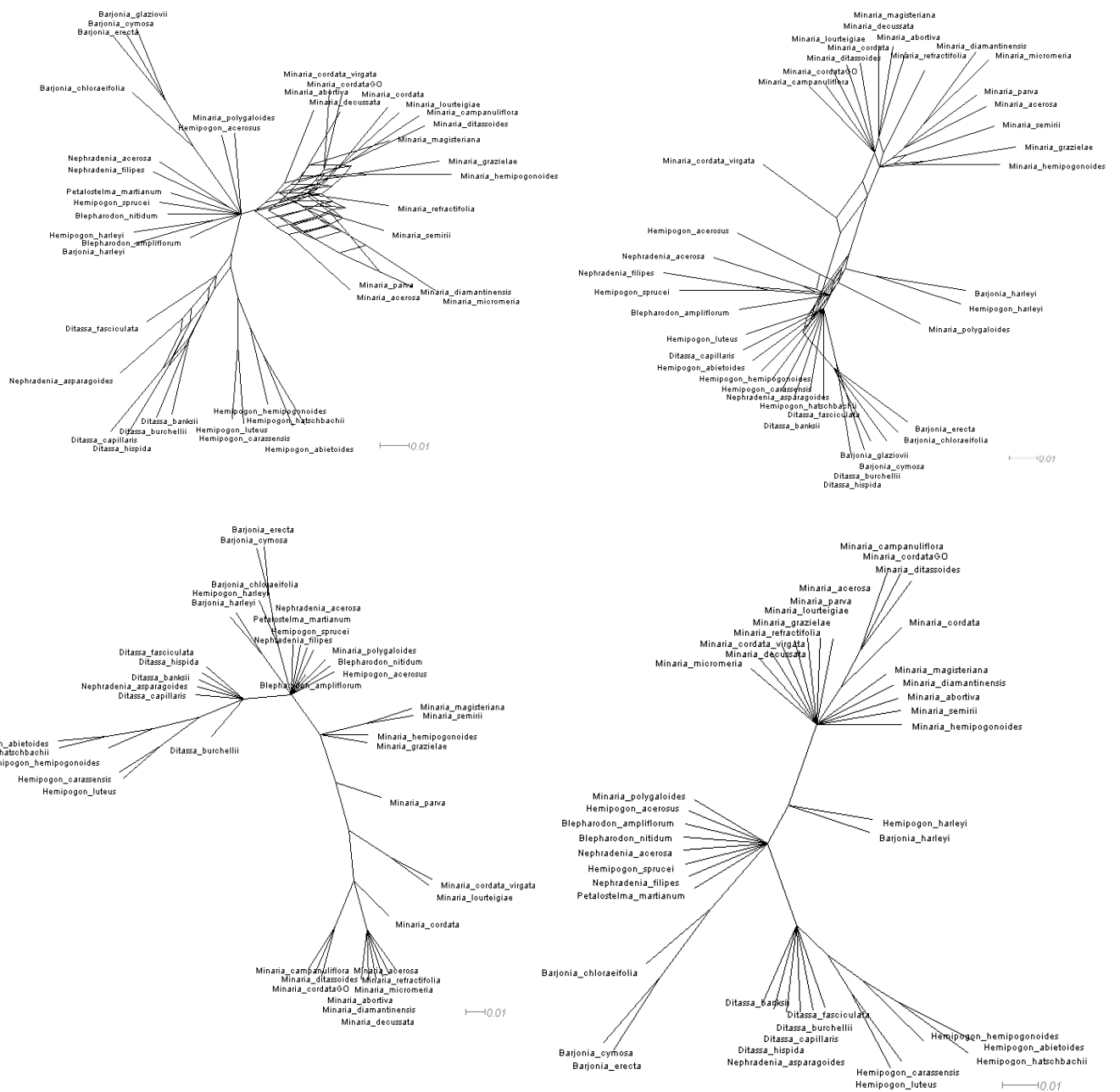


**Figura 2.** Consenso de maioria das árvores produzidas pela Inferência Bayesiana com base na matriz combinada de dados moleculares, plastidiais (*psbA-trnH*, *trnS-G*, *trnD-T* e *rps16*) e nucleares (ITS e ETS). Os números acima dos ramos indicam valores de probabilidade posterior da IB, bootstrap da MV e bootstrap da MP (PP/BS\_MV/BS\_MP).

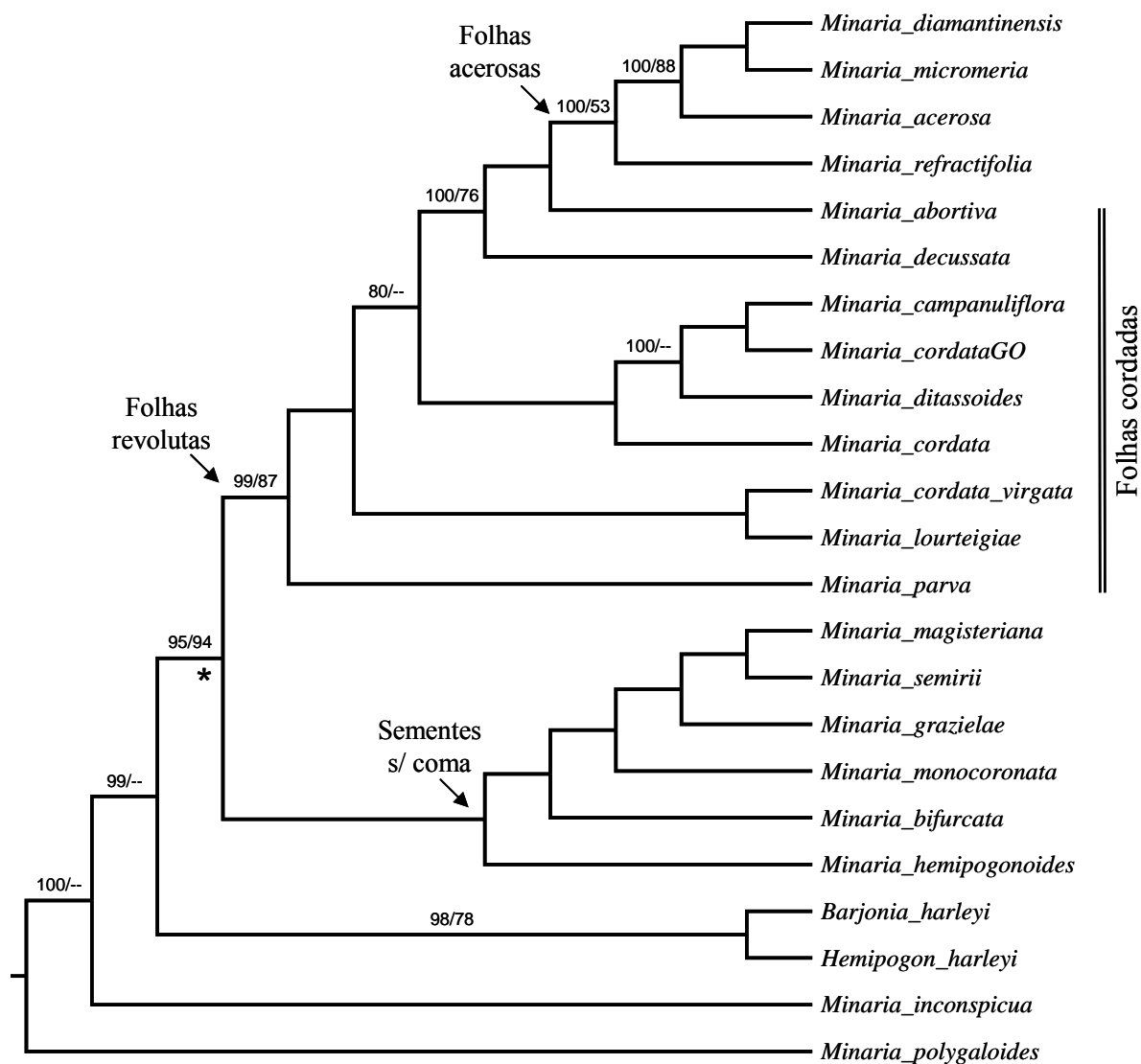


Os representantes de Metastelmatinae inseridos na análise demonstraram suporte estatístico para dois clados principais, um formado pelas espécies de *Barjonia* (100/100/100) e outro (100/100/98) formado pelo núcleo de Metastelmatinae. O clado formado por *Blepharodon pictum*, *Hemipogon sprucei* e *Nephradenia filipes*, apesar de sustentado nas análises moleculares combinadas (100/92/64), é contradito pelos dados nucleares. Análises mais abrangentes em Metastelmatinae foram apresentadas em outro trabalho (Silva & al., em revisão) e não serão abordadas aqui. As redes filogenéticas (Fig. 3) ilustram os pontos de divergência entre as topologias das análises de regiões independentes e entre as topologias obtidas com as partições plastidiais e nucleares, tanto produzidos pela MP quanto pela IB. As divergências são localizadas principalmente nos núcleos de *Minaria* e de Metastelmatinae. No entanto, a rede construída com as topologias das análises combinadas dos dois conjuntos de dados não aponta incongruências.

A análise de evidência total, combinando dados morfológicos e moleculares, permitiu posicionar também as três espécies sem sequências moleculares. A estrutura filogenética não é modificada, mas a sustentação dos principais clados é menor (Fig. 4). *Minaria inconspicua* aparece não resolvida na base do gênero, enquanto *M. bifurcata* e *M. monocoronata* se agrupam com as espécies relacionadas a *M. grazielae*, devido a características do fruto e semente sem coma.

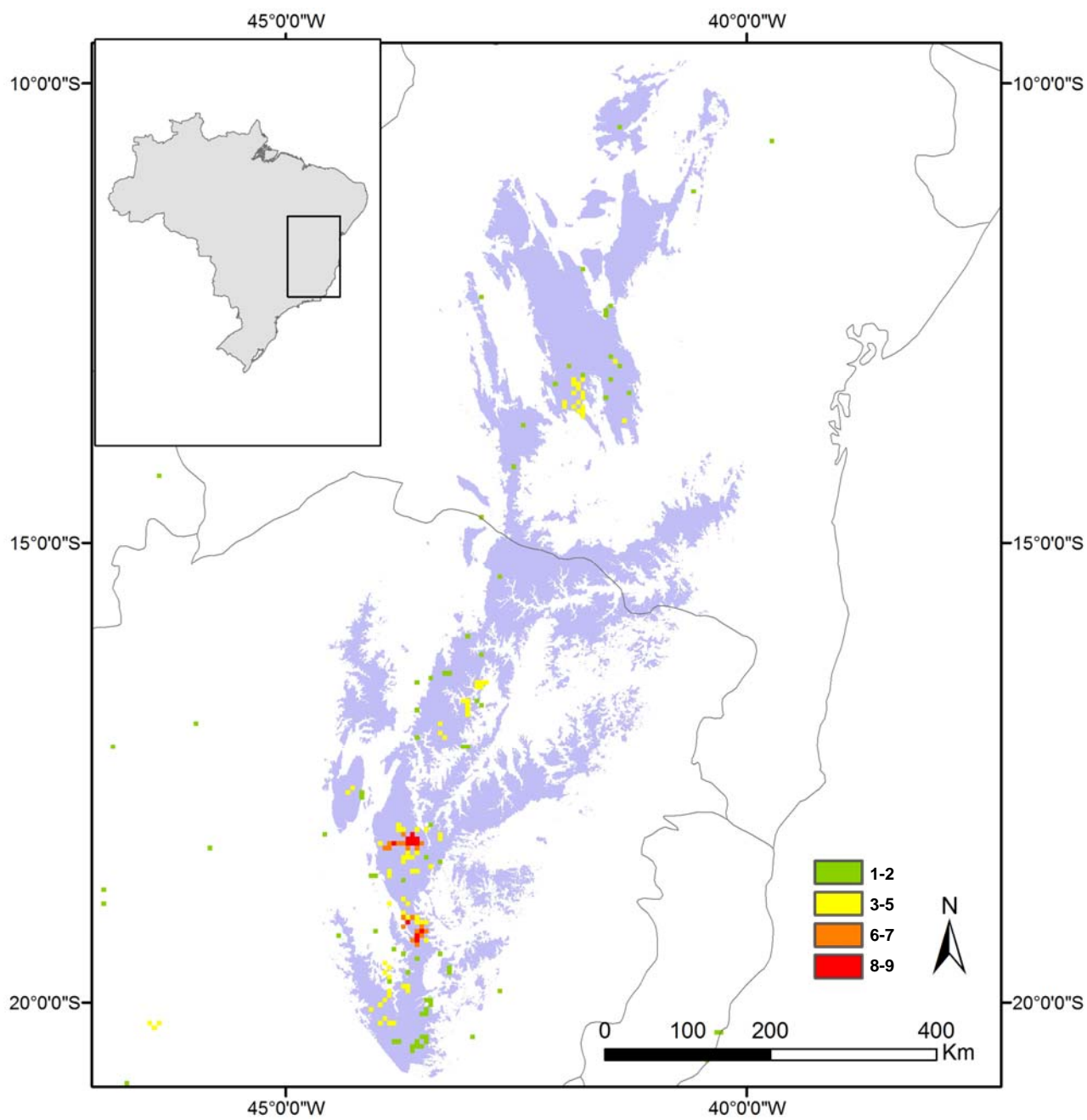


**Figura 3.** Supernetwork de árvores consenso: acima, a partir das análises individuais produzidas pela Inferência Bayesiana (à esquerda) e pela Máxima Parcimônia (à direita); abaixo, a partir das matrizes combinadas moleculares (plastidial + nuclear), construídas pela de Inferência Bayesiana (à esquerda) e pela Máxima Parcimônia (à direita).

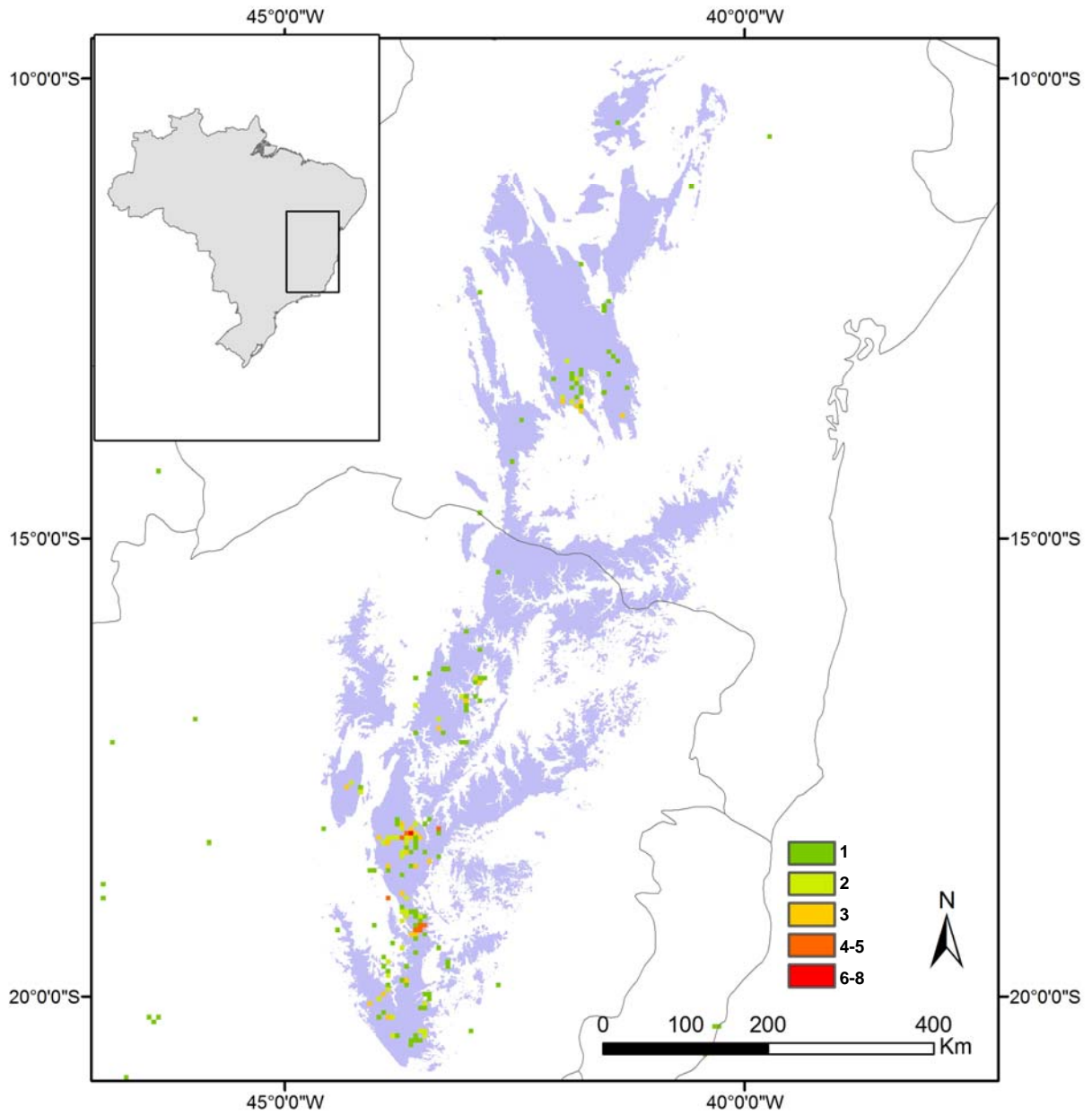


**Figura 4.** Consenso de maioria das árvores produzidas na Inferência Bayesiana baseado na matriz de evidência total, incluindo os dados moleculares, plastidiais (*psbA-trnH*, *trnS-G*, *trnD-T* e *rps16*) e nucleares (ITS e ETS), e os morfológicos. Os números acima dos ramos indicam valores de probabilidade posterior da IB e bootstrap da MP (PP/BS\_MP). Asterisco indica o núcleo de *Minaria*.

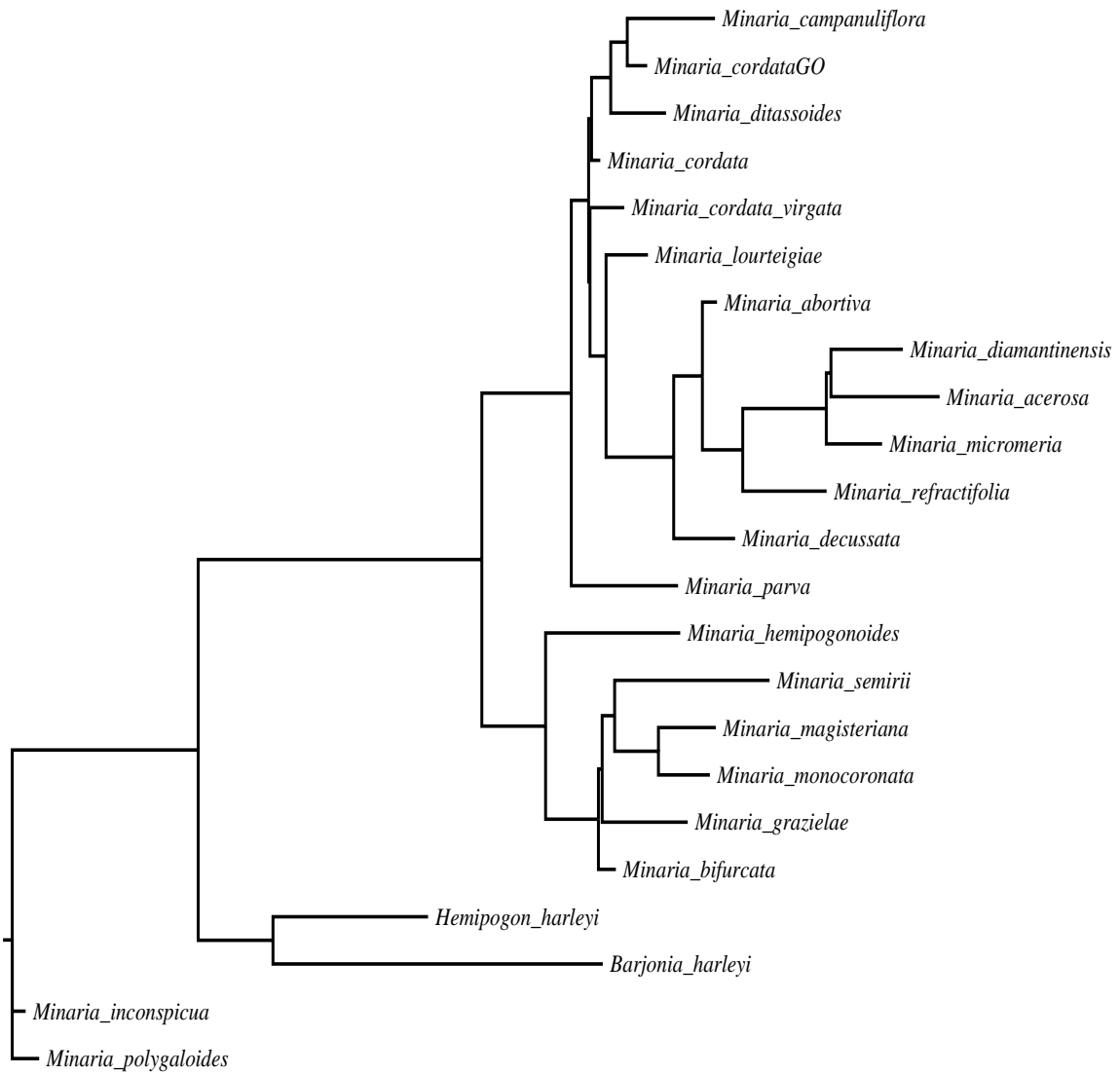
***Análise espacial da diversidade filogenética.*** As regiões do Planalto de Diamantina e Serra do Cipó, em Minas Gerais, apresentaram as maiores riquezas, tanto de espécies quanto de endemismos (Figs. 5 e 6). A figura 7 ilustra os comprimentos dos ramos utilizados nas análises espaciais. Quatro áreas de alta diversidade e endemismo filogenéticos foram detectadas (Figs. 8 a 10; Tabela 4): Rio de Contas, na porção baiana do Espinhaço, o Planalto de Diamantina (PDi), a Serra do Cipó (Sci) e o Sul da Cadeia do Espinhaço (SCE), na porção mineira (para uma descrição dessas áreas, veja o capítulo 3). O PDi apresentou maior intensidade de diversidade e endemismo filogenéticos, seguido pela Sci, em relação à diversidade filogenética, e por Rio de Contas, em relação ao endemismo filogenético.



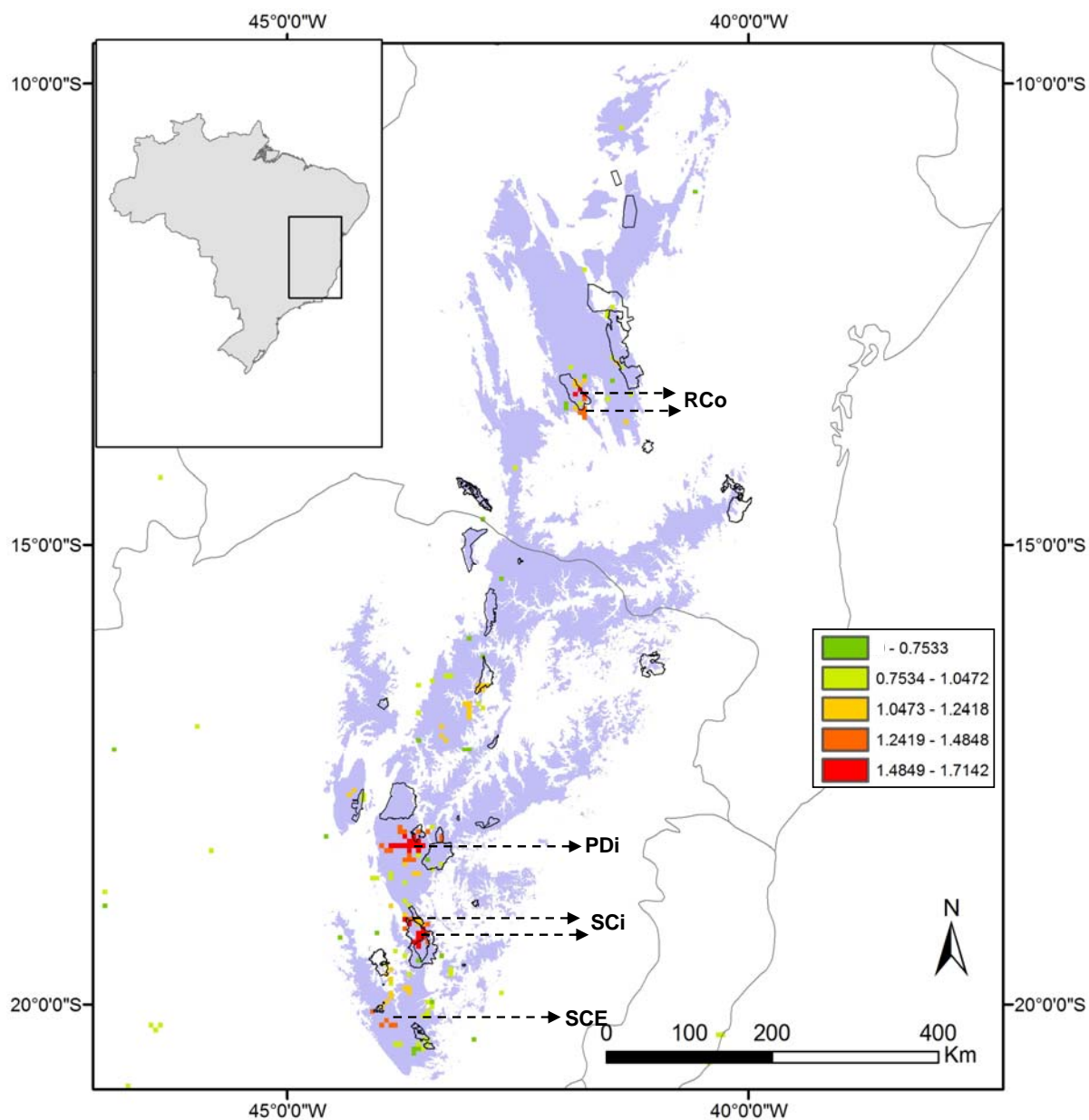
**Figura 5.** Mapa de distribuição da riqueza de espécies de *Minaria* focando a Cadeia do Espinhaço, áreas acima de 900 m em azul. Grids de 0,05 °, considerando duas células de vizinhança.



**Figura 6.** Mapa de distribuição da riqueza de endemismo de espécies de *Minaria* focando a Cadeia do Espinhaço, áreas acima de 900 m em azul. Grids de 0,05°, considerando duas células de vizinhança.

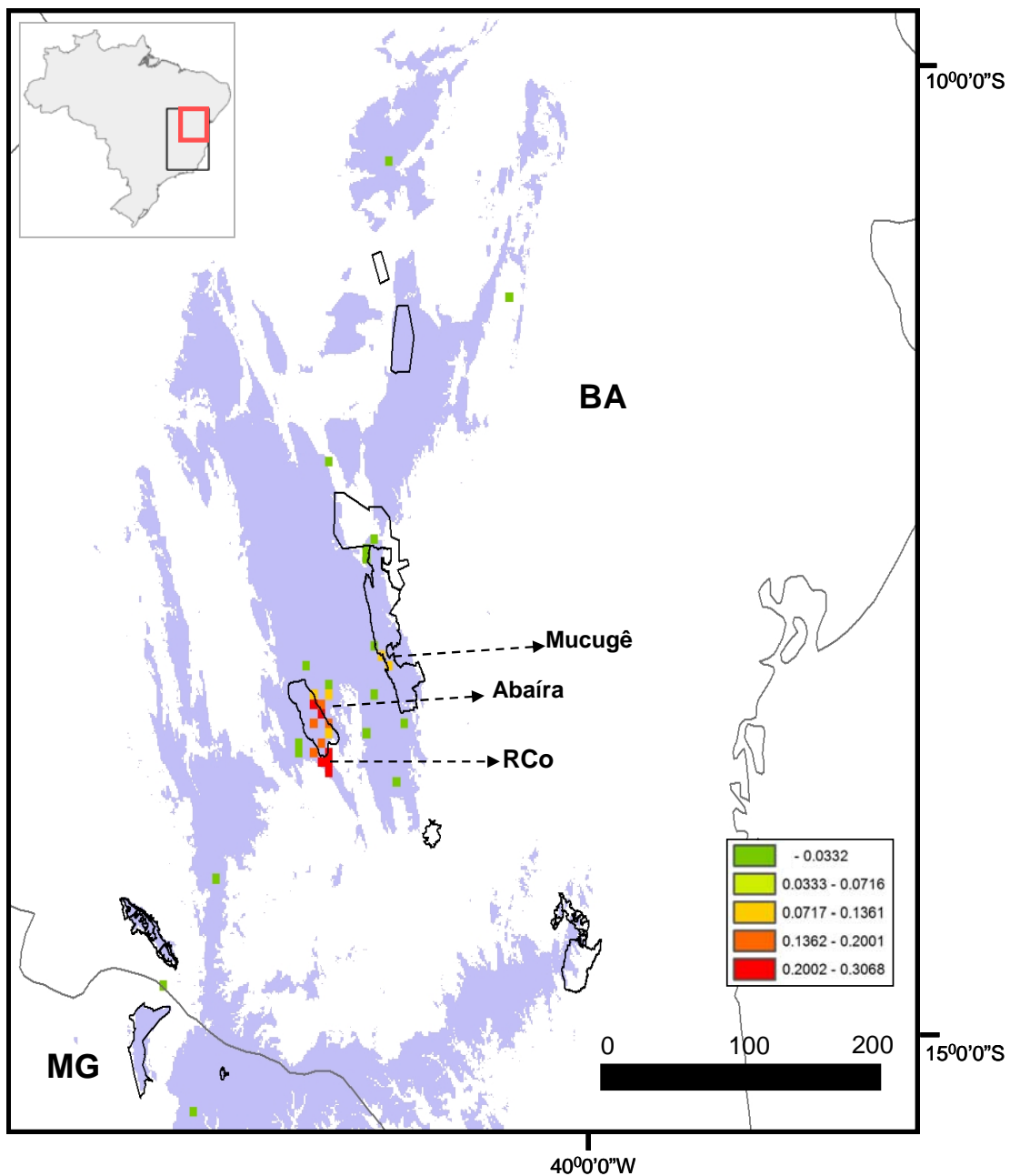


**Figura 7.** Filograma da Inferência Bayesiana baseado na matriz de evidência total, incluindo os dados moleculares, plastidiais (*psbA-trnH*, *trnS-G*, *trnD-T* e *rps16*) e nucleares (ITS e ETS), e os morfológicos.

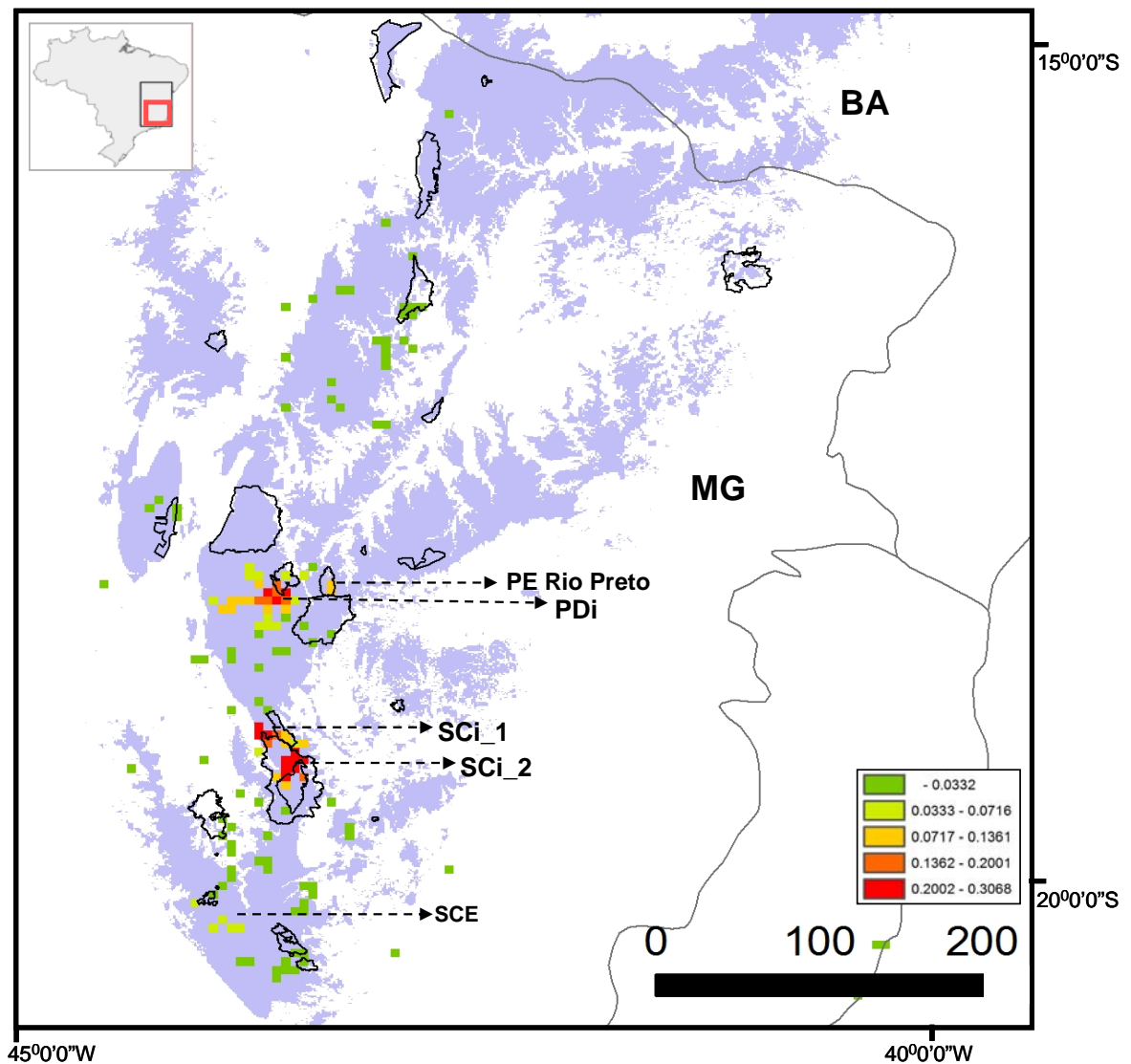


**Figura 8.** Mapa de distribuição da diversidade filogenética de espécies de *Minaria* focando a Cadeia do Espinhaço, Brasil. Em azul delimitação hipsométrica (acima de 900 m) da Cadeia do Espinhaço. Grids de 0,05°, considerando duas células de vizinhança. RCo, região de Rio de Contas; PDi, Planalto de Diamantina; SCi, região da Serra do Cipó; SCE, Sul da Cadeia do Espinhaço. Unidades de conservação contornadas em preto.





**Figura 9.** Mapa de distribuição do endemismo filogenético de espécies de *Minaria* focando a Cadeia do Espinhaço no estado da Bahia, Brasil. Em azul delimitação hipsométrica (acima de 900 m) da Cadeia do Espinhaço. Grids de 0,05°, considerando duas células de vizinhança. RCo, região de Rio de Contas. Em destaque áreas de relevante endemismo filogenético, Mucugê e Abaíra. Unidades de conservação contornadas em preto.



**Figura 10.** Mapa de distribuição do endemismo filogenético de espécies de *Minaria* focando a Cadeia do Espinhaço no estado de Minas Gerais, Brasil. Em azul delimitação hipsométrica (acima de 900 m) da Cadeia do Espinhaço. Grids de 0,05°, considerando duas células de vizinhança. PDi, Planalto de Diamantina; SCi, região da Serra do Cipó; SCE, Sul da Cadeia do Espinhaço. Em destaque áreas de relevante endemismo filogenético, Parque Estadual do Rio Preto e SCi\_1 que abrange a região conhecida como Lapinha. Unidades de conservação contornadas em preto.

**Tabela 4.** Principais unidades (Un.) de diversidade (DF) e endemismo filogenéticos (EF) em *Minaria*, indicando localidade (coordenadas da Loc.) e táxons presentes na unidade. \* microendêmicos.

Un	Região (Estado)	Maior contribuinte para EF	Loc.	Táxons presentes na área de DF
RCo	Rio de Contas (BA)	' <i>B.</i> ' <i>harleyi</i>	13,3S 41,9W	' <i>B.</i> ' <i>harleyi</i> *, ' <i>H.</i> ' <i>harleyi</i> *, <i>M. acerosa</i> , <i>M. cordata_cord</i> e <i>_virg</i>
PDi	Planalto de Diamantina (MG)	<i>M. grazielae</i>	18,3S 43,5W	<i>M. grazielae</i> *, <i>M. refractifolia</i> *, <i>M. diamantinense</i> *, <i>M. bifurcata</i> *, <i>M. campanuliflora</i> *, <i>M. decussata</i> , <i>M. ditassoides</i> , <i>M. inconspicua</i> * e <i>M. parva</i>
SCi	Serra do Cipó (MG)	<i>M. hemipogonoides</i>	19,1S 43,7W	<i>M. hemipogonoides</i> *, <i>M. magisteriana</i> *, <i>M. semirii</i> *, <i>M. polygaloides</i> *, <i>M. parva</i> , <i>M. ditassoides</i> , <i>M. acerosa</i> e <i>M. decussata</i>
SCE	Sul da Cadeia do Espinhaço (MG)	<i>M. monocoronata</i>	20,1S 43,9W	<i>M. monocoronata</i> *, <i>M. decussata</i> , <i>M. micromeria</i> e <i>M. acerosa</i>

## DISCUSSÃO

**Varição molecular.** Cinco das regiões mais variáveis na classificação de Shaw & al. (2007), a saber, *trnQ-rps16*, *rps16-trnK*, *rpl32-trnL*, *trnV-ndhC* e *ndhF-rpl32*, não puderam ser utilizadas para se inferir relações de parentesco em *Minaria*. No entanto, três deles (*trnQ-rps16*, *rps16-trnK* e *rpl32-trnL*) poderão ser úteis em estudos filogeográficos com base em microssatélites. As regiões de plastídio utilizadas para estudos filogenéticos em Asclepiadoideae (*trnT-L*, *rps16*, *matK* e *trnS-G*) e até mesmo regiões recomendadas para estudos em grupos de espécies próximas (Shaw & al., 2005; 2007) revelaram-se individualmente pouco variáveis, não sendo informativas para se inferir relações filogenéticas em *Minaria*. No entanto, a combinação delas mostrou-se útil na delimitação do gênero e de seus nós mais basais.

A única região nuclear que havia sido anteriormente sequenciada para o grupo (ITS) apresentou-se polimórfica em algumas espécies de Metastelmatinae (Rapini & al. 2006; Silva & al., em revisão). Ainda assim, o número de espécies com ITS polimórfico neste estudo foi menor do que aquele com cópias polimórficas de GBSSI (Mort & Crawford, 2004). Cópias polimórficas de ITS foram encontradas apenas em espécies microendêmicas (*M. grazielae*, *M. hemipogonoides*, *M. magisteriana*, *M. polygaloides*, *M. refractifolia* e *M. semirii*), estando eventualmente ausentes em algumas populações, como observado para *M. magisteriana* e *M. refractifolia*. As diferenças entre essas cópias parálogas parecem ser relativamente recentes. São paralogias superficiais (*sensu* Bailey & al., 2003), coalescendo na própria espécie, sem prejudicar o funcionamento do gene, nem interferir na reconstrução filogenética das espécies. Elas ocorreram somente após o evento de especiação, não tendo sido homogenizadas por evolução em concerto.

O ITS e o ETS foram selecionados principalmente pela variação e o número relativamente menor de espécies com cópias polimórficas. Apesar dos diversos fenômenos associados à evolução do ITS que podem levar a desvios na reconstrução de filogenias de organismos (Álvarez & Wendel, 2003; Mort & al., 2007; Calonje & al., 2009), ele tem sido bastante utilizado em estudos com táxons próximos, inclusive em Apocynaceae (Wanntorp & al. 2006; Thiv & Meve 2007). A dificuldade de sua utilização em níveis taxonômicos mais inclusivos de Asclepiadoideae, especialmente devido ao alinhamento impreciso entre subtribos, está relacionado às altas taxas de mutação.

Este é o primeiro trabalho que utiliza o marcador ETS em Apocynaceae. Esse espaçador externo transcrito do DNA 18S–26S é especialmente útil para se ampliar a informação do ITS (Baldwin & Markos, 1998; Linder & al., 2000; Logacheva & al. 2010), pois ambos possuem taxas evolutivas similares, aparecem em sequência no genoma, como parte de uma mesma unidade transcrita, e desempenham papel similar e interdependente na maturação dos rRNAs (Baldwin & Markos, 1998; Calonges & al., 2009). O ETS de angiospermas é normalmente maior do que o ITS-1 e o ITS-2, geralmente mais variável e filogeneticamente mais informativo para reconstrução filogenética em níveis taxonômicos menores (Mitsui & al., 2008; Logacheva & al., 2010). A falta de uma maior popularização do ETS em plantas deve-se principalmente à grande variação em sua região flanqueadora não transcrita, o que impede a construção de *primers forwards* universais (Baldwin & Markos, 1998; Logacheva & al., 2010). No entanto, o *primer* descrito para o gênero *Mimulus* L. – Phrymaceae (Beardsley & Olmstead, 2002), em combinação com um *reverse* universal (Baldwin & Markos, 1998), foi suficiente para que todas as amostras fossem amplificadas com sucesso. Para o universo de amostras de Metastelmatinae analisadas, o ETS se mostrou mais variável e menos homoplástico do que o ITS (Tabela 3). Essas duas regiões somam uma expressiva variação (14,26 %) em relação às plastidiais (6,62 %), porém se revelam mais homoplásticas que elas.

***Congruência entre os conjuntos de dados e topologias.*** Uma das principais preocupações dos filogeneticistas tem sido construir árvores de espécies de maneira que sumarizem as árvores de genes, ampliando a confiança para as relações de parentesco. No entanto, muitas árvores de genes têm se revelado topologicamente incongruentes e, em alguns casos, as incongruências são altamente sustentadas (Rokas & al., 2003). Ainda assim, incongruências entre árvores de genes não devem ser motivo para que a construção de árvores de espécies seja abandonada (Knowles, 2009). Diante delas, diversas posições têm sido tomadas, que vão da exclusão de conjuntos de dados ou dos clados incongruentes (van der Niet & Linder, 2008) até a combinação dos dados ou de seus resultados através de métodos alternativos, não baseados em árvores hierárquicas, mas sim em redes que sintetizam conflitos filogenéticos (Huson & Bryant, 2006; Willyard & al., 2009; Bell & Ryvönen, 2010).

O conflito mais evidente entre os conjuntos de dados plastidiais e nucleares neste estudo está relacionado à posição de *Nephradenia filipes*. A posição dessa espécie não foi resolvida pela MP com base em dados nucleares, mas se mostrou incongruente nas análises de MV e IB, com forte sustentação. A origem dessa incongruência ainda é uma incógnita, entretanto causa biológica como hibridação geralmente não é sugerido dada a raridade deste evento na família, possivelmente devido incompatibilidade reprodutiva. As outras poucas incongruências sustentadas entre as duas partições genômicas parecem ter sido ocasionadas por desvios gerados pelos diferentes métodos de reconstrução. A posição de *M. parva*, por exemplo, se mostrou incongruente nas análises de MP e MV, possivelmente devido a desvios na análise dos dados plastidiais, pois resultados congruentes entre as duas fontes de dados foram obtidos na IB, sugerindo que os resultados obtidos com dados plastidiais neste caso devem estar incorretos (Capítulo 2).

**Relações filogenéticas em *Minaria*.** As principais características usadas para descrever o gênero *Minaria*, como o hábito subarbuscivo, folhas diminutas e predominância geográfica na Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, têm sido ampliadas de modo a incluir '*Barjonia*' *harleyi* e '*Hemipogon*' *harleyi* (Silva & al., em revisão), duas espécies endêmicas da porção baiana da Cadeia do Espinhaço (clado baiano). Nossas análises sustentam *M. polygaloides* como grupo irmão das demais espécies do gênero, e confirmam *Minaria* como um gênero monofilético, incluindo as espécies da Bahia, com base em dados moleculares combinados e, principalmente, plastidiais. *Minaria* é caracterizado por polínias diminutas (até 0,3 mm compr.), hábito subarbuscivo, predominantemente ereto (exceto em '*H.*' *harleyi*, que é volúvel; mas indivíduos com ramos volúveis para o ápice podem ser encontrados em *M. acerosa* e *M. refractifolia*, geralmente associado à ocupação de ambientes com vegetação mais densa), ramos predominantemente indumentados (exceto em '*B.*' *harleyi* e '*H.*' *harleyi*), e folhas em geral diminutas, exceto em '*H.*' *harleyi*, onde são delgadas e compridas.

O clado baiano é altamente sustentado por dados nucleares e está restrito ao sudoeste da Chapada Diamantina. Enquanto '*Barjonia*' *harleyi* é encontrada em fendas entre rochas, '*Hemipogon*' *harleyi* é encontrada em solos arenosos, mais profundos, com vegetação baixa, entre blocos de afloramentos. Ambas possuem ramos glabros, flores grandes em relação às demais espécies de *Minaria*, e ápice do ginostégio prolongado,

longamente em '*H.* harleyi (ca. 2,4 mm compr.). São bem distintas das demais espécies de *Minaria* e entre si, possivelmente representando remanescentes de uma linhagem antiga (Capítulo 3).

O núcleo de *Minaria*, que inclui a maioria das espécies com distribuição concentrada em Minas Gerais, é altamente sustentado com base em qualquer dos conjuntos de dados. Ele reúne espécies eretas, com ramos indumentados por toda superfície, inclusive na lâmina foliar, no pedicelo e foliculo (exceto em *M. magisteriana*, para as três últimas estruturas). Irradiou-se na porção mineira da Cadeia do Espinhaço durante o Pleistoceno (Capítulo 3). Enquanto o hábito parece ter se mantido na linhagem, associado à ocupação de ambientes abertos, as características florais parecem ter variado de maneira estocástica ou em resposta à diversidade de polinizadores (Rapini, em revisão). Este clado está dividido em dois grupos, um deles inclui seis espécies e é caracterizado por sementes sem coma, enquanto o outro inclui 12 espécies e as sementes são comosas (Fig. 4).

A perda da coma nas sementes está associada a mudanças na morfologia do fruto e da semente, e também ao número reduzido de sementes por fruto, características que podem explicar a distribuição restrita das espécies. Todas as espécies deste clado são rupícolas e endêmicas de pequenas áreas na Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais: na Serra do Cipó (3 espécies), no Planalto de Diamantina (2) ou na Serra do Rola-Moça (1). Outra característica que agrupa as espécies deste clado é a posição axilar das inflorescências parciais, sendo que elas são subaxilares nas demais espécies de gênero.

O segundo clado do núcleo de *Minaria* é composto por espécies com folhas revolutas, sejam elas cordadas ou acerosas, e que ocorrem predominantemente em campos arenosos. Algumas relações entre essas espécies já haviam sido cogitadas (Fontella-Pereira, 1989; Rapini & al., 2001). As espécies de folhas cordadas formam um complexo de espécies de difícil diferenciação. Os três acessos de *Minaria cordata* (quatro, se também considerarmos *M. abortiva* uma variedade) aparecem dispersos nesse clado. Essa variação é tratada ora em uma mesma espécie (Fontella-Pereira, 1989; Konno, 2005; Farinaccio & Melo-Silva, 2004) ora em espécies distintas (Rapini & al., 2001; Konno & al., 2006; Rapini, 2010). Nossos resultados sugerem que estamos lidando com espécies crípticas (veja Capítulo 3), porém investigações mais detalhadas, utilizando métodos biosistemáticos, poderão esclarecer melhor as relações neste grupo. Apesar de rupícola, com hábito

semelhante àquele encontrado no clado com sementes sem coma, *M. refractifolia* emerge neste clado. Essa posição é corroborada pelas características do fruto, das sementes e pelas longas asas das anteras, indicando que as semelhanças vegetativas compartilhadas com as espécies com sementes sem coma são convergências resultantes do hábito rupícola.

***Distribuição da diversidade filogenética e implicações para a conservação.*** Este estudo contou com o levantamento das coleções de *Minaria* nos principais herbários nacionais e internacionais associado ao conhecimento das plantas no campo, o que permitiu delimitar a distribuição geográfica conhecida das espécies com acurácia. A triagem de marcadores moleculares e a análise morfológica detalhada possibilitaram a seleção dos caracteres mais informativos para este nível de análise e a aplicação de diferentes métodos de reconstrução filogenética garantiu que o máximo de informações fosse extraído deste conjunto de dados, produzindo uma árvore bastante realista. As análises de distribuição da diversidade filogenética tiveram como parâmetro o comprimento dos ramos e a falta de sustentação para algumas relações em *Minaria* não terá implicações importantes, pois essas incertezas estão confinadas a ramos curtos.

Foram detectados quatro centros de diversidade filogenética de *Minaria*: o sul da Cadeia do Espinhaço (SCE), a Serra do Cipó (SCi) e o Planalto de Diamantina (PDi), em Minas Gerais, e a região de Rio de Contas (RCo), no sudoeste da Chapada Diamantina, Bahia. O sul da Cadeia do Espinhaço destaca-se pela presença de *M. monocoronata*, espécie pertencente ao clado caracterizado por sementes sem coma e pela distribuição restrita de todas as espécies. Apesar do SCE apresentar apenas quatro espécies de *Minaria* e somente uma delas ser microendêmica, a região é historicamente a mais alterada e atualmente a mais ameaçada pelas mineradoras de ferro. Ainda assim, a área protegida na SCE é reduzida, destacando-se os Parques Estaduais Serra do Rola-Moça e do Itacolomi, bem como a Reserva Particular do Patrimônio Nacional Caraça, todos com forte ação antrópica.

Na porção baiana do Espinhaço, RCo se destaca em termos de diversidade filogenética pela presença de duas espécies microendêmicas proximamente relacionadas, '*Barjonia*' *harleyi* e '*Hemipogon*' *harleyi*, que juntas representam uma linhagem bastante antiga, mesmo que pouco diversa em número de espécies. As duas espécies divergiram entre si há ca. 2,5 Ma e representam remanescentes de uma linhagem antiga e que ficou



desde então reclusa ao bloco Norte da Cadeia do Espinhaço (Capítulo 3). O Parque Nacional Chapada Diamantina, a maior unidade de conservação da Cadeia do Espinhaço, e a Área de Proteção Ambiental da Serra do Barbado não englobam a distribuição dessas espécies, que estão, portanto, sujeitas a perturbações, colocando em risco uma linhagem que tem a mesma idade que o núcleo de *Minaria*, que inclui 17 espécies. Próximo ao município de Rio de Contas encontramos também uma área disjunta e relevante em endemismo filogenético localizada no município de Abaíra e, mais a nordeste, o município de Mucugê, que também se destaca neste sentido (Fig. 9)

A região central do Espinhaço de Minas Gerais, incluindo a SCi e o PDi, destaca-se como a mais rica em endemismos na porção mineira, não só de Asclepiadoideae (Rapini & al. 2001, 2002; Rapini 2010), mas também de vários outros grupos de angiospermas (Echternach & al., 2011). Ela abriga 13 espécies de *Minaria*, 10 delas microendêmicas. É a região mais relevante em termos de diversidade filogenética para o gênero, destacando-se o PDi, que apresenta os valores mais altos de diversidade e de endemismo filogenéticos. Lá são encontradas quase metade das espécies de *Minaria*, seis das quais exclusivas da região. Nessa mesma região, porém numa área disjunta, o Parque Estadual do Rio Preto se mostra relevante em endemismo filogenético, principalmente devido à microendêmica *M. campanuliflora*. A alta relevância filogenética do Planalto de Diamantina para *Minaria* parece estar associada à grande extensão dessa região com predomínio de afloramentos rochosos contínuos em altitudes elevadas, oferecendo à linhagem abrigos contra a seca e o fogo (Capítulo 3).

Existem dois Parques Nacionais na região central do Espinhaço de Minas Gerais, mas uma parcela importante de sua flora depende de unidades de conservação auxiliares. O PN Serra do Cipó abrange a distribuição de duas das quatro espécies de *Minaria* endêmicas da SCi, *M. polygaloides* e *M. semirii*; as outras duas, *M. hemipogonoides* e *M. magisteriana*, estão incluídas na RPPN Ermos Gerais, que abriga outras espécies de distribuição bastante restrita, como *Hemipogon abietoides* (Rapini & al., 2010b). A flora do PN Sempre Vivas (PDi), ainda é pouco conhecida e não conta com registros de *Minaria*. Das seis espécies endêmicas do PDi, *Minaria grazielae*, *M. inconspicua* e *M. refractifolia* encontram-se protegidas no PE Biribiri e *M. campanuliflora*, no PE Rio Preto. *Minaria bifurcata* é conhecida apenas pelo tipo e sua localização ainda é imprecisa, mas a

distribuição conhecida para *M. diamantinensis*, ao longo da estrada que liga Conselheiro Mata a Diamantina, encontra-se desprotegida e por ser de fácil acesso está bastante vulnerável a perturbações antrópicas.

Quando comparamos as medidas de frequência usualmente utilizadas para seleção de áreas prioritárias para conservação, como riqueza de espécies e de endemismos, a representatividade filogenética denotada pela idade da linhagem, pelo comprimento dos ramos e, de maneira mais grosseira, pela distinção taxonômica do grupo, é ignorada. O endemismo filogenético, por outro lado, avalia tanto a distribuição das espécies como suas relações com as demais espécies (Rosauer & al., 2009), apontando áreas que abrigam com exclusividade uma parcela importante da história evolutiva do grupo. A singularidade filogenética de uma região é determinada tanto pela presença dos representantes de uma linhagem antiga, como ocorre no Sudoeste da Chapada Diamantina, quanto pela presença de várias espécies com distribuição restrita de uma linhagem com distribuição ampla, como ocorre na Serra do Cipó e Planalto de Diamantina. Esses dois padrões não são discriminados pelos índices de diversidade filogenética e a compreensão do processo evolutivo que os produziu depende de estudos biogeográficos capazes de associar a idade dos eventos filogenéticos à história da região (para isso, veja Capítulo 3)

Na ausência de informações mais detalhadas, a riqueza de endemismos é um indicador inicial de áreas relevantes também em termos de diversidade filogenética. No caso de *Minaria*, ela evidencia o Planalto de Diamantina e a Serra do Cipó, que também apresentam valores altos de diversidade filogenética. Por outro lado, o endemismo filogenético da região de Rio de Contas, no Sudoeste da Chapada Diamantina, passaria despercebido, pois ele está concentrado apenas em duas espécies. Apesar da diversidade filogenética combinar parâmetros importantes para a seleção de áreas prioritárias (distribuição e relações filogenéticas), ela também deve ser combinada a outros parâmetros, como abundância (Cadotte & Davies, 2010) e especialização de habitats. O grau de ameaça de uma espécie também deve ser incorporado aos valores de importância da região no momento de se indicar áreas para conservação. *Minaria monocoronata*, por exemplo, é a única espécie endêmica do sul da Cadeia do Espinhaço, tendo sido encontrada exclusivamente em cangas, vegetação rupestre sobre solos ferruginosos. As cangas ocupam aproximadamente 100 km<sup>2</sup> e estão entre os ambientes mais ameaçados da Cadeia do

Espinhaço, sendo intensamente explorada por empresas mineradoras (Jacobi & al., 2007). Dessa maneira, *M. monocoronata* está entre as espécies mais ameaçadas da Cadeia do Espinhaço.

#### LITERATURA CITADA

- Álvarez, I. & Wendel, J. F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molec. Phylogenet. Evol.* 29: 417--434.
- Bailey, C.D., Carr, T.G., Harris, S.A. & Hughes, C.E. 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molec. Phylogenet. Evol.* 29: 435--455.
- 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). *Molec. Phylogenet. Evol.* 10: 449--463.
- Beardsley, P.M. & Olmstead, R.G. 2002. Redefining Phrymaceae: the placement of *Mimulus*, tribo Minuleae and *Phryma*. *Amer. J. Bot.* 89: 1093--1102.
- Bell, N.E. & Hyvönen, J. 2010. Phylogeny of the moss class Polytrichopsida (Bryophyta): generic-level structure and incongruent gene trees. *Molec. Phylogenet. Evol.* 55: 381--398.
- Cadotte, M.W. & Davies, T.J. 2010. Rarest of the rare: advances in combining evolutionary distinctiveness and scarcity to inform conservation at biogeography scale. *Diversity Distr.* 16: 376--385.
- Calonje, M., Martín-Bravo, S., Dobeš, C., Gong, W., Jordon-Thaden, I., Kiefer, C., Kiefer, M., Paule, J., Schmickl, R. & Koch, M.A. 2009. Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction. *Pl. Syst. Evol.* 282: 257--280.
- Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., van den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Seberg, O., Jørgensen, T., Cameron, K.M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T.A.J., Conrad, F., Salazar, G.A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M.L., Barraclough, T.G., Kelly, L. & Wilkinson, M. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56: 295--299.
- Conceição, A.A., Rapini, A., Pirani, J.R., Giulletti, A.M., Harley, R.M., Silva, T.R.S., Santos, A.K.A., Cosme, C., Andrade, I.M., Costa, J.A.S., Souza, L.R.S., Andrade,

- M.J.G., Funch, R.R., Freitas, T.A., Freitas A.M.M. & Oliveira. A.A.** 2005. Campos Rupestres. Pp. 153--180 in: Juncá, F.A., Funch L. & Rocha, W. (org.), *Biodiversidade e conservação da Chapada Diamantina*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.
- Costa, F.N. Trovó, M. & Sano, P.T.** 2008. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaça. *Megadiversidade* 4: 89--97.
- Crawford, D. & Mort, M.E.** 2004. Single-locus molecular markers for inferring relationships at lower taxonomic levels: observations and comments. *Taxon* 53: 631--635.
- Cunningham, C.W.** 1997. Can three incongruence tests predict when data should be combined? *Molec. Biol. Evol.* 14: 733--740.
- Demesure, B., Sodzi, N. & Petit, R.J.** 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molec. Ecol.* 4: 129--131.
- Donoghue, M.J.** 1994. Progress and prospects in reconstructing plant phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 81: 405--418.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. & Harbison, C.** 2003. Chloroplast-expressed glutamine synthetase in *Glycine* and related Leguminosae: phylogeny, gene duplication and ancient polyploidy. *Syst. Bot.* 28: 567--577.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L.** 1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. *Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.* 19: 11--15.
- Drábková, L.Z. & Vlček, C.** 2010. Molecular phylogeny of the genus *Luzula* DC. (Juncaceae, Monocotyledones) based on plastome and nuclear ribosomal regions: a case of incongruence, incomplete lineage sorting and hybridisation. *Molec. Phylogenet. Evol.* 57: 536--551
- Echternach, L., Trovó, M., Oliveira, C.T. & Pirani, J.R.** 2011. Areas of endemism in the Espinhaço Range in Minas Gerais, Brazil. *Flora* (doi:10.1016/j.flora.2011.04.003).
- Faith, D.P.** 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol. Conservation* 61: 1--10.
- Faith, D.P.** 2008. Phylogenetic diversity and conservation. Pp. 99--115 in: Carroll, S.P. & Fox, C.W. (eds.), *Conservation biology: evolution in action*. New York: Oxford University Press.

- Farinaccio, M.A. & Mello-Silva, R.** 2004. Asclepiadoideae (Apocynaceae) do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 22: 53--92.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. & Bult, C.** 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315--319.
- Felsenstein, J.** 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* 27: 401--410.
- Fontella-Pereira, J.** 1989. Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras, XXIII. Considerações sobre *Ditassa parva* (A. Silv.) Font. e espécies correlatas. *Eugeniana* 16: 19--27.
- Forest, F., Grenier, R., Rouget, M., Davies, T.J., Cowling, R.M., Faith, D.P., Balmford, A., Manning, J.C., Proches, S., van der Bank, M., Reeves, G., Hedderson, T.A. & Savolainen, V.** 2007. Preserving the evolutionary potential of floras in biodiversity hotspots. *Nature* 445: 757--760.
- Forzza, R.C., Baumgratz, J.F.A., Bicudo, C.E.M. Canhos, D.A.L., Carvalho Jr., A.A., Costa, A., Costa, D.P., Hopkins, M., Leitman, P.M., Lohmann, L.G., Lughadha, E.N., Maia, L. C., Martinelli, G., Menezes, M., Morim, M.P., Coelho, M. A. N., Peixoto, A.L., Pirani, J.R., Prado, J., Queiroz, L.P., Souza, S., Souza, V.C., Stehmann, J.R., Sylvestre, L.S., Walter, B.M.T. & Zappi, D.** 2010. Introdução: síntese da diversidade brasileira. Pp. 21--42 in: Forzza, R.C., Leitman, P.M., Costa, A.F., Carvalho Jr., A.A., Peixoto, A.L., Walter, B.M.T., Bicudo, C., Zappi, D., Costa, D.P., Lleras, E., Martinelli, G., Lima, H.C., Prado, J., Stehmann, J.R., Baumgratz, J.F.A., Pirani, J.R., Sylvestre, L., Maia, L.C., Lohmann, L.G., Queiroz, L.P., Silveira, M., Coelho, M.N., Mamede, M.C., Bastos, M.N.C., Morim, M.P., Barbosa, M.R., Menezes, M., Hopkins, M., Secco, R., Cavalcanti, T.B. & Souza, V.C. (orgs.), *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Freeland, J.R.** 2005. *Molecular Ecology*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Gatesy, J., DeSalle, R. & Wahlberg, N.** 2007. How many genes should a sistematist sample? Conflicting insights from a phylogenomic matrix characterized by replicate incongruence. *Syst. Biol.* 56: 355--363.

- Gielly, L. & Taberlet, P.** 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences. *Molec. Biol. Evol.* 11: 769--777.
- Giulietti, A.M., Menezes, N.L., Pirani, J.R., Meguro, M. & Wanderley, M.G.L.** 1987. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e lista de espécies. *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 9: 1--152.
- Giulietti, A.M., Pirani, J.R. & Harley, R.M.** 1997. Espinhaço range region. Eastern Brazil. Pp. 397--404 in: Davis, S.D., Heywood, V.H., Herrera-MacBryde, O., Villalobos J. & Hamilton A.C. (eds.), *Centres of plant diversity. A guide and strategies for the conservation*, vol. 3, *The Americas*. Cambridge: WWF/IUCN.
- Giulietti, A.M., Rapini, A., Andrade, M.J.G., Queiroz L.P. & Silva J.M.C.** (eds.) 2009. *Catálogo de espécies raras de plantas do Brasil*. Belo Horizonte: Conservação Internacional do Brasil.
- Hall, T.A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95--98.
- Hamilton, M.B.** 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molec. Ecol.* 8: 521-523.
- Hipp, A.L., Hall, J.C. & Systema, K.J.** 2004. Congruence versus phylogenetic accuracy: revisiting the incongruence length difference test. *Syst. Biol.* 53: 81--89.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F.** 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754--755.
- Huson, D. H. & Bryant, D.** 2006. Application of phylogenetic network in evolutionary studies. *Molec. Biol. Evol.* 23: 254--267.
- Jacobi, C.M., Carmo, R.C., Vincent, R.C. & Stehmann, J.R.** 2007. Plant communities on ironstone outcrops – a diverse and endangered Brazilian ecosystem. *Biodiv. Conserv.* 16: 2185--2200.
- Knoop, V.** 2004. The mitochondrial DNA of land plants: peculiarities in phylogenetic perspective. *Current Genet.* 46: 123--139.
- Knowles, L.L.** 2009. Estimating species tree: methods of phylogenetic analysis when there is incongruence across genes. *Syst. Biol.* 58: 463--467.
- Konno, T.U.P.** 2005. *Ditassa R.Br. no Brasil (Asclepiadoideae, Apocynaceae) e revisão taxonômica de Minaria T.U.P.Konno & Rapini*. Ph.D. Thesis, Universidade de São

Paulo, São Paulo.

- Konno, T.U.P., Rapini, A., Goyder, D.J. & Chase, M.W.** 2006. The new genus *Minaria* (Asclepiadoideae, Apocynaceae). *Taxon* 55: 421--430.
- Krings, A., Thomas, D.T. & Xiang Q.-Y.** 2008. On the generic circumscription of *Gonolobus* (Apocynaceae, Asclepiadoideae): evidence from molecules and morphology. *Syst. Bot.* 33: 402--415.
- Laffan, S.W. & Crisp, M.D.** 2003. Assessing endemism at multiple spatial scales, with an example from the Australian vascular flora. *J. Biogeogr.* 30: 511--520.
- Laffan, S.W., Lubarsky, E. & Rosauer, D.F.** 2010. Biodiverse, a tool for the spatial analysis of biological and related diversity. *Ecography* 33: 643--647.
- Levin, R.A. & Miller, J.S.** 2005. Relationships within tribe Lycieae (Solanaceae): paraphyly of *Lycium* and multiple origins of gender dimorphism. *Amer. J. Bot.* 92: 2044--2053.
- Levin, R.A., Whelan A. & Miller J.S.** 2009. The utility of nuclear conserved ortholog set II (COSII) genomic regions for species-level phylogenetic inference in *Lycium* (Solanaceae). *Molec. Phylogenet. Evol.* 53: 881--890.
- Li, M., Wunder, J., Bissoli, G., Scarponi, E., Gazzani, S., Barbaro, E., Saedler, H. & Varotto, C.** 2008. Development of COS genes as universally amplifiable markers for phylogenetic reconstructions of closely related plant species. *Cladistics* 24: 727--745.
- Liede, S. & Täuber, A.** 2000. *Sarcostemma* R. Br. (Apocynaceae - Asclepiadoideae). A controversial generic circumscription reconsidered: evidence from *trnL-trnF* spacers. *Pl. Syst. Evol.* 225: 133--140.
- Liede-Schumann, S., Rapini, A., Goyder, D.J. & Chase, M.W.** 2005. Phylogenetics of the New World subtribes of Asclepiadeae (Apocynaceae - Asclepiadoideae): Metastelmatinae, Oxypetalinae, and Gonolobinae. *Syst. Bot.* 30: 183--194.
- Linder, C.R., Goertzen, L.R., Heuvel, B.V., Francisco-Ortega, J. & Jansen, R.K.** 2000. The complete external transcribed spacer of 18S-26S rDNA: amplification and phylogenetic utility at low taxonomic levels in Asteraceae and closely allied families. *Molec. Phylogenet. Evol.* 14: 285--303.
- Logacheva, M.D., Valiejo-Roman, C.M., Degtjareva, G.V., Stratton, J.M., Downiec, S.R., Samigullin, T.H. & Pimenov, M.G.** 2010. A comparison of nrDNA ITS and ETS

- loci for phylogenetic inference in the Umbelliferae: an example from tribe Tordylieae. *Molec. Phylogenet. Evol.* 57: 471--476.
- Maddison, W.P.** 1997. Gene trees in species trees. *Syst. Biol.* 46: 523--536.
- Maddison, W.P. & Maddison, D. R.** 2007. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis, version 2.71. <http://mesquiteproject.org>.
- Mason-Gamer, R.J., Weil, C.F. & Kellogg, E.A.** 1998. Granule-bound starch synthase: structure, function and phylogenetic utility. *Molec. Biol. Evol.* 15: 1658--1673.
- McGoogan, K., Kivell, T., Hutchinson, M., Young, H., Blanchard, S. Keeth, M. & Lehman, M.** 2007. Phylogenetic diversity and the conservation biogeography of African primates. *J. Biogeogr.* 34: 1962--1974.
- Meve, U. & Liede, S.** 2001. Inclusion of *Tenaris* and *Macropetalum* in *Brachystelma* (Apocynaceae - Asclepiadoideae - Ceropegieae) inferred from non-coding nuclear and chloroplast DNA sequences. *Pl. Syst. Evol.* 228: 89--105.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W. & Schwartz T.** 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Pp. 1--8 in: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. New Orleans: Institute of Electrical and Electronics Engineers.
- Mitsui, Y., Chen, S., Zhou, Z., Peng, C., Deng, Y. & Setogushi, H.** 2008. Phylogeny and biogeography of the genus *Ainsliaea* (Asteraceae) in the Sino-Japanese Region based on nuclear rDNA and plastid DNA sequence data. *Ann. Bot. (Oxford)* 101: 111--124.
- Mooers, A.O., Heard, S.B. & Chrostowski, E.** 2005. Evolutionary heritage as a metric for conservation. Pp. 120--138 in: Purvis, A., Gittleman, J.L. & Brooks, T. (eds.), *Phylogeny and Conservation*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Mort, M.E. & Crawford, D.J.** 2004. The continuing search: low copy nuclear sequences for lower-level plant molecular phylogenetic studies. *Taxon* 53: 257--261.
- Mort, M.E., Archibald J.K., Randle, C.P., Levens, N.D., O'Leary, T.R., Topalov, K., Wiegand, C.M. & Crawford, D.J.** 2007. Inferring phylogeny at low taxonomic levels: utility of rapidly evolving cpDNA and nuclear ITS loci. *Amer. J. Bot.* 94: 173--183.
- Nylander, J.A.** 2008. *MrModeltest v. 2. Program distributed by the author*. Uppsala: Evolutionary Biology Centre.
- O'Brien, S.J.** 1994. Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. *Annual Rev.*



- Genet.* 28: 467--489.
- O'Donnell, K.** 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Curr. Genetics* 22: 213--220.
- Oh, S.H. & Potter, D.** 2005. Molecular phylogenetic systematics and biogeography of tribe *Neillieae* (Rosaceae) using DNA sequences of cpDNA, rDNA, and LEAFY. *Amer. J. Bot.* 92: 179--192.
- Oxelman, B., Liden, M. & Berglund, D.** 1997. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Pl. Syst. Evol.* 206: 393--410.
- Pelser, P.B., Kennedy, A.H., Tepe, J.E., Schidler, J.B., Nordenstam, B., Kaldereit, J.W. & Watson, L.E.** 2010. Patterns and causes of incongruence between plastid and nuclear Senecioneae (Asteraceae) phylogenies. *Amer. J. Bot.* 97: 856--873.
- Peralta, I.E. & Spooner, D.M.** 2001. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *Amer. J. Bot.* 88: 1888--1902.
- Rambaut, A.** 2009. *Tree Figure Drawing Tool, Version 1.3.1*. Edinburgh: Institute of Evolutionary Biology.
- Rapini, A.** 2010. Revisitando as Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço. *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 28: 97--123.
- Rapini, A., Berg, C. & Liede-Schumann, S.** 2007. Diversification of Asclepiadoideae (Apocynaceae) in the New World. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 94: 407--422.
- Rapini, A., Chase, M.W., Goyder, D.J. & Griffiths, J.** 2003. Asclepiadeae classification: evaluating the phylogenetic relationships of New World Asclepiadoideae (Apocynaceae). *Taxon* 52: 33--50.
- Rapini, A., Chase, M.W. & Konno, T.U.P.** 2006. Phylogenetics of South American Asclepiadeae (Apocynaceae). *Taxon* 55: 119--124.
- Rapini, A., Koch, I., Kinoshita, L.S., Simões, A.O. & Spina, A.P.** 2010a. Apocynaceae. Pp. 617--644 in: Forzza, R.C., Leitman, P.M., Costa, A.F., Carvalho Jr., A.A., Peixoto, A.L., Walter, B.M.T., Bicudo, C., Zappi, D., Costa, D.P., Lleras, E., Martinelli, G., Lima, H.C., Prado, J., Stehmann, J.R., Baumgratz, J.F.A., Pirani, J.R., Sylvestre, L., Maia, L.C., Lohmann, L.G., Queiroz, L.P., Silveira, M., Coelho, M.N., Mamede, M.C.,

- Bastos, M.N.C., Morim, M.P., Barbosa, M.R., Menezes, M., Hopkins, M., Secco, R., Cavalcanti, T.B. & Souza, V.C. (orgs.), *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Rapini, A., Mello-Silva, R. & Kawasaki, M.L.** 2001. Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brasil. *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 19: 55--169.
- Rapini, A., Mello-Silva, R. & Kawasaki, M.L.** 2002. Richness and endemism in Asclepiadoideae (Apocynaceae) from the Espinhaço Range of Minas Gerais, Brazil – a conservationist view. *Biodiv. Conserv.* 11: 1733--1746.
- Rapini, A., Ribeiro, P.L., Lambert, S. & Pirani, J.R.** 2008. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4: 16--24.
- Rapini, A., Ribeiro, P.L., Silva, U.C.S.** 2010b. *Hemipogon abietoides*. Apocynaceae-Asclepiadoideae. *Curtis's Bot. Mag.* 27: 23--35.
- Rapini, A., Souza-Silva, R.F. & Sampaio, L.N.P.** 2009. Apocynaceae. Pp. 54--64 in: Giuletta, A.M., Rapini, A., Andrade, M.J.G., Queiroz, L.P. & Silva, J.M.C. (eds.), *Catálogo de espécies raras de plantas do Brasil*. Belo Horizonte: Conservação Internacional do Brasil.
- Robba, L., Russel, S.J., Barker, G.L. & Brodie, J.** 2006. Assessing the use of the mitochondrial Cox1 marker for use in DNA barcoding of the red algae (Rhodophyta). *Amer. J. Bot.* 93:1101--8.
- Rokas, A., Williams, B.L., King, N. & Carroll, S.B.** 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 425: 789--804.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P.** 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572--1574.
- Rosauer, D., Laffan, S.W., Crisp, M.D., Donnellan, C. & Cook, L.G.** 2009. Phylogenetic endemism: a new approach for identifying geographical concentrations of evolutionary history. *Molec. Ecol.* 18: 4061--4072.
- Sang, T., Crawford, D.J. & Stuessy, T.F.** 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Amer. J. Bot.* 84: 1120--1136.
- Scheffer, S.J., Lewis, M.L. & Joshi, R.C.** 2006. DNA barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: Agromyzidae) in the Philippines. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99: 204--210.

- Scotland, R.W., Olmstead, R.G. & Bennett, J.R.** 2003. Phylogeny reconstruction: the role of morphology. *Syst. Biol.* 52: 539--548.
- Sechrest, W., Brooks, T.M., Fonseca, G.A.B., Konstant, W.R., Mittermeier, R.A., Purvis, A., Rylands, A.B. & Gittleman, J.L.** 2002. Hotspots and the conservation of evolutionary history. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 2067--2071.
- Shaw J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C, Winder, C.T., Schilling, E.E. & Small, R.S.** 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Amer. J. Bot.* 92: 142--166.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E. & Small, R.S.** 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *Amer. J. Bot.* 94: 275--288.
- Shimodaira, H. & Hasegawa, M.** 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inferences. *Molec. Biol. Evol.* 17: 1114--1116.
- Silva, U.C.S.** 2009. *Estudos filogenéticos moleculares em Metastelmatinae (Asclepiadoideae, Apocynaceae)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- Small, R.L., Ryburn, J.A.; Cronn, R.C., Seelaman, T. & Wendel, J.F.** 1998. The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for phylogeny reconstruction in recentlydiverged plant group. *Amer. J. Bot.* 85: 1301--1315.
- Staden, R., Judge, D.P. & Bonfield, J.K.** 2003. *Analysing sequences using the Staden Package and EMBOSS. Introduction to bioinformatics. A theoretical and practical approach.* Totawa: Human Press Inc.
- Stamatakis, A.** 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688--2690.
- Stamatakis, A., Hoover, P., & Rougemont, J.** 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Syst. Biol.* 57: 758--771.
- Sun, Y., Skinner, D.Z., Liang, G.H. & Hulbert, S.H.** 1994. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theor. Appl. Genet.* 89: 26--32.

- Swofford, D.L.** 2000. *PAUP\* 4.1: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods)*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J.** 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Pl. Molec. Biol.* 17: 1105--1109.
- Thiv, M. & Meve, U.** 2007. A phylogenetic study of *Echidnopsis* Hook. f. (Apocynaceae - Asclepiadoideae) -- taxonomic implications and the colonization of the Socotran archipelago. *Pl. Syst. Evol.* 265: 71-86.
- Van der Niet, T. & Linder, H.P.** 2008. Dealing with incongruence in the quest for species tree: a case study from the orchid genus *Satyrium*. *Molec. Phylogenet. Evol.* 47: 154--174.
- Vane-Wright, R.I., Humphries, C.J. & Williams, P.H.** 1991. What to protect? – Systematics and the agony of choice. *Biol. Conservation* 55: 235--254.
- Wanntorp, L., Kocyan, A. & Renner, S.S.** 2006. Wax plants disentangled: A phylogeny of *Hoya* (Marsdenieae, Apocynaceae) inferred from nuclear and chloroplast DNA sequences. *Molec. Phylogenet. Evol.* 39: 722--733.
- Whitall, J.B., Medina-Marino A., Zimmer, E.A. & Hodges, S.A.** 2006. Generating single-copy nuclear gene data for a recent adaptive radiation. *Molec. Phylogenet. Evol.* 39: 124--134.
- 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.A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J. & White, T.J. (ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press.
- Wiens J.J.** 2004. The role of morphological data in phylogeny reconstruction. *Syst. Biol.* 53: 653--661.
- Williams, P.H., Humphries, C.J. & Vane-Wright, R.I.** 1991. Measuring biodiversity: taxonomy relatedness for conservation priorities. *Austral. Syst. Bot.* 4: 665--679.
- Willyard, A., Cron, R. & Liston, A.** 2009. Reticulate evolution and incomplete lineage sorting among the ponderosa pines. *Molec. Phylogenet. Evol.* 52: 498--511.
- Winckworth, R.C. & Donoghue, M.J.** 2004. Viburnum phylogeny: evidence from duplicated nuclear gene GBSSI. *Molec. Phylogenet. Evol.* 33: 109--126.

- Wolfe, K.H., Li, W.H. & Sharp, P.M.** 1987. Rates of substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9054--9058.
- Wu, F., Mueller, L.A., Crouzillat, D., Petiard, V. & Tanksley, S.D.** 2006. Combining bioinformatics and phylogenetics to identify large sets of single copy, orthologous genes (COS II) for comparative, evolutionary and systematics studies: a test case in the euasterid plant clade. *Genetics* 174: 1407--1420.

**Anexo 1.** Vouchers utilizados em cada região plastidial (*psbA-trnH*, *trnS-trnG*, *rps16*, and *trnD-trnT*) e regiões nucleares (ITS and ETS).

Espécie	Voucher					
	<i>psbA-trnH</i>	<i>trnS-G</i>	<i>rps16</i>	<i>trnD-T</i>	ITS	ETS
<i>Barjonia chloraeifolia</i> Decne.	Rapini 1059	Rapini 485	Rapini485	Rapini 1059	Rapini 1395	Rapini 1395
<i>Barjonia cymosa</i> E.Fourn.	-	Rapini 1878	Rapini 1878	-	Rapini 1878	Rapini 1878
<i>Barjonia erecta</i> (Vell.) K.Schum.	Rapini 1733	Rapini 1733	Rapini 1733	Rapini 1733	Rapini 1733	Rapini 1733
' <i>Barjonia</i> ' <i>harleyi</i> Fontella	Rapini 1354	Rapini 1354	Rapini 1354	Rapini 1354	Rapini 1354	Rapini 1354
<i>Blepharodon ampliflorum</i> E.Fourn.	Rapini 1611	Rapini 1611	Rapini 1611	Rapini 1611	Rapini 706	Rapini 1611
<i>Blepharodon pictum</i> (Vahl) D.W.Stevens	Queiroz 9196	Queiroz 9196	Queiroz 9196	Queiroz 9196	Queiroz 9196	Queiroz 9196
<i>Ditassa banksii</i> R.Br. ex Schult.	-	DQ 026756	AJ 704473	Konno 754	Konno 754	Konno 754
<i>Ditassa burchellii</i> Hook & Arn.	-	DQ 026757	AJ 699293	Kaprovickas 41170	Kaprovickas 41170	Kaprovickas 41170
<i>Ditassa capillaris</i> E. Fourn.	Rapini 1508	Rapini 1508	Rapini 1508	Rapini 1508	Rapini 1508	Rapini 1508
<i>Ditassa fasciculata</i> E.Fourn.	Rapini 1303	Rapini 1303	Rapini 1303	Rapini 1303	Rapini 1303	Rapini 1303
<i>Ditassa hispida</i> (Vell.) Fontella	-	DQ 026762	AJ 704477	Rapini 1431	Rapini 1431	Rapini 1243
<i>Hemipogon abietoides</i> E.Fourn.	Ribeiro 283	Ribeiro 283	Ribeiro 283	Ribeiro 283	Ribeiro 283	-
<i>Hemipogon acerosus</i> Decne.	Rapini 1875	Wood. & Goyder 15689	Wood. & Goyder 15689	Wood. & Goyder 15689	Rapini 1875	Rapini 1875
<i>Hemipogon carassensis</i> (Malme) Rapini	Rapini 1364	Rapini 1364	Rapini 1364	Rapini 1364	Rapini 1364	-
' <i>Hemipogon</i> ' <i>harleyi</i> Fontella	Rapini 1410	Rapini 1410	Rapini 1410	-	Rapini 1410	Rapini 1410
<i>Hemipogon hatschbachii</i>	Ribeiro 268	Ribeiro 268	Ribeiro 268	-	Ribeiro 268	-

(Fontella & Marquete) Rapini						
<i>Hemipogon hemipogonoides</i>	Rapini 1373	Rapini 1373	Rapini 1373	Rapini 1373	Rapini 1373	-
(Malme) Rapini						
<i>Hemipogon luteus</i> E.Fourn.	-	DQ 026769	AJ 704489	-	Rapini 1384	-
<i>Hemipogon sprucei</i> E.Fourn.	Silva 106	Silva 106	AJ 704296	Silva 106	Silva 106	-
<i>Minaria abortiva</i> (E. Fourn.)	Ribeiro 300	Ribeiro 300	Ribeiro 300	-	Ribeiro 300	Ribeiro 300
Rapini						
<i>Minaria acerosa</i> (Mart.)	Ribeiro 183	-	Ribeiro 183	Ribeiro 183	Rapini 383	Ribeiro 183
T.U.P.Konno & Rapini						
<i>Minaria campanuliflora</i> Rapini	Azevedo 339	Azevedo 339	Azevedo 339	Azevedo 339	Azevedo 339	Azevedo 339
<i>Minaria cordata</i> (Turcz.)	Ribeiro 341	-	Ribeiro 341	-	Ribeiro 341	Ribeiro 341
T.U.P.Konno & Rapini (BA)						
<i>Minaria cordata</i> (Turcz.)	Ribeiro 398	Ribeiro 398	Ribeiro 398	-	-	Ribeiro 398
T.U.P.Konno & Rapini (GO)						
<i>Minaria cordata</i> var. <i>virgata</i> (VIR)	Ribeiro 113	-	Ribeiro 113	Ribeiro 113	Ribeiro 113	Ribeiro 113
<i>Minaria decussata</i> (Mart.) T.U.P.	Ribeiro 216	DQ 026758	AJ 704217	Ribeiro 216	Ribeiro 216	Ribeiro 216
Konno & Rapini						
<i>Minaria diamantinensis</i> (Fontella)	Ribeiro 218	Ribeiro 218	Ribeiro 218	-	Rapini 810	Ribeiro 218
T.U.P.Konno & Rapini						
<i>Minaria ditassoides</i> (Silveira)	Ribeiro 180	DQ 026759	AJ 704476	Ribeiro 180	Rapini 379	Ribeiro 180
T.U.P.Konno & Rapini						
<i>Minaria grazielae</i> (Fontella & Marquete) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 221	DQ 026760	AJ 699339	Ribeiro 221	Ribeiro 221	Ribeiro 221

<i>Minaria hemipogonoides</i> (E. Fourn.) T.U.P.Konno & Rapini	Rapini 1770	Rapini 1770	Rapini 1770	-	Rapini 1770	Rapini 1770
<i>Minaria louteigiae</i> (Fontella) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 197	-	Ribeiro 197	Ribeiro 197	Ribeiro 197	Ribeiro 197
<i>Minaria magisteriana</i> (Rapini) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 200	DQ 026763	AJ 704482	Ribeiro 200	Ribeiro 200	Ribeiro 200
<i>Minaria micromeria</i> (Decne.) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 186	Ribeiro 186	AJ 704225	Ribeiro 186	Ribeiro 186	Ribeiro 186
<i>Minaria parva</i> (Silveira) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 188	-	Ribeiro 188	-	Ribeiro 188	Ribeiro 188
<i>Minaria polygaloides</i> (Silveira) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 263	Ribeiro 263	Ribeiro 263	Ribeiro 263	Ribeiro 263	Ribeiro 263
<i>Minaria refractifolia</i> (K.Schum.) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 225	Ribeiro 225	Ribeiro 225	Ribeiro 225	Ribeiro 225	Ribeiro 225
<i>Minaria semirii</i> (Fontella) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 336	Ribeiro 336	Ribeiro 336	Ribeiro 336	Ribeiro 336	Ribeiro 336
<i>Nephradenia acerosa</i> Decne.	Silva 118	DQ 026775	AJ 704496	Silva 118	Silva 118	Silva 118
<i>Nephradenia asparagoides</i> (Decne.) E.Fourn.	Silva 1	Silva 1	Silva 1	Silva 1	Silva 1	Silva 1
<i>Nephradenia filipes</i> Malme	Silva 110	Silva 110	Silva 110	Silva 110	Silva 110	Silva 110
<i>Petalostelma martianum</i> E. Fourn.	Silva 127	Silva 127	Silva 127	Silva 127	Silva 127	-



**Anexo 2.** Lista de caracteres morfológicos e seus estados.

1. *Orientação dos ramos:* **(0)** volúveis; **(1)** não volúveis [incluindo eretos ou decumbentes].
2. *Indumento nos ramos:* **(0)** ausente; **(1)** indumento em faixas; **(2)** indumentado por toda a superfície.
3. *Filotaxia:* **(0)** oposta; **(1)** verticilada.
4. *Comprimento do pecíolo:* **(0)** sésseis e subsésseis 0-2 mm; **(1)** pecioladas 2-10 mm; **(2)** longo pecioladas >10 mm.
5. *Presença de coleteres na base da lâmina foliar:* **(0)** ausente; **(1)** presente.
6. *Orientação da lâmina foliar em relação ao eixo dos ramos:* **(0)** patente; **(1)** oblíqua ascendente a ereta; **(2)** oblíqua descendente a reflexa.
7. *Orientação da lâmina foliar em relação à nervura principal:* **(0)** plana; **(1)** abaxialmente conduplicada; **(2)** adaxialmente conduplicada; **(3)** dorsalmente falcada.
8. *Relação comprimento/largura da lâmina foliar:* **(0)**  $\leq 3:1$ ; **(1)** 4:1 - 5:1; **(2)**  $\geq 6:1$ .
9. *Base da lâmina foliar:* **(0)** hastada, sagitada ou truncada; **(1)** arredondada, obtusa ou cuneada; **(2)** subcordada.
10. *Margem da lâmina foliar:* **(0)** plana ou não revoluta; **(1)** revoluta sem distinção entre leve ou fortemente revoluta.
11. *Indumento na lâmina foliar:* **(0)** ausente; **(1)** presente.
12. *Posição das inflorescências parciais:* **(0)** subaxilar; **(1)** axilar.
13. *Indumento no pedúnculo:* **(0)** ausente; **(1)** indumentado em faixas unilateral ou bilateral; **(2)** indumentado por toda a superfície.
14. *Indumento nas brácteas florais:* **(0)** ausente; **(1)** indumentada.
15. *Indumento no pedicelo:* **(0)** ausente; **(1)** indumentado em faixas; **(2)** indumentado por sobre toda superfície.
16. *Forma da corola:* **(0)** campanulada a subcampanulada; **(1)** rotácea a subrotácea; **(2)** urceolada. [ou globosa]
17. *Comprimento do tubo da corola:* **(0)** até 1 mm; **(1)**  $>1 \leq 3$  mm; **(2)**  $> 4$  mm.
18. *Indumento na face abaxial da corola:* **(0)** ausente; **(1)** presente.
19. *Indumento na face adaxial da corola:* **(0)** constituído por papilas e tricomas [Ou

- somente tricomas]; **(1)** constituído somente por papilas; **(2)** glabra.
20. *Corona*: **(0)** simples; **(1)** composta; **(2)** ausente.
  21. *Conação dos segmentos externos*: **(0)** livres entre si; **(1)** conados ao menos na base.
  22. *Adnação dos segmentos internos*: **(0)** livre dos externos; **(1)** adnatos aos externos.
  23. *Comprimento das asas das anteras em relação ao dorso*: **(0)** mais longas que o dorso das anteras; **(1)** tão longas quanto o dorso das anteras ou mais curtas.
  24. *Ápice do ginostégio*: **(0)** protuberante; **(1)** subplano a plano.
  25. *Relação compr:largura do retináculo* : **(0)** mais de 2x mais longo que largo; **(1)** entre 1,5 a 2x mais longo que largo; **(2)** tão longo quanto largo.
  26. *Orientação do eixo horizontal das caudículas em relação ao eixo vertical do corpúsculo*: **(0)** horizontal ou oblíqua; **(1)** curva ou sinuosa.
  27. *Comprimento dos polínios*: **(0)** até 0,3 mm; **(1)** 0,3 - 0,5 mm; **(2)** >0,5 e < 1 mm; **(3)** > 1 mm.
  28. *Inserção dos polínios às caudículas*: **(0)** lateral; **(1)** apical.
  29. *Ápice dos folículos*: **(0)** prolongado; **(1)** não prolongado.
  30. *Indumento dos folículos*: **(0)** ausente; **(1)** presente.
  31. *Margem da semente*: **(0)** irregularmente denteada; **(1)** inteira.
  32. *Coma na semente*: **(0)** presente; **(1)** ausente.
  33. *Forma do folículo*: **(0)** cilíndrico; **(1)** achatado unilateralmente.
  34. *Número de sementes por fruto*: **(0)** 3 a muitos; **(1)** 1 ou 2.

**Anexo 3.** Matriz incluindo os 34 caracteres morfológicos e os 41 táxons de Metastelmatinae.

<i>Barjonia chloraeifolia</i>	1000000020001010100111000020000000
<i>Barjonia cymosa</i>	1000100020000101100101001010000000
<i>Barjonia erecta</i>	10001002000-010010000-000010000000
<i>Barjonia harleyi</i>	1000010021000001100101000001000000
<i>Blepharodon ampliflorum</i>	0002120200000002202101010120000000
<i>Blepharodon pictum</i>	0002100010000001200101011110000000
<i>Ditassa banksii</i>	0101000010001010001100011000000000
<i>Ditassa burchellii</i>	0101100010101121010110001000000000
<i>Ditassa capillaris</i>	0101010211100001000101001001010000
<i>Ditassa fasciculata</i>	0100010010001111000100001000000000
<i>Ditassa hispida</i>	0201000010100100000100001000010000
<i>Hemipogon abietoides</i>	100001021010000200000-10011100?000
<i>Hemipogon acerosus</i>	111001021000-0100012--001010100000
<i>Hemipogon carassensis</i>	00010202101000021002--00101100?000
<i>Hemipogon harleyi</i>	000002021000000210000-100101??????
<i>Hemipogon hatschbachii</i>	100001021000000210000-01011000?000
<i>Hemipogon hemipogonoides</i>	100001021010000000000-102101000000
<i>Hemipogon luteus</i>	00000022100000022002--000120000000
<i>Hemipogon sprucei</i>	110001021000111210101-001111000000
<i>Minaria abortiva</i>	1200010021102120010100001101010000
<i>Minaria acerosa</i>	1210100211102120010101000101010000
<i>Minaria bifurcata</i>	120010001011212001011100000011111?
<i>Minaria campanuliflora</i>	120001002110212011200-101101010000
<i>Minaria cordata</i>	1200110021102120010100100101010000
<i>Minaria cordata virgata</i>	1200110021102120110100100101010000
<i>Minaria cordataGO</i>	1200110021102120110100100101010000
<i>Minaria decussata</i>	1200101021102120011100110001010000
<i>Minaria diamantinensis</i>	1200000211102120010100000101010000
<i>Minaria ditassoides</i>	1200110021102120010101100001010000
<i>Minaria grazielae</i>	12011220201120220002--001000111111
<i>Minaria hemipogonoides</i>	1210003110112020000101002000111111
<i>Minaria inconspicua</i>	110001021010-00010010100100000?000
<i>Minaria lourteigiae</i>	1200110021102120010101000000010000
<i>Minaria magisteriana</i>	1200003210010000000101001000101111
<i>Minaria micromeria</i>	1200100011102120001110011101010000
<i>Minaria monocoronata</i>	1200?0001000000000001-00000011?1??
<i>Minaria parva</i>	1200010221102120000100100101010000
<i>Minaria polygaloides</i>	120001321000-0001001010010000000000
<i>Minaria refractifolia</i>	1200020110102120000101001100010000
<i>Minaria semirii</i>	12010200211121200002--001000111111
<i>Nephradenia acerosa</i>	100011020010000020000-001111000010
<i>Nephradenia asparagoides</i>	000111010100000000000-001010000000
<i>Nephradenia filipes</i>	100111020000000110000-0011100?000
<i>Petalostelma martianum</i>	000110001000000110000-011000001000

## **Capítulo 2**

**Do model-based phylogenetic analyses perform better than parsimony? A response illustrated with *Minaria* (Apocynaceae) phylogenetics**

# **Do model-based phylogenetic analyses perform better than parsimony? A response illustrated with *Minaria* (Apocynaceae) phylogenetics**

## **Abstract**

A recent survey on empirical phylogenetic studies based on molecular data suggested that most results produced by parsimony and model-based analyses are not incongruent. Based on this data, the authors concluded that the application of more than one phylogenetic method is redundant. In the work presented here, we used an empirical study to compare the most commonly used phylogenetic methods, namely Maximum Parsimony, Maximum likelihood, and Bayesian Inference. We show that the three methods have different performances, especially when the datasets are thin, and argue that the pluralistic analytical approach used in most phylogenetic studies can provide valuable, rather than redundant, information.

\* Manuscrito submetido à revista *Cladistics* em julho de 2011.

Maximum Parsimony (MP) and Maximum Likelihood (ML) can be considered variations of the same method to recover phylogenetic relationships using optimality criteria; they differ basically by the degree of parameterization (Tuffley and Steel, 1997; Steel and Penny, 2000; Goloboff, 2003). Based on the congruence of characters, MP seeks trees that require the least number of postulated evolutionary steps (Camin and Sokal, 1965). The method has a great philosophical appeal because its simplicity provides higher explanatory power to the analysis (e.g., Farris, 1983; Kluge, 1997, 2001; Siddal, 2002; Kluge & Grant, 2006). ML is a model-based method that seeks the tree that confers the highest probability to the observed data under the specified model (Felsenstein 1973; Sober, 2001). When the evolutionary model applied is the same that generated the phylogeny, the ML tree reconstruction is supposed to recover the true phylogeny (Swofford et al., 2001). Therefore, the validity of this method strongly depends on the correctness of the model applied (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967; Huelsenbeck and Crandall, 1997). Unfortunately, we can only use approximations of the true model in empirical studies and strong violations of the model assumptions can mislead ML inferences (Steel 2005).

MP was initially suggested as an approximation of ML (Edwards and Cavalli-Sforza, 1963; Cavalli-Sforza and Edwards, 1967) and, under low and constant rates of evolution among lineages, when the convergences are few, they actually produce similar topologies (Farris, 1973; Felsenstein, 1973, 1978; Yang, 1996). However, when inferring phylogenies generated by complex evolutionary processes, they may produce divergent results. Recent simulation studies (Kolaczkowski and Thornton, 2004; Spencer et al., 2005; Simmons et al., 2006) have shown that both MP and model-based methods, under certain circumstances, can present biases to infer the correct phylogeny with accuracy (Steel 2005). In such conditions, a more complex model will better fit the data, but an overparameterization will increase the statistical uncertainty of results (Pybus, 2006). Some empirical studies (e.g., Archibald et al., 2003; Anderson and Swofford, 2004) have shown that model-based analyses do not outperform MP under real conditions. However, the debate is still alive and due to the lack of a method with a superior performance under every condition, parsimony and model-based approaches have been applied to infer phylogenetic relationships and to evaluate their confidence.

Recently, Rindal and Brower (2011) examined 1,000 phylogenetic studies published in *Molecular Phylogenetics and Evolution* between 2007 and 2009, where more than one kind of approach was employed. They verified that less than 0.5% of the

evaluated studies presented strong incongruence between MP and model-based analyses. Based on this, they concluded that the vast majority of analyses produced identical topologies or trees with minor differences. In this case, the use of more than one approach was supposed to be redundant and, according to them, MP would be sufficient and favored among the methods because of its analytical speed, methodological clarity and interpretability of results.

We agree that phylogenetic results produced by the two approaches, MP and model-based analyses, do not strongly diverge in most cases. However, this does not mean that they are equally phylogenetically informative and thereby redundant. In this work we explore the two principal conclusions of Rindal and Brower (2011), namely that MP and model-based analyses are redundant and MP analysis is sufficient for phylogenetic studies, and illustrate our point using the phylogenetics of the Metastelmatinae (Asclepiadoideae, Apocynaceae), with emphasis on the genus *Minaria*.

## **Material and Methods**

Metastelmatinae is a neotropical subtribe, comprising 13 genera and around 260 species. *Minaria* was not recognized based on morphology; however, a clade representing this genus emerged with high support in phylogenetic studies based on the plastid *trnL-F* intergenic spacer and *trnL* intron (Rapini et al., 2003) and was confirmed by subsequent analyses with additional plastid markers (Liede-Schumann et al., 2005; Rapini et al., 2006; Silva 2010; Silva et al., submitted). The genus comprises 19 species that are mostly endemic to small areas with open vegetation in the Espinhaço Range, in the state of Minas Gerais, Brazil (Konno et al., 2006). The lineage diverged around 12 million years ago (Ma), diversifying in the Miocene/Pliocene boundary, 4.7 Ma (Rapini et al., 2007).

The monophyly of most genera of Metastelmatinae has been questioned by more comprehensive phylogenetic studies (Silva et al., submitted), but a generic re-circumscription has not been possible because the relationships in the subtribe are often unresolved and results are incongruent between plastid and nuclear datasets. Resolving the phylogenetic relationships in Metastelmatinae is challenging, but this challenge could be considered trivial in plant systematics. This study was chosen to illustrate our point only because it was under development when we assessed Rindal and Bower's (2011) provocative paper.

To orient our phylogenetic approach, we established the following three objectives for the study: 1) to circumscribe *Minaria*, 2) to position the genus in Metastelmatinae, and 3) to establish the relationships among its species. Initially, we tested 27 molecular markers (19 plastid and eight nuclear regions) that were supposed to be informative at this level. The plastid regions selected were *psbA-trnH*, *trnS-trnG*, *rps16*, and *trnE-trnY* and the nuclear regions were ITS and ETS. Plastid and nuclear datasets were analysed in combined (total evidence) and separate analyses. We sampled 41 species of Metastelmatinae, concentrating the sampling in *Minaria*, with 16 species (Appendix). Three specimens of *M. cordata* were sampled to include the whole variation of the species, which is divided into varieties (Fontella-Pereira, 1989). The tree was rooted in *Blepharodon ampliflorum* because it emerged as the sister to the rest of the Metastelmatinae in previous phylogenetic studies (Liede-Schumann et al., 2005; Rapini et al., 2006).

We analyzed the datasets with the three most common phylogenetic methods: Maximum Parsimony (MP), and two model-based methods, Bayesian Inference (BI) and Maximum Likelihood (ML). To evaluate their performance with empirical data is especially difficult because the true phylogeny is unknown. However, for the purpose of this study, we assumed that clades supported independently by the plastid and nuclear datasets are correct. Incongruence between plastid and nuclear datasets might be produced by biological and stochastic processes, but the simplest explanation for their congruence is their common history representing the phylogeny of individuals. Clades with 95% accuracy were considered supported. Therefore, we constrained our supported clades to those either with Bayesian posterior probability (PP)  $\geq 95\%$  or with non-parametric bootstrap support (BS)  $\geq 75\%$  (being conservative). The former measure is considered a better estimator of accuracy and, BS  $\geq 70\%$  usually corresponds to PP  $\geq 95\%$  (Hillis and Bull, 1993; Alfaro et al., 2003). Without the root, a fully resolved tree with 41 terminals, as in our analyses, presents 38 clades. The efficiency of each method was then measured by the percentage of correct clades recovered with accuracy based on the same dataset.

The MP analyses were conducted in PAUP v. 4.0b10a (Swofford, 2000), with characters treated under equal weights and unordered. Heuristic searches were performed with tree-bisection and reconnection (TBR) branch swapping on 1,000 random-taxon addition replicates, holding no more than 20 trees per replicate; the trees saved were then subject of another set of TBR swapping with a limit of 20.000 trees.



The confidence of the clades was statistically evaluated by non-parametric bootstrap support (MP\_BT) (Felsenstein, 1985) calculated through 1,000 pseudo-replicates of simple-taxon addition, followed by TBR swapping, keeping a limit of 15 trees per pseudo-replicate.

The BI analyses were conducted in MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Datasets were partitioned and the best-fitting model according to the MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004) was applied to each partition. Five million generations initiated with random trees were performed using two simultaneous independent runs with four chains each (one cold and three heated), saving one tree every 1,000 generations. We excluded the 1,250 trees from each run as burn-in (after log-likelihoods were stabilized) and estimated the PP of clades based on the majority rule consensus with the remaining trees.

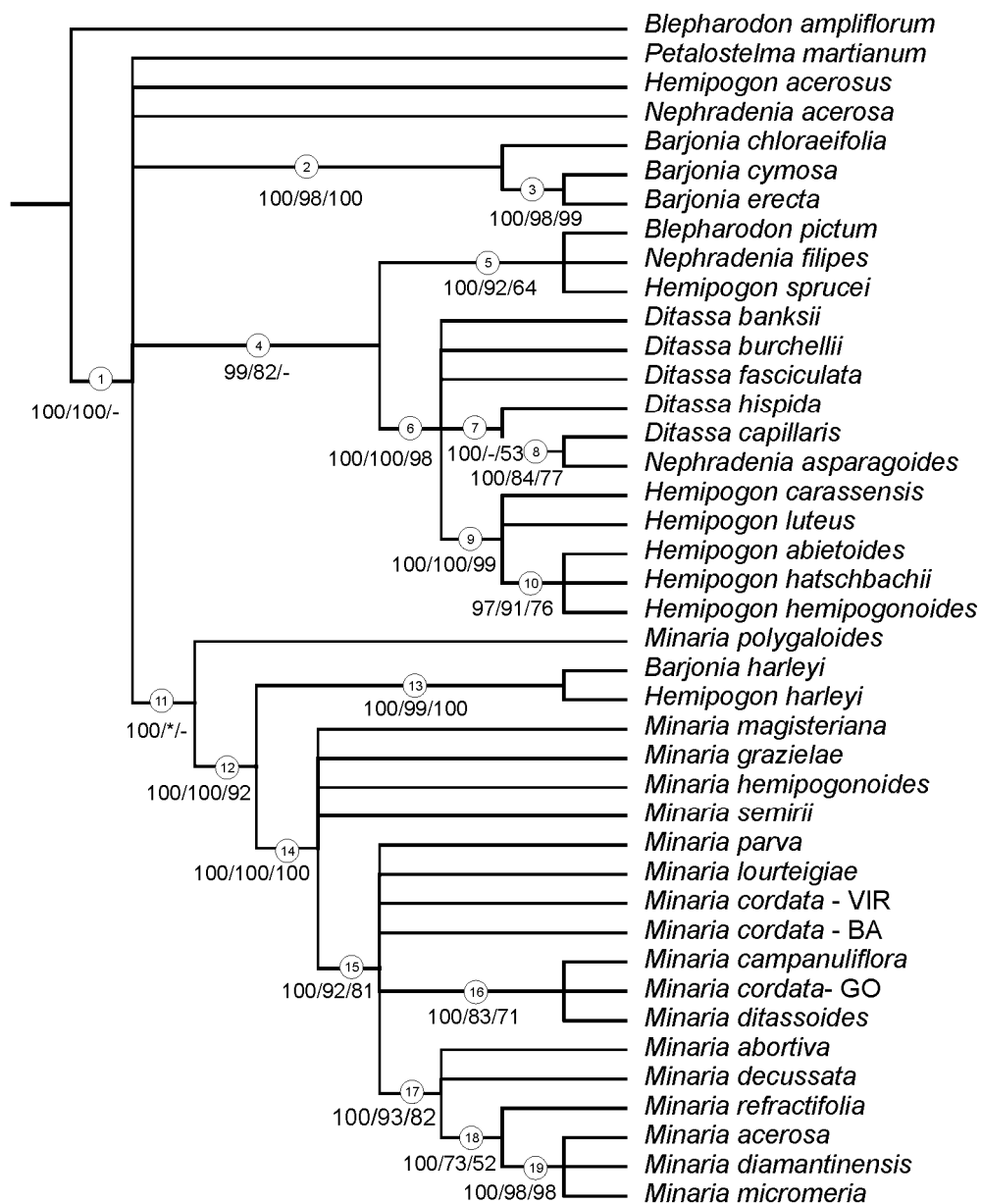
The ML analyses were conducted in RAxML (Stamatakis, 2006) as implemented in the CIPRES v. 2.0 (Miller et al., 2010). The GTR + CAT model was applied and 1,000 replications under the rapid bootstrap algorithm estimated the bootstrap support of the clades (Stamatakis et al., 2008).

Finally, the statistical significance of conflict between plastid and nuclear datasets was estimated by the ILD test (Farris et al., 1994). The statistical differences between trees produced by different methods based on the same dataset, and by the same method based on different datasets, were estimated using the Templeton (1983; T83) and Shimodaira and Hasegawa (1999; SH) tests.

## Results

The combined matrix includes 4,405 characters analyzed, of which 382 were variable and 212 parsimony-informative (TreeBase access ID 11738: <http://purl.org/phylo/treebase/phyloids/study/TB2:S11748?x-access-code=6c96d8eaba0f1ef632bf5a5ea04a2294&format=html>). The plastid characters represent around 70% of the dataset, a little more than 50% of the variable characters and 44% of the parsimony-informative sites. The ILD test indicated significant conflict between plastid and nuclear datasets ( $P = 0.006$ ). The incongruence seems to be caused principally because of *Nepradenia filipes*, whose exclusion makes the incongruence not statistically significant ( $P = 0.016$ ) according to the P-value established by Cunningham (1997). The incongruence was also significant ( $p = 0.002$ ) when *Minaria* was analyzed separately, but we found no well-supported incongruent clades within the genus.

Considering only supported clades ( $BS \geq 75\%$  and  $PP \geq 95\%$ ), the topologies produced by MP, ML, and BI analyses based on the matrix combining plastid and nuclear datasets are mostly congruent and provide higher support for more clades than results based on separate plastid or nuclear datasets (see below). The BI tree presents 19 clades with  $PP \geq 95\%$  (Fig. 1), which are all shared with the best tree produced by ML, although two of them have  $BS < 75\%$ . Only three of the 19 clades supported by BI were not resolved in the strict consensus of the 264 most parsimonious trees ( $CI = 0.75$  and  $RI = 0.79$ ); however, they were not contradicted, and among the remaining 16 clades, only four had  $BS < 75\%$ . Results produced by MP and BI based on the combined datasets are not statistically different from results produced by the respective methods based on the plastid dataset alone. Finally, the ML tree presented the best score as estimated by T83 and SH tests, but it was not statistically different from the BI tree, according to the SH test (Table 1).



**Figure 1.** Tree produced by Bayesian Inference (BI) analysis based on the matrix with plastid and nuclear datasets combined, considering only clades with posterior probability  $PP \geq 95\%$ . Clades are referred by numbers in the circles and their support is below the branches (PP/ML\_BS/MP\_BS) as assessed by BI\_PP, Maximum Likelihood Bootstrap (ML\_BS) and Maximum Parsimony Bootstrap (MP\_BS).

**Table 1.** Statistical significance of differences between topologies produced by Bayesian Inference (BI, constrained to clades with Posterior Probability  $PP \geq 95\%$ ), Maximum Likelihood (ML, constrained to the clades with Bootstrap Support  $BS \geq 75\%$ ), and Maximum Parsimony (MP, constrained to with Bootstrap Support  $BS \geq 75\%$ ) based on plastid, nuclear, and combined datasets, according to Templeton/Shimodaira-Hasegawa tests; #best topology \* significant; \*\* highly significant.

<b>Plastid</b>	BI_PP $\geq 95\%$	ML_BS $\geq 75\%$	MP_BS $\geq 75\%$
#BI_PP $\geq 95\%$	---	0.000**	0.000**
ML_BS $\geq 75\%$	0.0001**	---	0.000**
MP_BS $\geq 75\%$	0.0001**	0.0001**	---
<b>Nuclear</b>	BI_PP $\geq 95\%$ ***	BS_ML $\geq 75\%$	MP_BS $\geq 75\%$
BI_PP $\geq 95\%$	---	0.606	0.000**
#ML_BS $\geq 75\%$	0.6597	---	0.000**
MP_BS $\geq 75\%$	0.0001**	0.0001**	---
<b>Combined</b>	BI_PP $\geq 95\%$	BS_ML $\geq 75\%$	MP_BS $\geq 75\%$
BI_PP $\geq 95\%$	---	0.111	0.000**
#ML_BS $\geq 75\%$	0.0023**	---	0.000**
MP_BS $\geq 75\%$	0.0001**	0.0001**	---
<b>IB_PP <math>\geq 95\%</math></b>	plastid	nuclear	combined
Plastid	---	0.006**	0.289
Nuclear	0.0018**	---	0.002**
#Combined	0.0003**	0.0016**	---
<b>ML_BS <math>\geq 75\%</math></b>	plastid	nuclear	combined
Plastid	---	0.000**	0.000**
Nuclear	0.0001**	---	0.019*
#combined	0.0001**	0.0001**	---
<b>MP_BS <math>\geq 75\%</math></b>	plastid	nuclear	combined
Plastid	---	0.000**	0.095
Nuclear	0.0001**	---	0.000**
#combined	0.0001**	0.0001**	---

Maximum Parsimony – Based on the plastid dataset, the heuristic search found 20,000 trees (CI = 0.8163, RI = 0.8610) whose strict consensus (SC) presents 22 clades, seven of them supported (MP\_BS  $\geq$  75%; Fig. 2A). Based on the nuclear dataset, MP analysis found 54 trees (CI = 0.7586, RI = 0.7922) whose SC presents 30 clades, 10 supported (Fig. 2B). Only four clades were recovered by both datasets in the SC and only two of them were supported by both analyses. This means that MP was < 5% efficient to recover the entire tree based on both datasets separately.

Maximum Likelihood – Based on the plastid dataset, 21 clades present BS  $\geq$  50%, 11 of them with support (ML\_BS  $\geq$  75%; Fig. 3A). Based on the nuclear dataset, 27 clades present BS  $\geq$  50%, 17 of them supported (Fig. 3B). Four clades are supported by plastid and nuclear datasets separately, an efficiency of  $\sim$  10% of ML.

Bayesian Inference – Based on the plastid dataset, 25 clades present PP  $\geq$  50%, 18 of them supported (PP  $\geq$  95%; Fig. 4A). Based on the nuclear dataset, 26 clades present PP  $\geq$  50%, 16 supported (Fig. 4B). Eleven clades are supported based on both datasets (efficiency  $\sim$  30%), but the position of *Nephradenia filipes* is incongruent between the two trees.

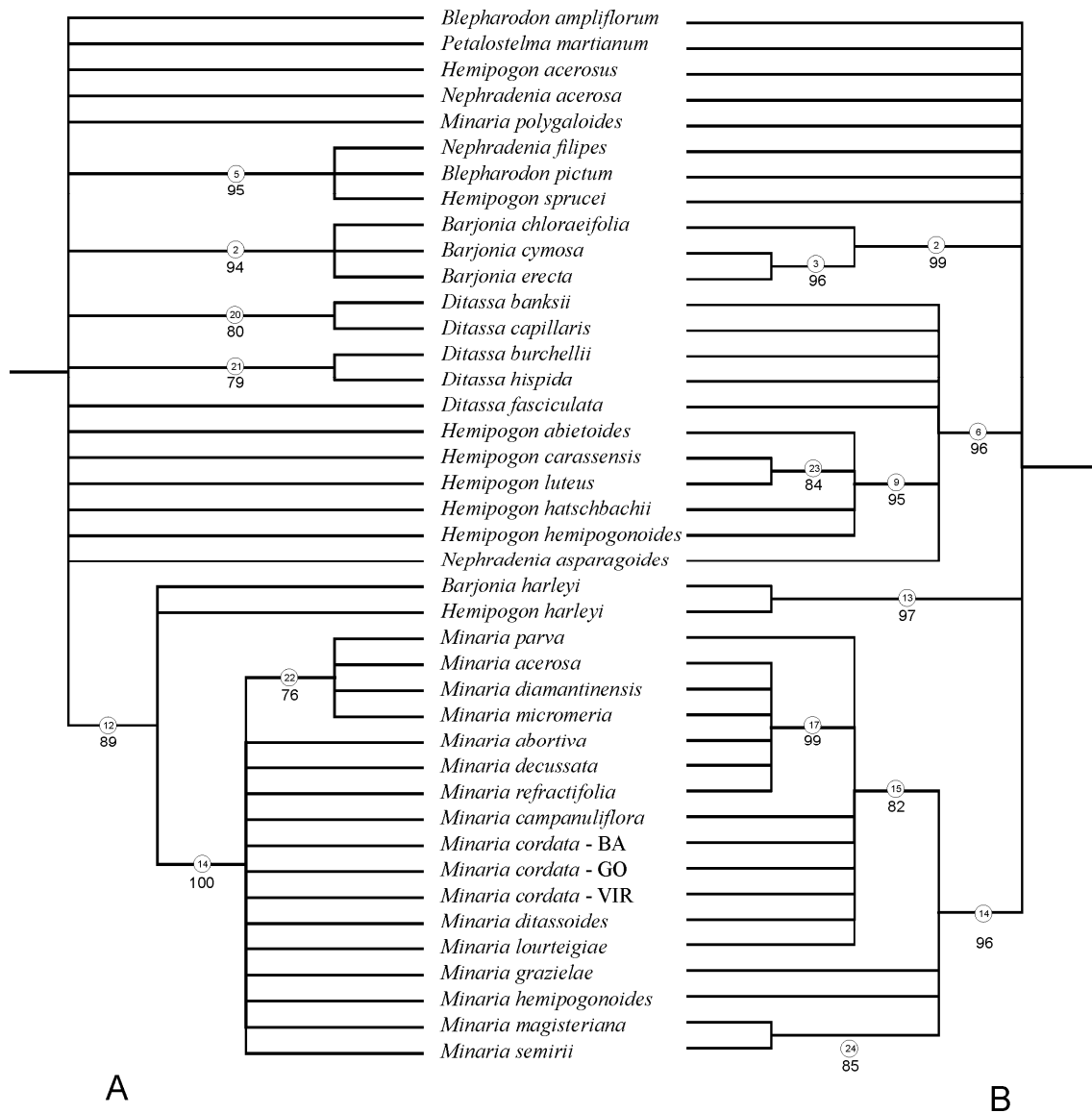
MP vs. ML – Every clade supported by MP\_BS based on either dataset was supported by ML\_BS with the respective dataset. Therefore, ML supported four clades more than MP based on plastid dataset and seven more based on the nuclear dataset. Among the four ML ‘extra-clades’ based on plastid, two are correct (clades 3 and 1), one agrees only with the plastid BI analysis (11) and another one is exclusive to the plastid ML analysis (25), being incongruent with nuclear ML analysis, though not incongruent with the other two methods based on the plastid dataset. Among the seven ML ‘extra-clades’ based on the nuclear dataset, four are correct (1, 7, 10, 8; the clades 7 and 10 are considered correct because they are congruent with the nuclear BI), although one of them is incongruent with plastid ML (8 vs. 20), two are congruent only with nuclear BI (26 and 28), and one is exclusive of nuclear ML (27), though not incongruent with the other methods based on either dataset.

MP vs. BI – Based on the plastid dataset, BI analysis recovered with accuracy only four of the seven clades supported by MP\_BS; the other three clades supported in MP analysis (20, 21, and 22) are incongruent with BI analysis. First, *Ditassa capillaris* appears closely related with *D. banksii* (clade 20; BS = 80%) while its correct place is closer to *Nephradenia asparagoides* (clade 8). Second, *Ditassa hispida* and *D. burchelli* are sister species (clade 21; BS = 79%), which is neither confirmed nor rejected by

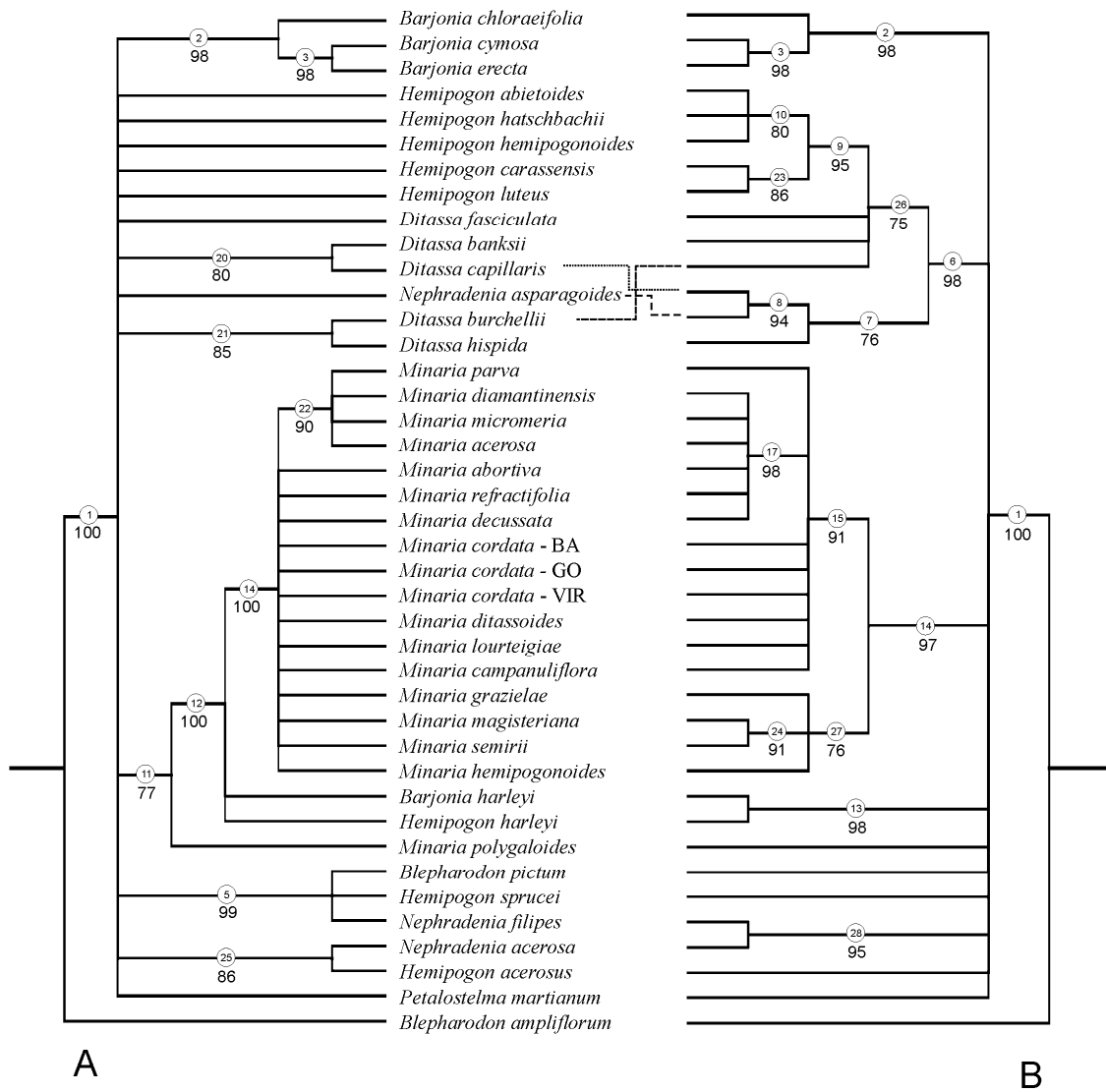
plastid MP analysis. However, *D. hispida* appears in a clade (7) without *D. burchellii*. Third, *Minaria parva* is incorrectly placed in a clade (22; BS = 76) with three other species of the genus that belong to a clade (17) without *M. parva*.

Based on the nuclear dataset, the BI analysis recovered with accuracy the 10 clades supported by the MP\_BS.

ML vs. BI – Four of the 11 clades produced by ML based on plastid data are not presented in the plastid BI tree, the three incorrect clades that are also present in the plastid MP (20, 21, and 22), plus a clade exclusive of this analysis (clade 25). The trees produced by ML and BI share 14 clades based on the nuclear dataset and they are not statistically different according to the T83 and SH tests. However, ML detected two correct clades (7 and 10) not detected by BI and a clade was exclusive to this analysis (27), and BI detected a correct clade (16) that was not detected by ML, in addition to a clade that is exclusive to this analysis (29). In neither case, supported clades produced by a method were incongruent with supported clades produced by the other method.

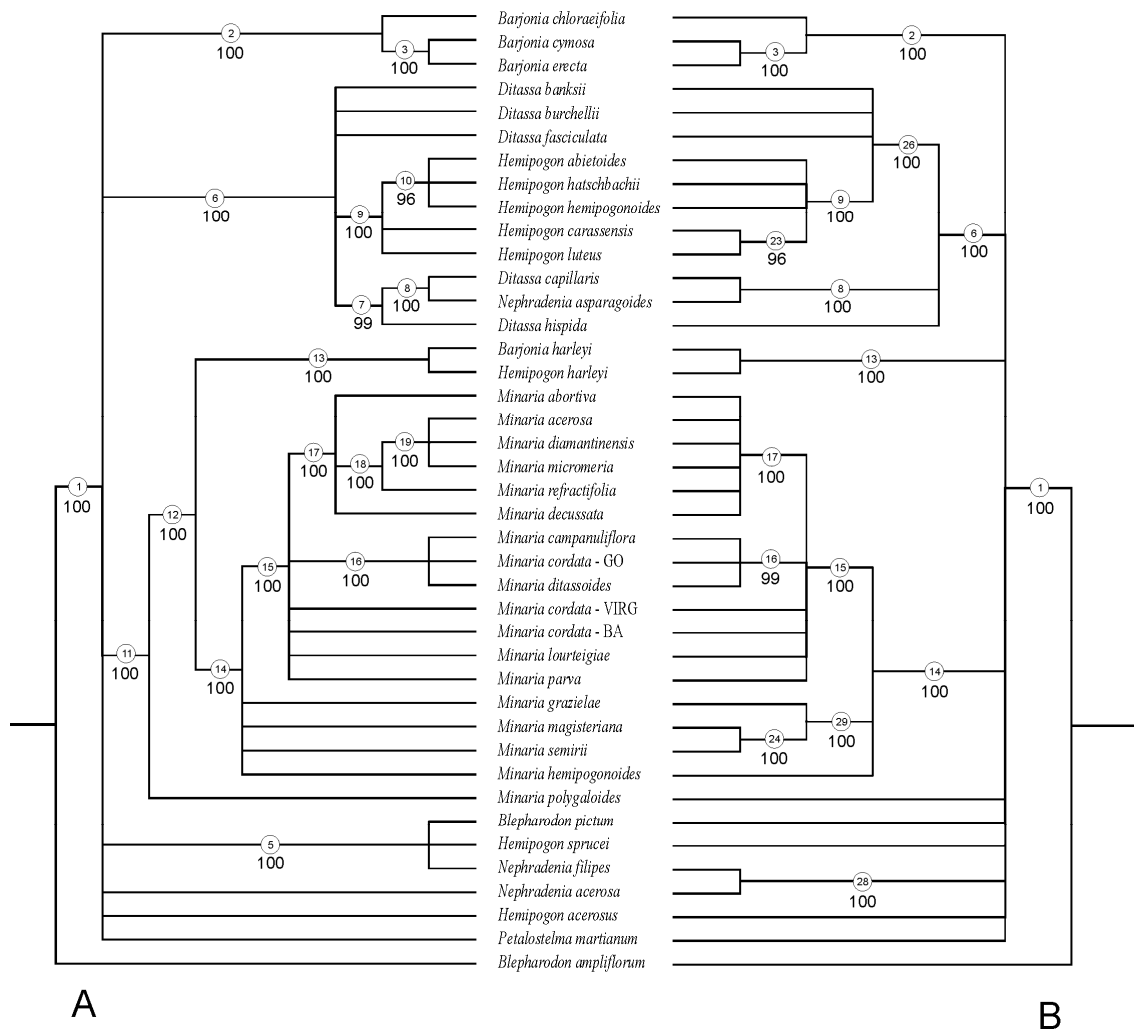


**Figure 2.** Trees produced by Maximum Parsimony, considering only clades with Bootstrap Support  $\geq 75\%$ , based on plastid (A) and nuclear (B) datasets. Clades are referred to by numbers in the circles and their support is below the branches.



**Figure 3.** Trees produced by Maximum Likelihood, considering only clades with Bootstrap Support  $\geq 75\%$ , based on plastid (A) and nuclear (B) datasets. Clades are referred to by numbers in the circles and their support is below the branches.





**Figure 4.** Trees produced by Bayesian inference, considering only clades with Posterior Probability  $\geq 95\%$ , based on plastid (A) and nuclear (B) datasets. Clades are referred to by numbers in the circles and their support is below the branches.

Phylogenetics of Metastelmatinae (Figs 1-4; Table 2) – Based on our combined analysis, the ingroup (clade 1) is supported by model-based analyses, but not by MP. With the exception of *B. harleyi*, the genus *Barjonia* (clade 2) is well-supported by the three methods regardless of the dataset used, and its internal relationship is also well supported by the combined analyses. Clade 4 was only supported by the model-based analyses, and only based on the combined dataset. Clade 5, informally called ‘Astephanopsis’, was detected by the three methods, but exclusively based on the plastid and combined datasets. The position of *Nephradenia filipes* in this clade conflicts with its position based on the nuclear dataset by model-based analyses (clade 28).

The sister group of ‘Astephanopsis’ is composed mostly by species of *Ditassa* and *Hemipogon* (Metastelmatinae core group clade 6). This clade was missed by plastid MP and ML, but detected by the other analyses. Clade 7 was missed by ML and presents low MP\_BS in the combined analyses. This is particularly interesting, in relation to our point on method performances, because clade 7 was detected only by nuclear ML and plastid BI. Since it emerged with confidence based on the two datasets separately, it was considered correct. Despite this, clade 7 was not detected with confidence by MP individual analyses and was also missed by plastid ML and nuclear BI. Furthermore, it conflicts with clades 20 (and 21) due to the position of *Ditassa capillaris* as sister to *D. banksii*. In our assessment, clade 20 was considered incorrect because *D. capillaris* appears closer to *Nephradenia asparagoides* (clade 8) by plastid and nuclear BI individual analyses, which was therefore considered correct. The species of *Hemipogon* in clade 6 form a monophyletic group (clade 9) and the three erect species endemic to the Espinhaço Range in Minas Gerais form a clade (10).

In the combined analyses, *Minaria* s.l. (clade 11), including *Barjonia harleyi* and *Hemipogon harleyi* (clade 13), was detected with confidence only by BI and plastid ML. The high support for clade 12 indicates *M. polygaloides* as sister to the rest of *Minaria*. Two major biogeographic clades are recognized in *Minaria*, one including the two species endemic to the state of Bahia (clade 13) and another one including the other species of *Minaria*, which are mostly restricted to state of Minas Gerais (clade 14). The latter was detected since the first phylogenetic studies based on molecular data and was well supported by all analyses here, regardless of the dataset used; however, the closer relationship of the Bahian clade with it was not detected with confidence based on the nuclear dataset, regardless of the method, but was detected by the three methods with

the plastid dataset. In the Minas Gerais clade (14), there are four unresolved species whose seeds lack coma, and a core clade (15) formed by species with comose seeds. Among the core *Minaria* group with comose seeds, clade 16 was not detected with confidence by MP or ML, but was detected by both BI individual analyses. Clade 17 was recovered by plastid MP and plastid ML, and by both plastid and nuclear BI, whereas clades 18 and 19 were recovered only by plastid BI, although the latter received extremely high supports with the three methods based on the combined datasets.

**Table 2.** List of clades and their occurrence in the trees (Figs. 1-6) produced by the three methods (MP- Maximum Parsimony, ML- Maximum Likelihood, and BI- Bayesian Inference) with confidence (bootstrap supports  $\geq 75$  for MP and ML, and Posterior Probabilities  $\geq 95\%$  for BI) based on the three datasets (Pl- plastid, Nu- nuclear, and com- combined matrix). The 13 clades in bold are considered correct in our study because they were recovered by separate analyses based on plastid and nuclear datasets.

clades	Pl MP	Nu MP	Pl ML	Nu ML	Pl BI	Nu BI	com MP	com ML	com BI
<b>1</b>			<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>		<b>X</b>	<b>X</b>
<b>2</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>3</b>		<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
4								X	X
5	X		X		X			X	X
<b>6</b>		<b>X</b>		<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>7</b>				<b>X</b>	<b>X</b>				<b>X</b>
<b>8</b>				<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>9</b>		<b>X</b>		<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>10</b>				<b>X</b>	<b>X</b>		<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
11			X		X				X
12	X		X		X		X	X	X
<b>13</b>		<b>X</b>		<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>14</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>15</b>		<b>X</b>		<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>16</b>					<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>17</b>		<b>X</b>		<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
18					X				X
19					X		X	X	X
20	X		X						
21	X		X						
22	X		X						
23		X		X		X			
24		X		X		X			
25			X						
26				X		X			
27				X					
28				X		X			
29						X			
30								-	
31							X	X	
32								-	
33							X	X	

## Discussion

The short descriptions of phylogenetic results are barely sufficient for a proper classification of method performances. Many of them claim for large congruence and use a single most-resolved tree, making the real importance of the methods obscure for the final results of the study. If our intention here was exclusively to discuss relationships in Metastelmatinae, with special attention to *Minaria*, Figure 1 would probably be enough to show the main phylogenetic patterns and, based on what was described for the results of our combined analysis, they would be simply classified as identical or with minor differences among the three methods.

With a large amount of data, methods tend to converge to similar results in many cases. However, it is not always possible to include this amount of data, and our results based on plastid and nuclear datasets analyzed separately by each method show clearly that their performances are different. MP and ML efficiencies were similar whereas the BI recovered relatively more correct clades with accuracy, outperforming the other two methods. Therefore, the dichotomization between parsimony and model-based approaches seems to be simplistic, ignoring several other factors that might greatly influence the analyses, such as the evolutionary model and data partitions applied, estimators of branch support used and programs employed.

To improve the sampling of a phylogenetic study with key species, a team could spend a long time in the field and extract additional tissue from invaluable historical collections archived in herbaria. More time and resources could also be necessary to optimize protocols and to sequence different regions of DNA in order to find useful markers at the desired level of analysis. After all, the phylogenetic signal is often very thin and sampling is rarely complete. Therefore, it is important to make the most of the data available and this can only be done by employing efficient analytical methods.

Any method can be susceptible to biases when its assumptions are strongly violated. This is not a 'privilege' of MP. Although more robust than MP, model-based analyses can also fail to recover the true phylogeny (Swofford et al., 2001). This is especially true when site substitution rates and proportion of variable sites change across the tree (heterotachy) but the model applied for the analysis is homotachous. In these cases, model-based analysis is also susceptible to long-branch attraction (Inagaki et al., 2004; Kolaczkowski and Thornton, 2004; Lockhart et al., 2006; but see Spencer, 2005). Likewise, the non-parametric BS and the parametric PP measures of uncertainty are also susceptible to errors (Archibald et al., 2003). Therefore, neither MP nor model-

based approaches are immune to inconsistency under every circumstance and, considering that circumstances may change across the tree, different methods may perform differently in different parts of the tree (Buckley & Cunningham, 2002).

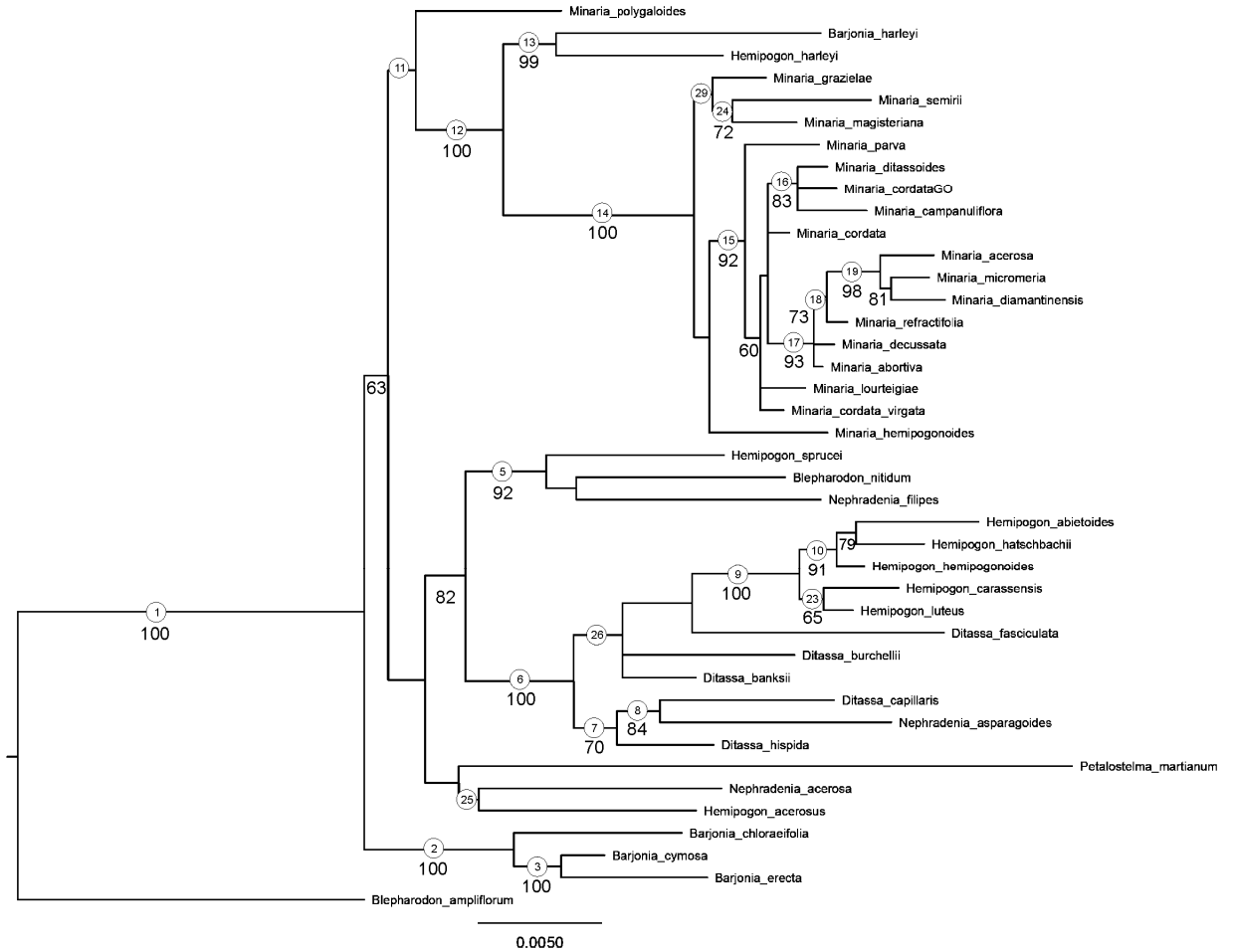
The empirical example presented here illustrates the fact that BI is more efficient than MP and ML, recovering more correct clades with confidence based on less data than the other two approaches. MP, on the other hand, is the most conservative method, recovering less correct clades with confidence. Therefore, if one wishes to make the most of the data and, for some special reason (or conviction), cannot apply more than one method, the popular combination of MP and BS support is not the best option available. It will require more data to support correct clades and will be more susceptible to sampling artefacts. The two weaknesses of MP are easy to understand. First, only a minor part of the molecular dataset is parsimony-informative, although every site, even the invariable ones, contains phylogenetic information that can be incorporated in model-based analyses (Yang, 1996). The small number of informative sites results in trees that are shorter than the true ones, and recover false relationships supported by homoplasies that are reconstructed as synapomorphies (Chase et al., 2006). Second, MP is more strongly susceptible to long-branch attraction than model-based analyses (Felsenstein 1978; Alfaro et al., 2003) and, for instance, might be inconsistent even under simple conditions when sampling is poor (Huelsenbeck and Lander, 2003).

Although BI is more sensible to the phylogenetic signal, needing relatively less data to detect clades with confidence, it is also more susceptible to assign high PP to incorrect clades when the data available is not sufficient to recover the correct tree (Alfaro et al. 2003). Whereas BS associated with MP and ML is more susceptible to the type I error, by failing to strongly support correct clades, PP is more susceptible to the type II error, by failing to reject incorrect clades (Archibald et al., 2003). The two approaches are qualitatively different and cannot be directly compared because they capture different features of the data and both methods and measures of confidence are useful to infer branch support (Alfaro et al., 2003; Douady et al., 2003). Therefore, a pluralistic approach combining BI\_PP and MP\_BS might increase the efficiency of the analyses by detecting clades with more accuracy in different parts of the tree and improving the credibility of branch uncertainty calling attention to internodes that are suspect of long-branch attraction, and because of this deserve further attention (Bergstein, 2005).

In our empirical example, only the model-based methods (plastid ML and BI and combined BI) were able to recover *Minaria s.l.* (clade 11) with confidence. This relationship could be ignored if MP was the only method employed, although the clade appears in the strict consensus of the plastid MP. We cannot confirm *Minaria s.l.* as correct according to our assessment of accuracy, but the morphology and the distribution concentrated in the Espinhaço Range are evidences that can also be considered. The long basal internodes of Metastelmatinae (Fig. 5) might be the principal cause of the basal polytomy, disturbing the analyses to assess the earliest relationships of the subtribe, and MP was probably the most affected method. Unfortunately, we do not know any species that could help break the long branches that separate *Blepharodon ampliflorum* and the rest of the Metastelmatinae; apparently, this gap is the result of extinctions rather than uneven sampling. Nevertheless, before sampling *M. polygaloides* and the two species from Bahia (clade13), we did not imagine that they could form such a grade reducing the long internode that preceded the species from the Minas Gerais core group (clade 14).

The difficult to detect *Minaria* may sound very particular or less important in the tree-of-life context. However, there are many studies where clades were not recovered because the method used was inadequate to extract the maximum amount of information from the data or highly supported wrong clades because the method was not the most appropriate (Whelan et al., 2001). An emblematic example in plant systematics is the position of Gnetales among the seed plants. Phylogenetic analyses based on morphology assigned the group as sister to the angiosperms (the ‘anthophyte’ hypothesis), making the gymnosperms paraphyletic (Loconte and Stevenson, 1990; Doyle and Donoghue, 1992). Phylogenetic analyses based on molecular data were contradictory, presenting the Gnetales either as sister to the angiosperms or to the rest of the seed plants (Hamby and Zimmer, 1992; see also Rydin et al., 2002) or including them within the weakly supported gymnosperms (e.g., Hasebe et al., 1992; Goremykin et al., 1996; Chaw et al., 1997). The confidence about the sister relationship between gymnosperms and angiosperms came only with multigene analyses (Bowe et al., 2000; Chaw et al., 2000). Besides assigning Gnetales closer to or within conifers (the ‘gnepine’ hypothesis) with high support, they (see also Soltis et al., 2002; Magallón and Sanderson, 2002) also confirmed that the discrepancies in seed plant topologies were caused by long-branch attraction promoted by the saturation of the third codon positions in particular genes. The third positions are known to mislead MP analyses to recover

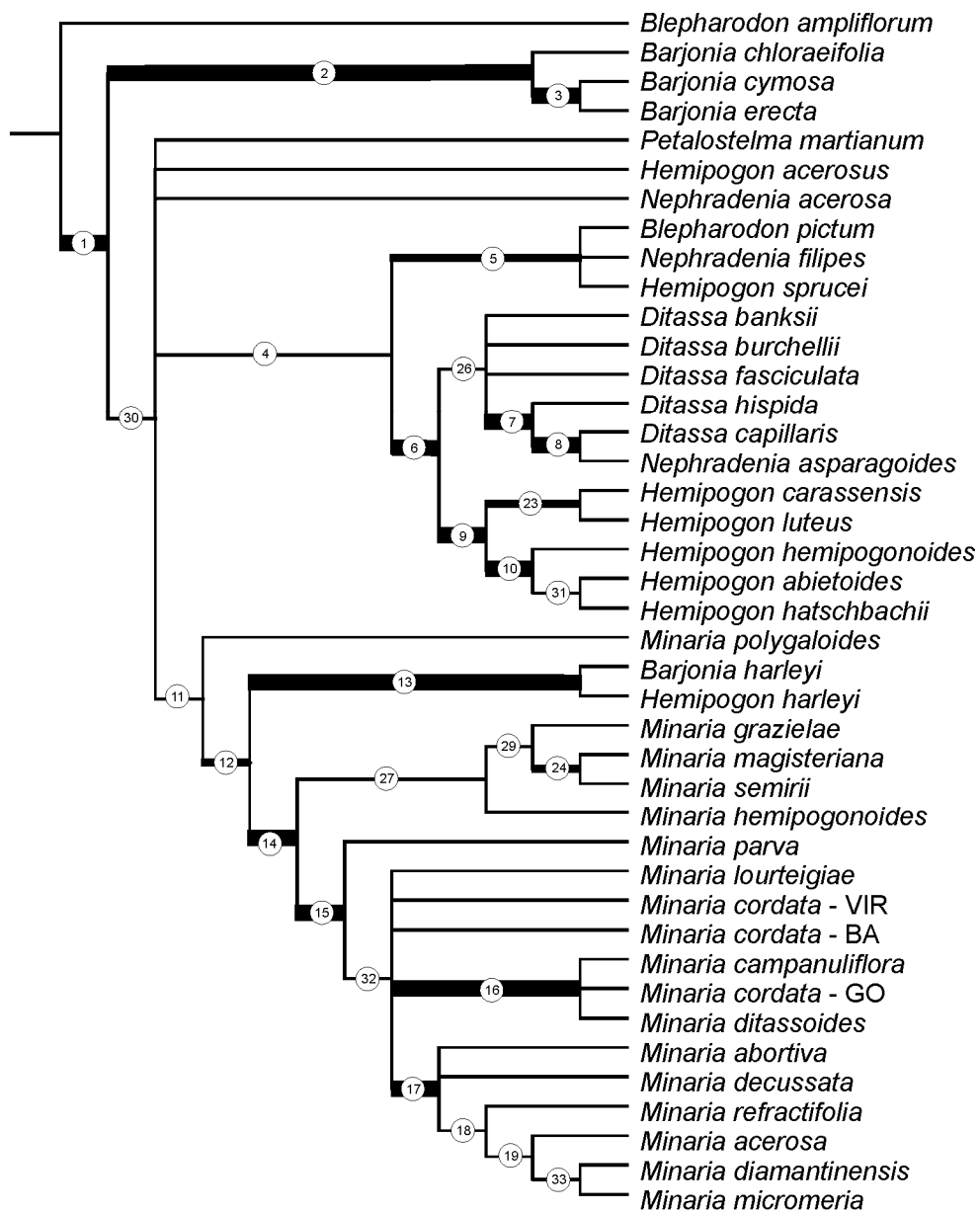
ancient relationships; in spite of that, they still retain significant phylogenetic information and can be used when accurate models are applied (Magallón and Sanderson, 2002).



**Figure 5.** Phylogram based on the best tree produce by Maximum Likelihood based on the matrix with plastid and nuclear datatsets combined. Clades are referred to by numbers in the circles and their support is below the branches.



Since methods can behave differently across the tree, and can influence the accuracy of their estimators of uncertainty, the relative performance of a method can vary according to the tree space. Combining information provided by more than one method, therefore, can contribute to making the most of the phylogenetic signal in the dataset, which would be lost otherwise. For instance, by incorporating clades detected by ML (Fig. 5; see also table 2) but not present in the tree produced by BI combined analyses, more than seven clades can be considered for Metastelmatinae (Fig. 6). Apart from *Blepharodon ampliflorum*, *Barjonia* appears as sister to the rest of the Metastelmatinae (clade 30; BS = 63). The voluble species of *Hemipogon* form a clade (23; BS = 65), a relationship that was detected by the three methods, but only based on the nuclear dataset, and the erect species of the genus endemic to the Serra do Cipó are sister (clade 31; MP\_BS = 68, ML\_BS = 79). In the *Minaria* core group (clade 14), two major clades are recognized, one with coma (15) and one without (clade 27). The latter was detected only by nuclear ML (BS = 76), and was internally resolved based on nuclear information, clade 29 was detected by BI, and clade 24 by the three methods. Clade 32 (MP\_BS = 54, ML\_BS = 60) indicates *M. parva* as sister to the rest of the comose species in the core group of *Minaria* and, more internally, clade 19 is refined with *M. diamantinensis* appearing closer to *M. micromeria* (clade 33; MP\_BS = 76, ML\_BS = 81); both relationships were evident in the ML and MP combined analyses.



**Figure 6.** Original tree produced by Bayesian Inference (Fig. 1) refined with clades supported by other analyses, especially Maximum Likelihood based on nuclear or combined dataset. The thickest branches are considered correct in our study because they were detected by the analyses based on plastid and nuclear datasets separately. Branches with intermediate thickness were detected by all methods based either on the plastid or the nuclear datasets, although they were not detected by either method with the other individual dataset.

Overall, 28 of the 38 clades of Metastelmatinae were traced by combining the phylogenetic signal retrieved by the three methods based on plastid and nuclear datasets, although only 13 can be considered correct. The MP combined analysis detected with confidence 11 of the 13 correct clades. However, the method was extremely inefficient based exclusively on the plastid dataset, recovering two correct and three incorrect clades. Fortunately, most phylogenetic studies in Asclepiadoideae have applied other methods besides MP; otherwise, the systematics of the neotropical groups would be less advanced, because most analyses until recently were concentrated exclusively on plastid markers. BI, on the other hand, detected all correct clades based on the same plastid dataset alone. The other 15 clades considered in the refined tree were retrieved from the combined and nuclear analyses by at least one method, although two of them with  $ML\_BS < 75\%$ .

Although the strategy used here helped to achieve two of the three phylogenetic objectives established for this study (i.e., to circumscribe *Minaria* and to refine its internal relationships), it failed to place the genus with accuracy among the remaining Metastelmatinae. The relative long branches close to the root of the tree, especially of the outgroup and *Petalostelma martianum*, are possibly responsible for the conflicting results concerning the position of *Nephradenia filipes*, and the noise produced by them could have prevented better resolution for the earliest nodes of the subtribe, among which *Minaria* diverged. *Nephradenia filipes* is morphologically quite distinct from *Nephradenia acerosa*, with which it emerged (clade 28) based on nuclear ML and BI, and is also distinct from the two species sampled in ‘Astephanopsis’ (clade 5) where it emerged based on the plastid dataset (and the combined dataset). However, *Nephradenia acerosa* is morphologically more similar to *Hemipogon acerosus* and this relationship is supported by the plastid ML. Based on this, we suppose that the models for ML and BI were not properly specified to resolve with accuracy in this area of the tree, probably supporting a wrong relationship for *Nephradenia filipes*.

### **Final Remarks**

The advances in the knowledge of molecular evolution have provided consistent basis for more realistic parameters, and models employed in phylogenetic analyses are currently becoming better approximations of the true evolutionary processes, producing results more robust and accurate. The inclusion of parameters increases the variance of results, but when the parameters are close to the real ones, the method become less

susceptible to biases, improving results (Buckley & Cunningham, 2002). In a range that goes from the simplest to the most complex approach, MP occupies both extremes, because it does not use explicit parameters but, at the same time, by treating every site identically and independently, it is also comparable to a complex model (Goloboff, 2003). In this context, the model-based analyses can fill with more accuracy the gap between the two extremes covered by MP, and the combination of the two approaches will cover the universe of possibilities across the tree better than only one.

MP tends to resolve less incorrect clades than BI (Simmons et al., 2006), but in our study it supported three clades based on the plastid dataset that are apparently incorrect, a behavior shared with ML. BI was the most efficient among the three methods employed in our study, but it supported a clade that is possibly incorrect. It is clear that the three methods have different performances and one may outperform the others according to the space of the tree. Therefore, the use of more than one phylogenetic method is justifiable, and the strategy is not really cumbersome. Nowadays, one can conduct ML analyses of large matrices in a few minutes through the CIPRES page, more quickly than an MP search in PAUP. Thus, the analytical speed cannot be used to favor MP over the ML approach. MP, ML, and BI methods are broadly discussed and applied in the literature and any difficulty to clearly understand any of them might be caused by individual deficiencies rather than an intrinsic property of the method. Finally, they produce hypotheses of relationships and as such their interpretability are straightforward for topologies although the measures of uncertainty associated with them are not; the BI\_PP is a direct measure of phylogenetic accuracy whereas the exact interpretation of the MP\_BS and ML\_BS is not clear (Buckley and Cunningham, 2002; Alfaro et al., 2003).

Our illustrative study demonstrated that the performances of the phylogenetic methods are very different, especially when only a small amount of data is available. Although there is only a true phylogeny, more than one method can recover it, or different portions of it, with accuracy. Some methods can perform better in different parts of the tree space and the pluralistic approach used in most phylogenetic studies can provide valuable information rather than being redundant. This is an important part of a methodological process that can help make the most of the data and prevent mistakes produced by biases, even though the whole process is not fully described in the articles. In *Metastelmatinae*, the application of more than one method helped to refine the phylogenetics of the subtribe and provided a better evaluation of the clade confidence.

Apparently, the superficiality of results in many phylogenetic studies make the discrepancy among method performances obscure to Rindal and Brower (2011). Based on a more detailed assessment of an empirical study, we can see that phylogenetic methods are not redundant and their performances are not the same. Considering that every method can perform poorly under certain circumstances, constraining analyses to a single method is not prudent. A clear description of results, though less interesting than their biological implications, is always important and may help to reduce the use of extra pages to discuss wrong interpretations that might emerge based on superficial results.

### **Acknowledgements**

We thank Fapesb for supporting the floristic and phylogenetic studies of Apocynaceae and Nathan Smith for the linguistic review. AR and CvdB are supported by PQ-2 and PQ-1 grants from CNPq and PLR and UCSS by fellowships from CAPES.

### **References**

- Alfaro, M., Zoller, S., Lutzoni, F., 2003. Bayes or Bootstrap? A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov chain Monte Carlo sampling and bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. *Mol. Biol. Evol.* 20, 255-266.
- Anderson, F.E., Swofford, D.L., 2004. Should we be worried about long-branch attraction in real data sets? Investigations using Metazoan 18S rDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33, 440-451.
- Archibald, J.K., Mort, M.E., Crawford, D.J., 2003. Bayesian inference of phylogeny: a non-technical primer. *Taxon* 52, 187-191.
- Bergstein, J., 2005. A review of the long-branch attraction. *Cladistics* 21, 163-193.
- Bowe, L.M., Coat, G., dePamphilis, C.W., 2000. Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales' closest relatives are conifers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4092-4097.
- Buckley, T.R., Cunningham, C.W., 2002. The effects of nucleotide substitution model assumptions on estimates of nonparametric bootstrap support. *Mol. Biol. Evol.* 19, 394-405.
- Camin, J.H., Sokal, R.R., 1965. A method for deducing branching sequences in phylogeny. *Evolution* 19, 311-326.

- Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W.F., 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution* 21, 550-570.
- Chase, M.W., Fay, M.F., Soltis, D.S., Soltis, P.S., Takahashi, K.T.; Savolainen, V. 2006. Simple phylogenetic tree searches easily “succeed” with large matrices of single genes. *Taxon* 55, 573-578.
- Chaw, S.-M., Zharkikh, A., Sung, H.-M., Lau, T.-C., Li, W.-H., 1997. Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution analysis of nuclear rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 14, 56-68.
- Chaw, S.-M., Parkinson, C., Cheng, Y., Vincent, T.M., Palmer, J.D., 2000. Seed plant phylogeny inferred from three plant genomes: monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers. *PNAS* 97, 4086-4091.
- Cunningham, C.W., 1997. Can three incongruence tests predict when data should be combined? *Mol. Biol. Evol.* 14, 733-740.
- Doyle, J.A., Donoghue, M.J., 1992. Fossil and seed plants phylogeny reanalyzed. *Brittonia* 44, 89-106.
- Douady, C.J., Delsuc, F., Boucher, Y., Doolittle, W.F., Douzery, E.J.P., 2003. Comparison of Bayesian and maximum likelihood bootstrap measures of phylogenetic reliability. *Mol. Bio. Evol.* 20, 248-254.
- Edwards, A.W.F., Cavalli-Sforza, L.L., 1963. The reconstruction of evolution. *Hereditary* 18, 533.
- Farris, J.S., 1973. On the use of the parsimony criterion for inferring evolutionary trees. *Syst. Zool.* 22, 250-256.
- Farris, J.S., 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. In “Advances in Cladistics” (N.I. Platnick, V.A. Funk, Eds), Vol. 2, pp. 7-36. Columbia University Press, New York.
- Farris, J.S., Källersjö, M, Kluge, A.G., Bult, C. 1994. Testing the significance of incongruence. *Cladistics* 10, 315-319.
- Felsenstein, J., 1973. Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Syst. Zool.* 22, 240-249.
- Felsenstein, J., 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* 27, 401-410.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

- Fontella-Pereira, J., 1989. Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras, XXIII. Considerações sobre *Ditassa parva* (A. Silv.) Font. e espécies correlatas. *Eugeniana* 16, 19-27.
- Goloboff, P.A., 2003. Parsimony, likelihood, and simplicity. *Cladistics* 19, 91-103.
- Goremykin, V., Bobrova, V., Pahnke, J., Troitsky, A., Antonov, A. Martin, W., 1996. Noncoding sequences from the slowly evolving chloroplast inverted repeat in addition to *rbcL* data do not support gnetalean affinities of angiosperms. *Mol. Biol. Evol.* 13, 383-396.
- Hasebe, M., Kofuji, R., Ito, M., Kato, M., Iwatsuki, K., Ueda, K. 1992. Phylogeny of gymnosperms inferred from *rbcL* sequences. *Bot. Mag. Tokyo* 105, 673-679.
- Hamby, R.K., Zimmer, E.A., 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In "Molecular Systematics of Plants" (P.S. Soltis, D.E. Soltis, J.J. Doyle, Eds), pp. 50-91. Chapman and Hall, New York.
- Hillis, D.M., Bull, J.J., 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Zool.* 42, 182-192.
- Huelsenbeck, J.P., Crandall, K.A., 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 28: 437-466.
- Huelsenbeck, J.P., Lander, K.M., 2003. Frequent inconsistency of parsimony under simple model cladogenesis. *Syst. Biol.* 52, 641-648.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- Inagaki, Y., Susko, E., Fast, N.M., Roger, A.,J., 2004. Covarion shifts cause a long-branch attraction artefact that unites Microsporidia and Archaeobacteria in EF-1 $\alpha$  phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1340-1349.
- Kluge, A.G., 1997. Testability and the refutation and corroboration of cladistic hypotheses. *Cladistics* 13, 81-96.
- Kluge, A.G., 2001. Parsimony with and without scientific justification. *Cladistics* 17, 199-210.
- Kluge, A.G., Grant, T., 2006. From conviction to anti-superficiality: old and new justifications of parsimony in phylogenetic inference. *Cladistics* 22, 276-288.
- Kolaczowski, B., Thornton, J.W., 2004. Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous. *Nature* 431, 980-984.
- Konno, T.U.P., Rapini, A., Goyder, D.J., Chase, M.W., 2006. The new genus *Minaria* (Asclepiadoideae, Apocynaceae). *Taxon* 55, 421-430.

- Liede-Schumann, S., Rapini, A., Goyder, D.J., Chase, M.W., 2005. Phylogenetics of the New World subtribes of Asclepiadeae (Apocynaceae - Asclepiadoideae): Metastelmatinae, Oxypetalinae, and Gonolobinae. *Syst. Bot.* 30, 183-194.
- Lockhart, P., Novis, P., Milligan, B.G., Riden, J., Rambaut, A. & Larkum, T., 2006. Heterotachy and tree building: a case study with plastids and Eubacteria. *Mol. Biol. Evol.* 23, 40-45.
- Loconte, H., Stevenson, D.W., 1990. Cladistics of the Spermatophyta. *Brittonia* 42, 197-211.
- Magalon, S., Sanderson, M.J., 2002. Relationships among seed plants inferred from highly conserved genes: sorting conflicting phylogenetic signals among ancient lineages. *Am. J. Bot.* 89, 1991-2006.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, pp. 1-8.
- Nylander, J.A.A., 2004. MrModeltest 2.2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre. Uppsala University, Uppsala.
- Pybus, O.G., 2006. Model select and the molecular clock. *Plos Biol.* 4, e151.
- Rapini, A., Chase, M.W., Goyder, D.J., Griffiths, J., 2003. Asclepiadeae classification: evaluating the phylogenetic relationships of New World Asclepiadoideae (Apocynaceae). *Taxon* 52, 33-50.
- Rapini, A., Chase, M.W., Konno, T.U.P., 2006. Phylogenetics of South American Asclepiadeae (Apocynaceae). *Taxon* 55, 119-124.
- Rapini, A., Berg, C., Liede-Schumann, S., 2007. Diversification of Asclepiadoideae (Apocynaceae) in the New World. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 94, 407-422.
- Rindal, E., Brower, A.V.Z., 2011. Do model-based phylogenetic analyses perform better than parsimony? *Cladist* 27, 331-334.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.
- Rydin, C., Källersjö, M., Friis, E.M., 2002. Seed plant relationships and the systematic position of Gnetales based on nuclear and chloroplast DNA: conflicting data, rooting problems, and the monophyly of conifers. *Int. J. Plant Sci.* 163, 197-214.
- Siddall, M., 2002. Philosophy and phylogenetic inference: a comparison of likelihood and parsimony methods in the context of Karl Popper's writings corroboration. *Cladistics* 14, 209-220.



- Silva, U.C.S., 2010. Estudos filogenéticos moleculares em *Metastelmatinae* (Asclepiadoideae, Apocynaceae). M.Sc. thesis. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- Silva, U.C.S., Rapini, A., Liede-Schumann, S., Ribeiro, P.L., Berg, C., (submitted) Taxonomic considerations on *Metastelmatinae* (Apocynaceae) based on plastid DNA dataset. *Syst. Bot.*
- Simmons, M.P., Zhang, L.-B., Webb, C.T., Reeves, A., Miller, J.A., 2006. The relative performance of Bayesian and parsimony approaches when sampling characters evolving under homogenous and heterogenous sets of parameters. *Cladistics* 22, 171-185.
- Shimodaira, H., Hasegawa, M., 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inferences. *Mol. Biol. Evol.* 17, 1114-1116.
- Sober, E., 2001. The contest between parsimony and likelihood. *Syst. Biol.* 53, 644-653.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Zanis, M.J., 2002. Phylogeny of seed plants based on evidence from eight genes. *Am. J. Bot.* 89, 1670-1681.
- Spencer, M., Susko, E., Roger, A.J., 2005. Likelihood, parsimony, and heterogenous evolution. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1161-1164.
- Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688-2690.
- Stamatakis A., Hoover, P., Rougemont, J., 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Syst. Biol.* 57, 758-771.
- Steel, M., 2005. Should phylogenetic models be trying to ‘fit and elephant’? *Trends Genet.* 21, 307-309.
- Steel, M., Penny, D., 2000. Parsimony, likelihood, and the role of models in molecular phylogenetics. *Mol. Biol. Evol.* 17, 839-850.
- Swofford, D.L., Waddell, P.J., Huelsenbeck, J.P., Foster, P.G., Lewis, P.O., Rogers, J.S., 2001. Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood. *Syst. Biol.* 50, 525-539.
- Swofford, D.L., 2000. PAUP\* 4.1: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland.
- Templeton, A., 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of human and the apes. *Evolution* 37, 221-224.

- Tuffley, C., Steel, M., 1997. Links between maximum likelihood and maximum parsimony under simple model of site substitution. *Bull. Math. Biol.* 59, 581-607.
- Whelan, S., Liò, P., Goldman, N., 2001. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *Trends Genet.* 17, 262-272.
- Yang, Z., 1996. Phylogenetic analysis using parsimony and likelihood methods. *J. Mol. Evol.* 52, 294-307.

**Appendix.** GenBank accessions or voucher specimens used for plastid (*psbA-trnH*, *trnS-trnG*, *rps16*, and *trnD-trnT*) and nuclear regions (ITS and ETS).

Species	Regions					
	<i>psbA-trnH</i>	<i>trnS-G</i>	<i>rps16</i>	<i>trnD-T</i>	ITS	ETS
<i>Barjonia chloraeifolia</i> Decne.	Rapini 1059	Rapini 485	Rapini485	Rapini 1059	Rapini 1395	Rapini 1395
<i>Barjonia cymosa</i> E.Fourn.	-	Rapini 1878	Rapini 1878	-	Rapini 1878	Rapini 1878
<i>Barjonia erecta</i> (Vell.) K.Schum.	Rapini 1733	Rapini 1733	Rapini 1733	Rapini 1733	Rapini 1733	Rapini 1733
<i>Barjonia harleyi</i> Fontella	Rapini 1354	Rapini 1354	Rapini 1354	Rapini 1354	Rapini 1354	Rapini 1354
<i>Blepharodon ampliflorum</i> E.Fourn.	Rapini 1611	Rapini 1611	Rapini 1611	Rapini 1611	Rapini 706	Rapini 1611
<i>Blepharodon pictum</i> (Vahl) D.W.Stevens	Queiroz 9196	Queiroz 9196	Queiroz 9196	Queiroz 9196	Queiroz 9196	Queiroz 9196
<i>Ditassa banksii</i> R.Br. ex Schult.	-	DQ 026756	AJ 704473	Konno 754	Konno 754	Konno 754
<i>Ditassa burchellii</i> Hook & Arn.	-	DQ 026757	AJ 699293	Kaprovickas 41170	Kaprovickas 41170	Kaprovickas 41170
<i>Ditassa capillaris</i> E. Fourn.	Rapini 1508	Rapini 1508	Rapini 1508	Rapini 1508	Rapini 1508	Rapini 1508
<i>Ditassa fasciculata</i> E.Fourn.	Rapini 1303	Rapini 1303	Rapini 1303	Rapini 1303	Rapini 1303	Rapini 1303
<i>Ditassa hispida</i> (Vell.) Fontella	-	DQ 026762	AJ 704477	Rapini 1431	Rapini 1431	Rapini 1243
<i>Hemipogon abietoides</i> E.Fourn.	Ribeiro 283	Ribeiro 283	Ribeiro 283	Ribeiro 283	Ribeiro 283	-
<i>Hemipogon acerosus</i> Decne.	Rapini 1875	Wood. & Goyder 15689	Wood. & Goyder 15689	Wood. & Goyder 15689	Rapini 1875	Rapini 1875

<i>Hemipogon carassensis</i> (Malme) Rapini	Rapini 1364	Rapini 1364	Rapini 1364	Rapini 1364	Rapini 1364	-
<i>Hemipogon harleyi</i> Fontella	Rapini 1410	Rapini 1410	Rapini 1410	-	Rapini 1410	Rapini 1410
<i>Hemipogon hatschbachii</i> (Fontella & Marquete) Rapini	Ribeiro 268	Ribeiro 268	Ribeiro 268	-	Ribeiro 268	-
<i>Hemipogon hemipogonoides</i> (Malme) Rapini	Rapini 1373	Rapini 1373	Rapini 1373	Rapini 1373	Rapini 1373	-
<i>Hemipogon luteus</i> E.Fourn.	-	DQ 026769	AJ 704489	-	Rapini 1384	-
<i>Hemipogon sprucei</i> E.Fourn.	Silva 106	Silva 106	AJ 704296	Silva 106	Silva 106	-
<i>M. abortiva</i> (E. Fourn.) Rapini	Ribeiro 300	Ribeiro 300	Ribeiro 300	-	Ribeiro 300	Ribeiro 300
<i>M. acerosa</i> (Mart.) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 183	-	Ribeiro 183	Ribeiro 183	Rapini 383	Ribeiro 183
<i>M. campanuliflora</i> Rapini	Azevedo 339	Azevedo 339	Azevedo 339	Azevedo 339	Azevedo 339	Azevedo 339
<i>M. cordata</i> (Turcz.) T.U.P.Konno & Rapini (BA)	Ribeiro 341	-	Ribeiro 341	-	Ribeiro 341	Ribeiro 341
<i>M. cordata</i> (Turcz.) T.U.P.Konno & Rapini (GO)	Ribeiro 398	Ribeiro 398	Ribeiro 398	-	-	Ribeiro 398
<i>M. cordata</i> var. <i>virgata</i> (VIR)	Ribeiro 113	-	Ribeiro 113	Ribeiro 113	Ribeiro 113	Ribeiro 113
<i>M. decussata</i> (Mart.) T.U.P. Konno & Rapini	Ribeiro 216	DQ 026758	AJ 704217	Ribeiro 216	Ribeiro 216	Ribeiro 216

<i>M. diamantinensis</i> (Fontella) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 218	Ribeiro 218	Ribeiro 218	-	Rapini 810	Ribeiro 218
<i>M. ditassoides</i> (Silveira) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 180	DQ 026759	AJ 704476	Ribeiro 180	Rapini 379	Ribeiro 180
<i>M. grazielae</i> (Fontella & Marquete) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 221	DQ 026760	AJ 699339	Ribeiro 221	Ribeiro 221	Ribeiro 221
<i>M. hemipogonoides</i> (E. Fourn.) T.U.P.Konno & Rapini	Rapini 1770	Rapini 1770	Rapini 1770	-	Rapini 1770	Rapini 1770
<i>M. louteigiae</i> (Fontella) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 197	-	Ribeiro 197	Ribeiro 197	Ribeiro 197	Ribeiro 197
<i>M. magisteriana</i> (Rapini) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 200	DQ 026763	AJ 704482	Ribeiro 200	Ribeiro 200	Ribeiro 200
<i>M. micromeria</i> (Decne.) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 186	Ribeiro 186	AJ 704225	Ribeiro 186	Ribeiro 186	Ribeiro 186
<i>M. parva</i> (Silveira) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 188	-	Ribeiro 188	-	Ribeiro 188	Ribeiro 188
<i>M. polygaloides</i> (Silveira) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 263	Ribeiro 263	Ribeiro 263	Ribeiro 263	Ribeiro 263	Ribeiro 263
<i>M. refractifolia</i> (K.Schum.) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 225	Ribeiro 225	Ribeiro 225	Ribeiro 225	Ribeiro 225	Ribeiro 225
<i>M. semirii</i> (Fontella) T.U.P.Konno & Rapini	Ribeiro 336	Ribeiro 336	Ribeiro 336	Ribeiro 336	Ribeiro 336	Ribeiro 336
<i>Nephradenia acerosa</i> Decne.	Silva 118	DQ 026775	AJ 704496	Silva 118	Silva 118	Silva 118

<i>Nephradenia asparagoides</i> (Decne.) E.Fourn.	Silva 1	Silva 1	Silva 1	Silva 1	Silva 1	Silva 1
<i>Nephradenia filipes</i> Malme	Silva 110	Silva 110	Silva 110	Silva 110	Silva 110	Silva 110
<i>Petalostelma martianum</i> E. Fourn.	Silva 127	Silva 127	Silva 127	Silva 127	Silva 127	-

## **Capítulo 3**

**Diversificação na Cadeia do Espinhaço com base na  
biogeografia de um gênero predominantemente  
endêmico dos campos rupestres**

## **Diversificação na Cadeia do Espinhaço com base na biogeografia de um gênero predominantemente endêmico dos campos rupestres**

### **RESUMO**

**Objetivo** Nosso objetivo foi entender a origem e manutenção dos endemismos na Cadeia do Espinhaço e avaliar a influência das oscilações climáticas do Pleistoceno na diversificação da flora de seus campos rupestres a partir do estudo biogeográfico do gênero *Minaria* (Apocynaceae).

**Localidade** América do Sul, especialmente Cadeia do Espinhaço e Brasil Central.

**Métodos** *Minaria* inclui 21 espécies, 75% delas endêmicas da Cadeia do Espinhaço. Suas linhagens foram datadas com base em dados moleculares (plastidiais: *psbA*, *trnE-Y*, *trnS-G* e *rps16*; e nucleares: ITS e ETS) no BEAST. Foi realizada a reconstrução da distribuição ancestral das linhagens no S-DIVA e uma análise da divergência ecológica entre clados no SEEVA a partir de uma árvore com todas as espécies do gênero produzida por inferência bayesiana no MrBayes.

**Resultados** *Minaria* surgiu no início do Plioceno e se manteve confinado à Cadeia do Espinhaço por ca. 4 Milhões de anos (Ma). O bloco Norte, na Bahia, e o bloco Sul, em Minas Gerais, se isolaram e a irradiação de *Minaria* ocorreu durante o Pleistoceno, após um curto período de expansão há ca. 1,4 Ma, quando a linhagem se dispersou a partir da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais pelos cerrados do Brasil Central. Essa distribuição foi logo reduzida, dando origem a isolados geográficos, vários dos quais representam espécies endêmicas à Cadeia do Espinhaço. Duas linhagens do Planalto de Diamantina se dispersaram há ca. 400 mil anos e apresentam ampla distribuição atualmente.

### **Principais conclusões**

A biogeografia de *Minaria* é marcada por um longo período de isolamento na Cadeia do Espinhaço e uma tendência à retração de sua distribuição em paralelo ao resfriamento e aumento da aridez global durante o Neogeno, não caracterizando um padrão cíclico



correspondente às flutuações climáticas do Pleistoceno. Aparentemente, a altitude e o substrato litólico dos topos de morro da Cadeia do Espinhaço proporcionam ambientes estáveis, com estações secas menos intensas e menor incidência do fogo, oferecendo abrigo para linhagens com alta conservação filogenética do nicho e que se tornaram endêmicas dessas ilhas de vegetação em meio aos afloramentos rochosos.

**Palavras-chave**

Apocynaceae, *Minaria*, endemismos, especiação, irradiação, Pleistoceno.

\* Manuscrito formatado para a revista *Journal of Biogeography*.

## INTRODUÇÃO

A Cadeia do Espinhaço é uma região montanhosa com cerca de 1.000 km de extensão no sentido Norte-Sul, amplamente conhecida pela flora rica e singular, com altas taxas de endemismos. Disposta grosseiramente em forma de “S”, ela ocupa uma área de aproximadamente 120.000 km<sup>2</sup>, nos Estados de Minas Gerais e Bahia, leste do Brasil, e está situada no vértice de três biomas muito distintos. Sua porção sul localiza-se no limite entre dois *hotspots*, a Mata Atlântica a leste e o Cerrado a oeste, e sua porção norte está inserida na Caatinga (Fig. 1). No entanto, a vegetação encontrada ao longo da Cadeia é bastante particular, sendo conhecida por ‘campos rupestres’. Semelhante a um cerrado herbáceo-subarbustivo, essa fitofisionomia está intimamente associada aos solos litólicos quártzicos que geralmente surgem a partir de 900 m de altitude e compreende um mosaico de comunidades determinadas principalmente pela profundidade dos solos (Conceição & Pirani, 2005) e disponibilidade hídrica (Assis *et al.*, 2011).

O Espinhaço surgiu no final do Paleoproterozóico (1.752 Milhões de anos – Ma) e culminou com dobramentos e superposições causadas por pressões no sentido Leste-Oeste no final do Neoproterozóico (900 Ma) (Almeida Abreu & Pflug, 1994). Atividades tectônicas estiveram presentes durante toda sua formação, mas a estabilidade geomorfológica foi alcançada já há algum tempo e o relevo tem sido mais recentemente moldado principalmente por processos erosivos (Saadi, 1995; Pedreira, 1997). Os solos são pobres e extremamente ácidos, frequentemente formando depósitos de areia (Harley, 1995). O clima pode ser considerado do tipo *Cwb* (Köppen, 1931), com uma estação seca no inverno. As condições de solo, as variações de temperatura e vento, as restrições hídricas e o regime do fogo favoreceram o aparecimento de convergências morfológicas, e a vegetação se apresenta tipicamente escleromórfica (Giulietti *et al.*, 1997).

Apesar de ocupar menos de 1,5% do território nacional, a Cadeia do Espinhaço abriga cerca de 4.000 espécies de angiospermas (Giulietti *et al.*, 1997), o que representa aproximadamente 10% de toda a flora reportada para o Brasil. Em média, 30% das espécies são endêmicas (Giulietti *et al.*, 1987), mas em algumas famílias, como Eriocaulaceae, a taxa de endemismo pode chegar a 85% (Costa *et al.*, 2008). A fragmentação dos campos rupestres ao longo do Espinhaço é causada por vales e grandes depressões, permitindo diversos níveis de endemismos, enquanto a heterogeneidade de microhabitats proporciona

disjunções em pequena escala e a subestruturação das populações (e.g. Borba *et al.*, 2001; Jesus *et al.*, 2001, 2009; Franceschinelli *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008).

A principal explicação para a origem da diversidade florística encontrada na Cadeia do Espinhaço é a sucessão de contrações e expansões dos campos rupestres promovida pelas oscilações climáticas do Pleistoceno (Harley, 1988; Alves & Kolbek, 1994; Harley, 1995; Giuliatti *et al.*, 1997; Rapini *et al.*, 2008). Segundo esse modelo, as porções altas da Cadeia do Espinhaço representariam refúgios para a flora campestre durante os períodos interglaciais. Nos períodos glaciais, as florestas é que se retraíam, permitindo a expansão dos campos para as regiões mais baixas. Essas oscilações levariam à diferenciação entre as populações vicariantes dos campos rupestres durante os períodos quentes e úmidos e possibilitariam o fluxo gênico entre elas durante os períodos frios e secos.

Neste estudo, nós avaliamos a dinâmica da flora dos campos rupestres com base na biogeografia histórica de *Minaria* T.U.P. Konno & Rapini (Apocynaceae). O gênero representa uma linhagem predominantemente composta por espécies com distribuição restrita aos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. Dessa maneira, os padrões detectados para o grupo devem refletir os padrões biogeográficos gerais que marcaram a história da flora na Cadeia do Espinhaço.

O gênero *Minaria* foi reconhecido a partir de estudos filogenéticos baseados em dados plastidiais (Konno *et al.*, 2006; Rapini *et al.*, 2006). Originalmente, o gênero incluía 19 espécies, todas presentes na Cadeia do Espinhaço e a maioria endêmica de sua porção sul, em Minas Gerais. Estudos mais abrangentes (Silva *et al.*, submetido; Capítulos 1 e 2), no entanto, mostraram que o gênero deveria ser expandido de modo a incluir mais duas espécies; neste caso, porém, endêmicas do norte da Cadeia do Espinhaço, na Bahia. Segundo a atual circunscrição, o gênero inclui 21 espécies e 75% delas são endêmicas da Cadeia do Espinhaço. São geralmente arbustos com folhas diminutas, exceto '*Hemipogon harleyi*', que é volúvel e possui folhas lineares. As flores podem variar bastante, tanto em relação ao formato e indumento da corola, como em relação à corona, que pode ser simples, dupla, ou mesmo estar ausente. Os folicários geralmente produzem várias sementes comosas, como é típico em Asclepiadoideae, porém algumas espécies de *Minaria*

produzem apenas uma ou duas sementes por folicário, as quais podem ser desprovidas de coma.

Nosso principal objetivo foi verificar se a evolução de *Minaria* se adequa ao modelo cíclico utilizado para explicar a grande diversidade e as altas taxas de endemismos da Cadeia do Espinhaço e inferir fatores e processos que podem estar envolvidos na diversificação do grupo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Datação**

Como são poucos os fósseis em Apocynaceae, a datação das linhagens de *Minaria* foi calibrada com base na idade estimada para o clado Metastelmatinae. Para obtermos essa idade refizemos a datação de Apocynaceae, combinando a matriz de *trnL-F* (intron *trnL* e espaçador *trnL-F*) utilizada por Rapini *et al.* (2007; 216 táxons, mais concentrada em Asclepiadoideae) com aquela utilizada por Livshultz (2010; 71 táxons, mais concentrada nas demais subfamílias de Apocynaceae). Oito táxons adicionais foram utilizados, quatro de Rauvolfioideae (GenBank) e quatro de Metastelmatinae (Silva *et al.*, submetido), gerando uma matriz com 295 táxons e 1.471 caracteres. Uma versão simplificada desta matriz, com apenas 99 táxons representando os principais clados da família, também foi produzida dada a dificuldade de calcular o smoothing para a matriz de com 295 táxons. As idades foram calculadas a partir de NPRS (*Non-Parametric Rate Smoothing*) e PL (*Penalized Likelihood*) no programa r8s (Sanderson, 1997, 2002), com base no comprimento dos ramos das árvores mais verossímeis obtidas no RaxML (Stamatakis, 2006). Dois registros fósseis foram utilizados para calibrar a idade mínima de (1) ramo APSA (Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae) no Eoceno Médio (47 Ma), baseado nas sementes comosas de *Aspidospermum* (Collinson *et al.*, 2010), e (2) de Periplocoideae no limite entre o Oligoceno e o Mioceno (23,03 Ma), baseado em fósseis de tétrades de *Polyporotetradites* (Muller, 1981).

A datação das linhagens de Metastelmatinae e *Minaria* foi realizada com base na matriz combinada de dados plastidiais (*psbA*, *trnE-Y*, *trnS-G* e *rps16*) e nucleares (ITS e ETS) com amostragem de 41 táxons (Capítulo 2) no programa BEAST v. 1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007). Utilizou-se o modelo GTR de substituição nucleotídica,

com distribuição gamma e sítios invariantes (GTR + I + G), modelo de relógio molecular relaxado lognormal não correlacionado e uma árvore anterior com modelo de especiação de Yule. A árvore foi calibrada em Metastelmatinae (*crown group*), conforme a idade estimada para este grupo na análise de NPRS com 295 táxons para Apocynaceae (acima). As cadeias de Monte Carlo – Markov foram corridas para  $10^7$  gerações, salvando as hipóteses a cada 1.000 gerações. Os arquivos de saída da corrida foram visualizados usando o TRACER (Rambaut & Drummond, 2007). O resultado da corrida foi sumarizado em uma árvore de máxima credibilidade dos clados no módulo TreeAnnotator do BEAST. O cronograma foi visualizado e editado no FigTree v. 1.2.2 (Rambaut, 2009).

### **Análises biogeográficas**

A árvore utilizada nas análises ecológicas e biogeográficas foi produzida a partir da análise bayesiana com base na evidência total, incluindo dados moleculares e morfológicos de *Minaria* (Capítulo 2). Nesta árvore *Minaria bifurcata* (Rapini) T.U.P. Konno & Rapini, *M. inconspicua* (Rapini) Rapini e *M. monocoronata* (Rapini) T.U.P. Konno & Rapini foram amostradas apenas por dados morfológicos. Os dados de distribuição geográfica das espécies foram obtidos com base em 762 espécimes de herbários nacionais e internacionais. Apenas materiais com localizações precisas foram considerados, priorizando aqueles com informações completas sobre localização ou coordenadas geográficas. Todas as localidades foram confirmadas ou tiveram suas coordenadas obtidas com auxílio do Google Earth (© 2010 Google). Excursões à Cadeia do Espinhaço, ao Brasil Central e às serras do Nordeste e Sul do Brasil foram realizadas para amostragem das espécies e confirmação de coordenadas geográficas.

Os pontos foram plotados em um mapa hipsométrico, de maneira a mostrar a descontinuidade do relevo montanhoso, pois as espécies de *Minaria* tendem a ocorrer em altitudes acima de 800 m. Uma base de dados de bacias hidrográficas Otto-codificadas nos níveis 3 e 4 de detalhamento (Agência Nacional de Águas – ANA 2011) foi utilizada para cruzar dados de distribuição das espécies e do relevo brasileiro. O cruzamento dessas bases de dados e a observação de aspectos bióticos e abióticos, como geomorfologia, microbacias, conectividade geográfica e presença de endemismos permitiram a delimitação de 10 unidades biogeográficas para *Minaria* (Fig. 1):

**A (Sincorá – SIN)** – Serra do Sincorá, localizada no leste da Chapada Diamantina, na Bacia do Rio Paraguaçu, separada da área B pelo vale do Rio de Contas (15-30 km larg.);

**B (Rio de Contas – RCO)** – Serras dos Rios de Contas e das Almas, no sudoeste da Chapada Diamantina, banhada pela Bacia do Rio de Contas e marcada pelo endemismo de '*Barjonia harleyi* Fontella;

**C (Grão Mogol – GMO)** – serras descontínuas no norte de Minas Gerais, até próximo à divisa com o Estado da Bahia, banhada pela Bacia do Rio Jequitinhonha, correspondendo à parte do planalto setentrional do Espinhaço mineiro (Saadi, 1995) e compostas por rochas quartzíticas e gnáissicas do Grupo Macaúbas;

**D (Serra do Cabral – SCA)** – unidade montanhosa a oeste da Cadeia do Espinhaço, banhada exclusivamente pela Bacia do Rio São Francisco, abrigando uma espécie incomum ao Espinhaço, *Minaria lourteigiae* (Fontella) T.U.P.Konno & Rapini, dentre outras comuns;

**E (Planalto de Diamantina – PDI)** – platô de rochas quartzíticas do Supergrupo Espinhaço, compreendida pelas Bacias do Rio Araçá, no limite sul da Bacia do Rio Jequitinhonha, e do Rio das Velhas, sendo marcada pelos endemismos de *Minaria grazielae* (Fontella & Marquete) T.U.P.Konno & Rapini, *M. inconspicua* (Rapini) Rapini, *M. diamantinensis* (Fontella) T.U.P.Konno & Rapini, *M. bifurcata* (Rapini) T.U.P.Konno & Rapini, *M. campanuliflora* Rapini e *M. refractifolia* (K.Schum.) T.U.P.Konno & Rapini;

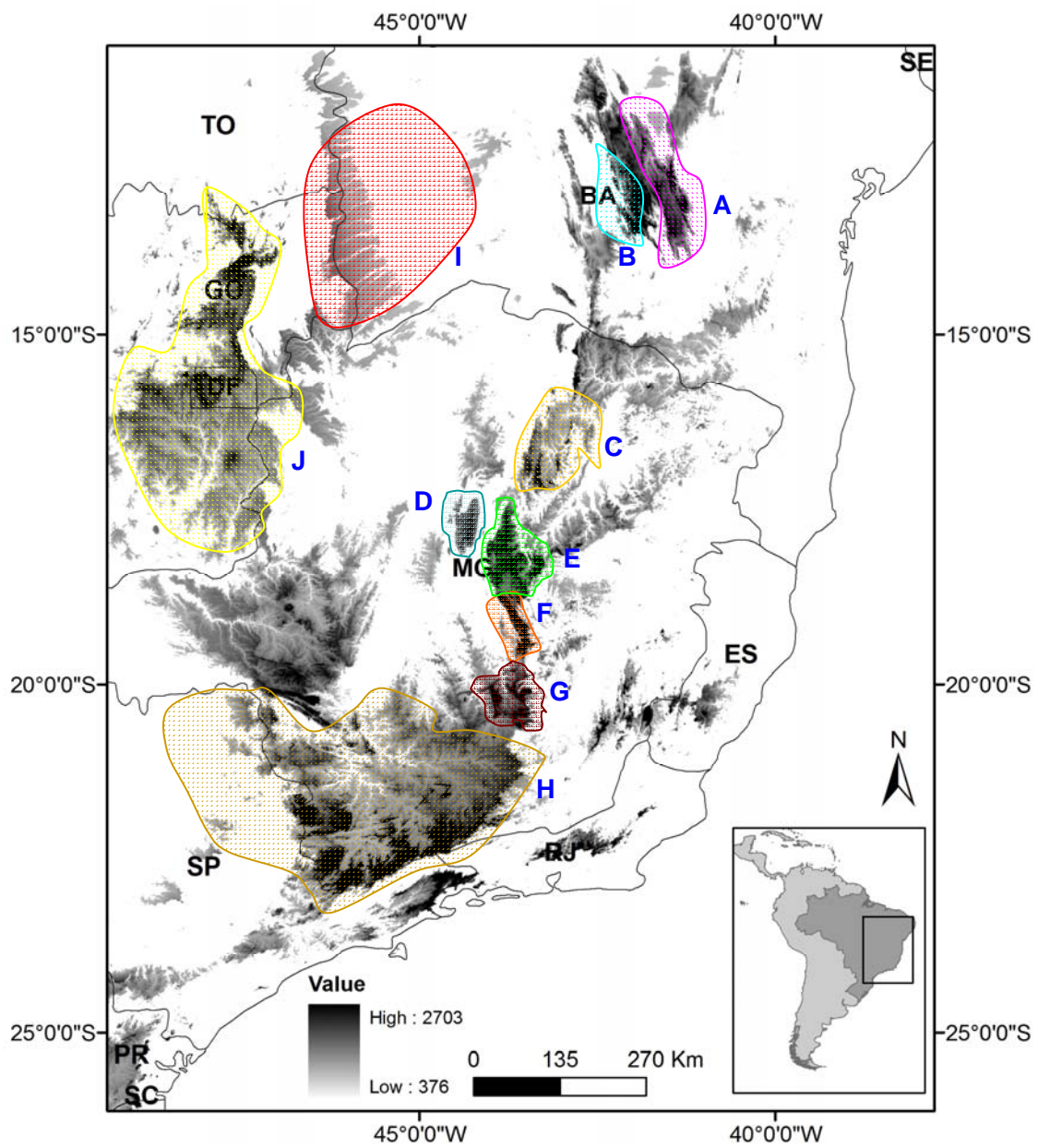
**F (Serra do Cipó – CIP)** – porção estreita do Espinhaço meridional, localizada na confluência entre as Bacias do Rio Santo Antônio, afluente do rio Doce, e do Rio das Velhas, marcada pelo endemismo de *Minaria hemipogonoides* (E.Fourn.) T.U.P.Konno & Rapini, *M. magisteriana* T.U.P.Konno & Rapini, *M. polygaloides* (Silveira) T.U.P.Konno & Rapini e *M. semirii* (Fontella) T.U.P.Konno & Rapini;

**G (Sul do Espinhaço – SER)** – extremo sul da confluência entre as Bacias dos Rios São Francisco e Doce, na porção final do Supergrupo Espinhaço;

**H (Bacia do Rio Paraná – BPA)** – região sul de Minas Gerais até o norte do Estado de São Paulo, dentro da Bacia do Rio Paraná;

**I (Cerrado Baiano – CBA)** – região de cerrado de altitude no oeste do Estado da Bahia, sobre a Bacia do Rio São Francisco;

**J (Cerrado Goiano – CGO)** – região de cerrado de altitude no Brasil Central, na confluência entre as Bacias dos Rios São Francisco (leste), Tocantins (norte) e Paraná (sul).



**Figura 1.** Mapa das principais áreas de distribuição de *Minaria* no Brasil. Área A, Serra do Sincorá; B, Rio de Contas; C, Grão Mogol; D, Serra do Cabral; E, Planalto de Diamantina; F, Serra do Cipó; G, sul da Cadeia do Espinhaço; H, sul de Minas Gerais na Bacia do Rio Paraná; I, Cerrado da Bahia; J, Cerrado de Goiás.

A biogeografia histórica espacial de *Minaria* foi investigada a partir de uma análise estatística de dispersão-vicariância (S-DIVA) implementada no RASP v. 1.107 (Yu *et al.*, 2010, 2011). Utilizou-se a árvore de evidência total e a matriz de distribuição das espécies de *Minaria* com base nas 10 unidades biogeográficas. Estabeleceu-se o máximo de quatro áreas ancestrais e calculou-se a incerteza das hipóteses de ancestralidade a partir do conjunto de 6.000 árvores geradas após a estabilização dos valores de Verossimilhança na análise Bayesiana.

A partir da distribuição das espécies, padrões de variáveis ambientais entre clados foram analisados no programa SEEVA v. 1.01 (Heiberg, 2008). Dados de 20 variáveis climáticas e de altitude das localidades de ocorrência dos espécimes foram coletados no WordClim (Hijmans *et al.*, 2005). Dados de geomorfologia foram extraídos do site oficial do IBAMA (IBAMA, 2011) e de solos do site do Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2011). O conjunto de dados das variáveis ambientais (22 variáveis) foi cruzado com a distribuição geográfica e a árvore de *Minaria*, revelando a divergência ecológica em cada nó. Foram consideradas relevantes as variáveis significativas ( $P < 0.0023$ ; gerados segundo correção de Bonferroni para 22 terminais) para os índices de divergência  $D > 0.75$ .

## RESULTADOS

As idades neste estudo foram bem mais recentes do que aquelas estimadas em Rapini *et al.* (2007) (Tabela 1; Suppl., Figs. S1, S2, S3), o que pode estar relacionado à nova calibração, mas também ao aumento da amostragem, principalmente em Rauvolfioideae, Apocynoideae e Periplocoideae. As estimativas obtidas com NPRS e PL baseadas na mesma amostragem ( $n = 99$ ) foram similares, porém não foi possível calcular o valor de ‘smoothing’ para a árvore com 295 táxons de Apocynaceae. Por outro lado, as estimativas baseadas em uma amostragem mais densa (NPRS: 295 vs. 99) tenderam a ser menores. As idades médias obtidas para Metastelmatinae foram similares (6,31-7,47 Ma). Para estimar as idades na subtribo, foi utilizado 7,47 Ma para calibrar o nó do grupo, conforme estimado pela análise com amostragem mais ampla na análise de NPRS.



**Tabela 1.** Tempo de divergência estimado para grupos de Apocynaceae em Milhões de anos, usando diferentes métodos (NPRS= non-parametric rate smoothing e PL= penalized likelihood) e com diferentes amostragens (n = número de táxons). MOG = Metastelmatinae + Oxypetalinae + Gonolobinae (clado *sensu* Rapini *et al.*, 2003). NPRS n = 295 (Suppl., Fig. S1); NPRS n=216 (Rapini *et al.*, 2007); NPRS n = 295 (Suppl., Fig. S2); PL n = 295 (valor de *smoothing* =  $58 \times 10^6$ ; Suppl., Fig. S3).

<b>Clado</b>	<b>NPRS n = 295</b>	<b>NPRS n = 216</b>	<b>NPRS n = 99</b>	<b>PL n = 99</b>
<b>Asclepiadoideae</b>	<b>18,47</b>	<b>38</b>	<b>25,88</b>	<b>25,71</b>
<b>Asclepiadeae</b>	<b>16,99</b>	<b>35</b>	<b>23,33</b>	<b>23,9</b>
<b>MOG</b>	<b>13,51</b>	<b>32</b>	<b>17,85</b>	<b>17,4</b>
<b>Metastelmatinae</b>	<b>7,47</b>	<b>17</b>	<b>7,43</b>	<b>6,31</b>

Dada a distribuição atual dos táxons de Metastelmatinae analisados e a reconstrução da distribuição de *Minaria* no S-DIVA, um cenário biogeográfico é apresentado sobre o cronograma da subtribo (Fig. 2). Metastelmatinae surgiu nos cerrados, durante o Mioceno Médio (ca. 7 Ma) e diversificou-se pouco e lentamente nos primeiros milhões de anos que sucederam sua origem. A linhagem expandiu seu nicho original, além das áreas de altitude da Cadeia do Espinhaço, a partir de 2 Ma, quando passou a ocupar também as florestas secas, no Nordeste do Brasil (*Ditassa capillaris* E. Fourn. e *Nephradenia asparagoides* (Decne.) E. Fourn.), e a Mata Atlântica, na costa leste (*Ditassa burchellii* Hook & Arn. e *D. banksii* R. Br. ex Schult.).

*Minaria* surgiu na Cadeia do Espinhaço há ca. 4 Ma (Fig. 2 e Suppl., Fig. S4) e um evento de cladogênese deve ter dado origem a duas linhagens com ampla distribuição pela Cadeia do Espinhaço (Suppl., Fig. S5, nó 1). As populações nos blocos da Bahia e de Minas Gerais ficaram isoladas e uma dessas duas linhagens se extinguiu na Bahia, sendo atualmente representada apenas por duas espécies microendêmicas vicariantes no bloco mineiro (nó 2): *M. polygaloides* (Silveira) T.U.P. Konno & Rapini, ocorrendo principalmente na Serra do Cipó, e *M. inconspicua*, ocorrendo no Planalto de Diamantina. A outra linhagem está representada pelos dois clados vicariantes entre os blocos do Espinhaço. O clado da Bahia (nó 4) conta apenas com '*Barjonia*' *harleyi* e '*Hemipogon*' *harleyi*, cuja divergência iniciou-se há ca. 2,5 Ma (Fig. 2; Suppl., Fig. S4). O clado de Minas Gerais (nó 5) conta com 17 das 21 espécies de *Minaria* e representa o núcleo do gênero. Enquanto esta linhagem se dispersava pela primeira vez para fora da Cadeia do

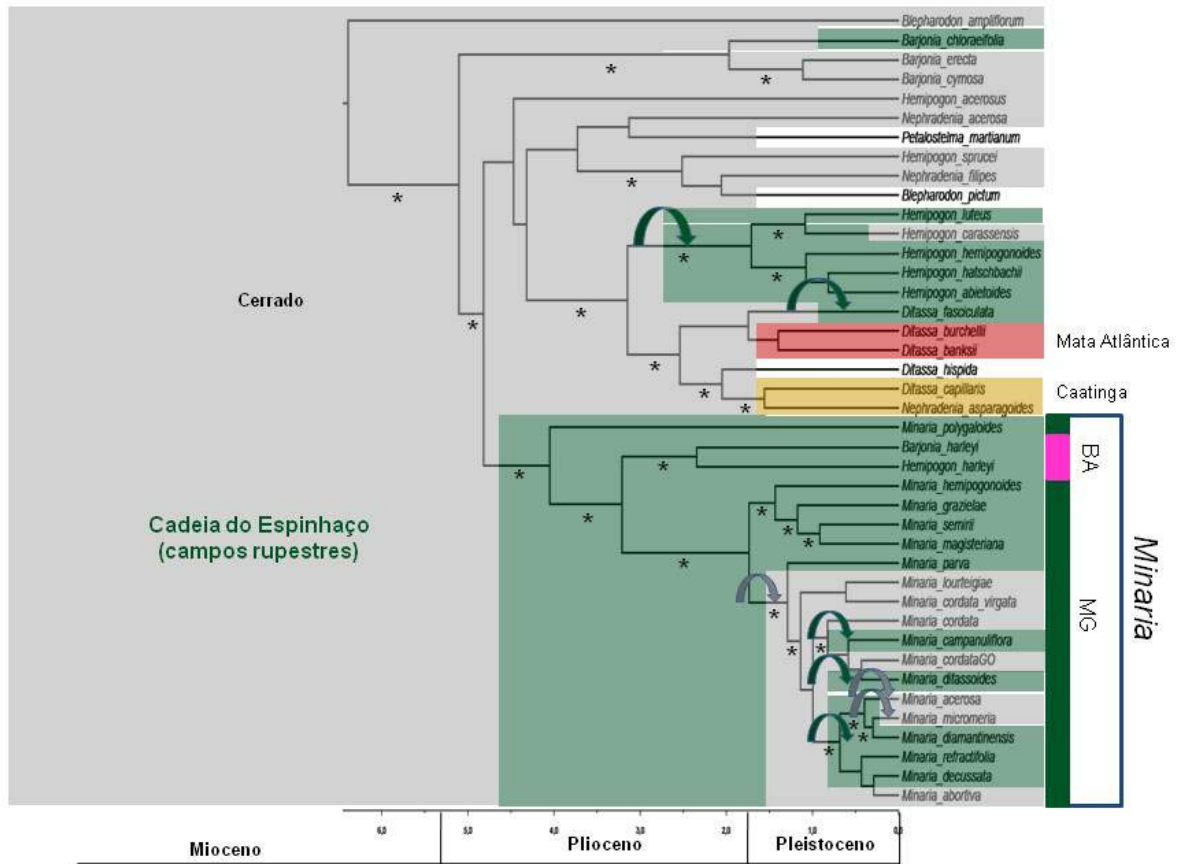
Espinhaço, após um confinamento de aproximadamente 4 Ma (Fig. 2), uma de suas populações se diferenciava na Serra do Cipó (Suppl., Fig. S5, nó 6).

A linhagem que se originou na Serra do Cipó (nó 6) é caracterizada pelo hábito rupícola, os frutos com 1 ou 2 sementes apenas e pelas sementes desprovidas de coma. Ainda assim, ela alcançou o Planalto de Diamantina e, em seguida, as cangas no sul da Cadeia do Espinhaço, onde é hoje representada por *M. monocoronata*. Novas retrações na distribuição dessa linhagem levariam, então, à formação de mais cinco espécies microendêmicas, três na Serra do Cipó (*M. hemipogonoides* (E. Fourn.) T.U.P.Konno & Rapini, *M. magisteriana* (Rapini) T.U.P.Konno & Rapini e *M. semirii* (Fontella) T.U.P.Konno & Rapini) e duas no Planalto de Diamantina (*M. bifurcata* e *M. graziellae* (Fontella & Marquete) T.U.P.Konno & Rapini). Apesar de ter ampliado sua distribuição por volta de 1,4 Ma, essa linhagem nunca foi capaz de deixar a Cadeia do Espinhaço.

A outra linhagem do núcleo de *Minaria* (nó 11) tornou-se amplamente distribuída, ocupando áreas de cerrado no Brasil Central e campos rupestres no norte do Espinhaço, na Bahia, e fora dele também, como na Chapada dos Veadeiros, em Goiás. Essa expansão foi sucedida por uma nova tendência à retração, o que deu origem a espécies com distribuição disjunta ou de distribuição mais restrita. Algumas continuam dispersas no norte da Cadeia do Espinhaço e nos cerrados do Brasil Central, como *M. cordata* (Turcz.) T.U.P.Konno & Rapini e táxons afins (incluindo *M. lourteigiae* (Fontella) T.U.P. Konno & Rapini e *M. abortiva* (E. Fourn.) Rapini), conseguindo também colonizar áreas de restingas mais recentemente, enquanto outras ficaram restritas à Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais (*M. ditassoides* (Silveira) T.U.P. Konno & Rapini e *M. decussata* (Mart.) T.U.P. Konno & Rapini) ou mais frequentemente apenas ao Planalto de Diamantina (*M. campanuliflora* Rapini, *M. diamantinensis* (Fontella) T.U.P. Konno & Rapini e *M. refractifolia* (K.Schum.) T.U.P. Konno & Rapini).

Por volta de 400 mil anos, duas espécies conseguiram se dispersar a partir do Planalto de Diamantina e alcançaram novamente os cerrados do Brasil Central (*Minaria micromeria* (Decne.) T.U.P. Konno & Rapini), os campos rupestres do Espinhaço da Bahia, as restingas do Espírito Santo, os cerrados do Piauí e do Maranhão, alcançando a Bolívia, e os cerrados do Paraná, atingindo o Rio Grande do Sul e a Argentina (*M. acerosa* (Mart.) T.U.P. Konno & Rapini).

As linhagens vicariantes endêmicas do Planalto de Diamantina e da Serra do Cipó (Suppl., Fig. S5, nós 2 e 9) apresentaram as maiores quantidades de variáveis com divergência ecológica relevante (Tabela 2), as quais estão relacionadas à precipitação e à temperatura. A divergência de *M. monocoronata* está associada à ocupação de uma área de solo ferruginoso (vs. quartzítico), com precipitação anual e da zona mais quente mais intensa. O tipo de solo e variáveis de temperatura sustenta a divergência das linhagens do complexo *M. cordata*, distribuídas principalmente entre a Cadeia do Espinhaço e os cerrados do Brasil Central. *Minaria abortiva*, outra linhagem do complexo *M. cordata*, mas que geneticamente está próxima das espécies de folhas acerosas, encontra-se isolada geograficamente ao sul de Minas Gerais, habitando uma área com precipitação anual mais alta.



**Figura 2.** Cronograma de Metastelmatinae baseado na matriz combinada (plastídio e nuclear) obtido pelo BEAST. O Cenário biogeográfico foi construído com base nos clados sustentados (\* ver Capítulo 2, Fig 6). Verde indica distribuição endêmica à Cadeia do Espinhaço, cinza espécies que ocorrem no Cerrado e eventualmente no Espinhaço, branco espécies de ampla distribuição. As setas indicam eventos de dispersão para o Cerrado (cinza) e para a Cadeia do Espinhaço (verde). Em *Minaria*, a barra vertical indica a distribuição dos táxons em relação aos dois grandes blocos do Espinhaço, em verde Minas Gerais (MG) e em rosa Bahia (BA). As idades foram convertidas para idades absolutas com base na escala de Gradstein *et al.* (2004).

**Tabela 2.** Resumo dos resultados SEEVA por variável/nó. Os valores correspondem ao índice de divergência D. Os valores marcados em cinza apresentam valor de diferença  $D \geq 0,75$  para a significância  $p \leq 0,0023$  (após correção de Bonferroni). Para a posição dos nós veja Suppl. Fig. S5.

Variáveis/Nó	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Altitude	0,33	0,29	0,17	0,6	0,21	0,53	0,28	0,24	0,11	0,3	0,06	0,27	0,47	0,01	0,06	0,67	0	0,21	0,62	0,52	0,13	0,33
Precipitação anual	0,43	1,0	0,61	0	0,24	0,47	0,24	1,0	1,0	0	0,25	0,5	0,07	0,26	0,1	0,26	1,0	0,11	0,82	0,32	0,22	0,57
Precip. mês mais chuvoso	0,45	1,0	0,6	0	0,35	0,45	0,27	0,34	0,83	0	0,13	0,35	0,9	0,06	0,28	0,38	0	0,15	0,51	0,38	0,28	0,26
Precip. mês mais seco	0,52	1,0	0,09	0,71	0,36	0,22	0,24	0,6	0,73	0	0,22	0,09	0,58	0,2	0,23	0,55	1,0	0,04	0,47	0,45	0,39	0,25
Sazonalidade da precipitação	0,46	0,97	0,6	0	0,26	0,26	0,33	0,48	1,0	0	0,2	0,31	0,69	0,05	0,69	0,4	1,0	0,37	0,55	0,52	0,17	0,22
Precip. estação mais chuvosa	0,45	1,0	0,6	0	0,29	0,41	0,39	0,13	1,0	0	0,13	0,33	0,91	0,05	0,17	0,42	1,0	0,14	0,57	0,31	0,27	0,38
Precip. estação mais seca	0,53	1,0	0,06	1,0	0,3	0,21	0,29	0,54	0,88	0,08	0,29	0,16	0,51	0,16	0,18	0,45	1,0	0,05	0,48	0,57	0,35	0,33
Precip. estação mais quente	0,49	1,0	0,6	0	0,3	0,53	0,24	1,0	1,0	0	0,18	0,32	1,0	0,18	0,39	0,33	1,0	0,15	0,64	0,33	0,03	0,8
Precip. estação mais fria	0,24	1,0	0,43	0,57	0,28	0,42	0,34	0,41	0,84	0,21	0,26	0,2	0,22	0,04	0,27	0,25	1,0	0,07	0,54	0,44	0,21	0,38
Variação média diurna	0,38	0,37	0,55	0,05	0,11	0,78	0,26	0,85	1,0	0,33	0,1	0,17	0,11	0,08	0	0,58	0	0,06	0,58	0,33	0,05	0,48
Isotermalidade	0,43	0,14	0,62	0	0,19	0,48	0,29	1,0	0,92	0	0,23	0,46	0,6	0,12	0,5	0,51	1,0	0,18	0,61	0,51	0,06	0,59
Sazonalidade da temperatura	0,42	0,17	0,6	0	0,31	0,55	0,21	0,02	0,93	0,21	0,16	0,39	0,69	0,22	0,61	0,41	1,0	0,16	0,61	0,26	0,19	0,2
Temp. máx. mês mais quente	0,44	0,96	0,19	0,71	0,15	0,49	0,31	0,56	0,96	0,04	0,12	0,11	0,13	0,14	0,17	0,68	1,0	0,28	0,53	0,5	0,07	0,51
Temp. máx. mês mais frio	0,43	0,96	0,23	1,0	0,33	0,43	0,3	0,52	1,0	0,05	0,19	0,1	0,32	0,18	0,37	0,37	1,0	0,24	0,55	0,41	0,07	0,42
Variação da temp. anual	0,31	0,09	0,54	0,05	0,29	0,45	0,27	0,13	1,0	0	0,11	0,27	0,7	0,12	0,45	0,5	1,0	0,01	0,58	0,15	0,05	0,37
Temp. méd. estação mais chuvosa	0,48	1,0	0,19	0,89	0,27	0,31	0,28	0,09	0,82	0,17	0,28	0,14	0,51	0,04	0,11	0,67	0,33	0,33	0,55	0,58	0,04	0,34
Temp. méd. estação mais seca	0,49	1,0	0,15	0,6	0,22	0,31	0,72	0,09	0,76	0,21	0,2	0,1	0,19	0,17	0,49	0,78	1,0	0,25	0,58	0,56	0,15	0,39
Temp. méd. estação mais quente	0,48	1,0	0,21	0,89	0,25	0,31	0,28	0,09	0,82	0,17	0,24	0,11	0,58	0,06	0,14	0,57	1,0	0,31	0,59	0,53	0,06	0,33
Temp. méd. estação mais fria	0,49	1,0	0,22	1,0	0,27	0,31	0,24	0,05	0,75	0,21	0,24	0,19	0,04	0,17	0,47	0,77	1,0	0,25	0,54	0,56	0,13	0,4
Temp. média anual	0,46	0,93	0,1	1,0	0,28	0,31	0,24	0,05	0,75	0,21	0,29	0,17	0,4	0,1	0,37	0,6	1,0	0,29	0,6	0,55	0,06	0,39
Geomorfologia	0,08	0,13	0,23	0	0,2	0,01	0,01	1,0	0	0	0,1	0,24	0,08	0,17	0,21	0,03	0,33	0,14	0,7	0,41	0,19	0,41
Solo	0,15	0,14	0,06	0,57	0,16	0,01	0,01	0,13	0,06	0,21	0,09	0,09	0,03	0,01	0,27	0,82	1,0	0,1	0,62	0,11	0,02	0,36

## DISCUSSÃO

### Diversificação de *Minaria*

Metastelmatinae emergiu no Mioceno (ca. 7,5 Ma), mas sua diversificação está concentrada no Plioceno, a partir de 4 Ma, coincidindo com as idades estimadas para outras linhagens de Cerrado (Simon *et al.*, 2009). *Minaria* surgiu na Cadeia do Espinhaço, aproximadamente neste mesmo período (ca. 4 Ma), e sua irradiação ocorreu no bloco Sul, em Minas Gerais, durante o Pleistoceno, a partir de 1,8 Ma. A conservação de nichos tem caracterizado a irradiação de vários grupos (Crisp *et al.*, 2009) e essa tendência é bem marcante em *Minaria*, que apresenta alta fidelidade aos campos rupestres. A linhagem se manteve reclusa à Cadeia do Espinhaço durante a maior parte de sua história e é lá que se encontra confinada a maior parte da diversidade do gênero. Não foram detectadas diferenças ecológicas em espécies simpátricas, nem tendências evolutivas que sugerissem adaptações à ocupação de novos ambientes. As diferenças ecológicas detectadas em *Minaria* estão restritas a cladogêneses relativamente recentes e geralmente refletem variações climáticas latitudinais de áreas ocupadas por linhagens vicariantes. Ainda assim, a escala de nossas análises ecológicas pode não ter resolução suficiente para detectar mudanças importantes de microhabitats.

Além da afinidade por solos de matriz quartizítica, a distribuição de *Minaria* está fortemente atrelada às condições ambientais. Sua distribuição tem sido governada basicamente por uma retração contínua (Fig. 3) em paralelo à tendência geral de resfriamento e aumento da aridez que caracterizou o clima do Quaternário (Zachos *et al.*, 2001). Os períodos de expansão foram raros e curtos, e o impacto deles na diversificação do grupo variou conforme o local e a capacidade de dispersão. A linhagem que ficou reclusa à Chapada Diamantina há quase 4 Ma nunca foi capaz de transpor a Caatinga e, atualmente, é representada apenas por '*Barjonia*' *harleyi* e '*Hemipogon*' *harleyi*. A divergência entre essas linhagens também é bem antiga, o que explica a morfologia discrepante entre elas. Ainda assim, as duas espécies possuem flores grandes em relação às demais do gênero. A razão mais provável para o isolamento dessa linhagem está na localização do bloco Norte da Cadeia do Espinhaço em uma região com sazonalidade acentuada, geralmente enfrentando até 6 meses de seca anual. Padrão semelhante de confinamento pode ser observado em outras linhagens de Asclepiadoideae. *Cynanchum morrenioides* Goyder, por exemplo, divergiu das demais Orthosiinae há ca. 11 Ma (Fig. S1) e está confinada ao Pico das Almas, também na Chapada Diamantina, enquanto seu grupo irmão encontra-se diversificado e amplamente distribuído pela região neotropical. Em ambos os casos, as linhagens são relativamente antigas e encontram-se restritas a pequenas áreas da Chapada

Diamantina, conferindo a essa região um alto endemismo filogenético, apesar da menor diversidade em número de espécies (Capítulo 1).

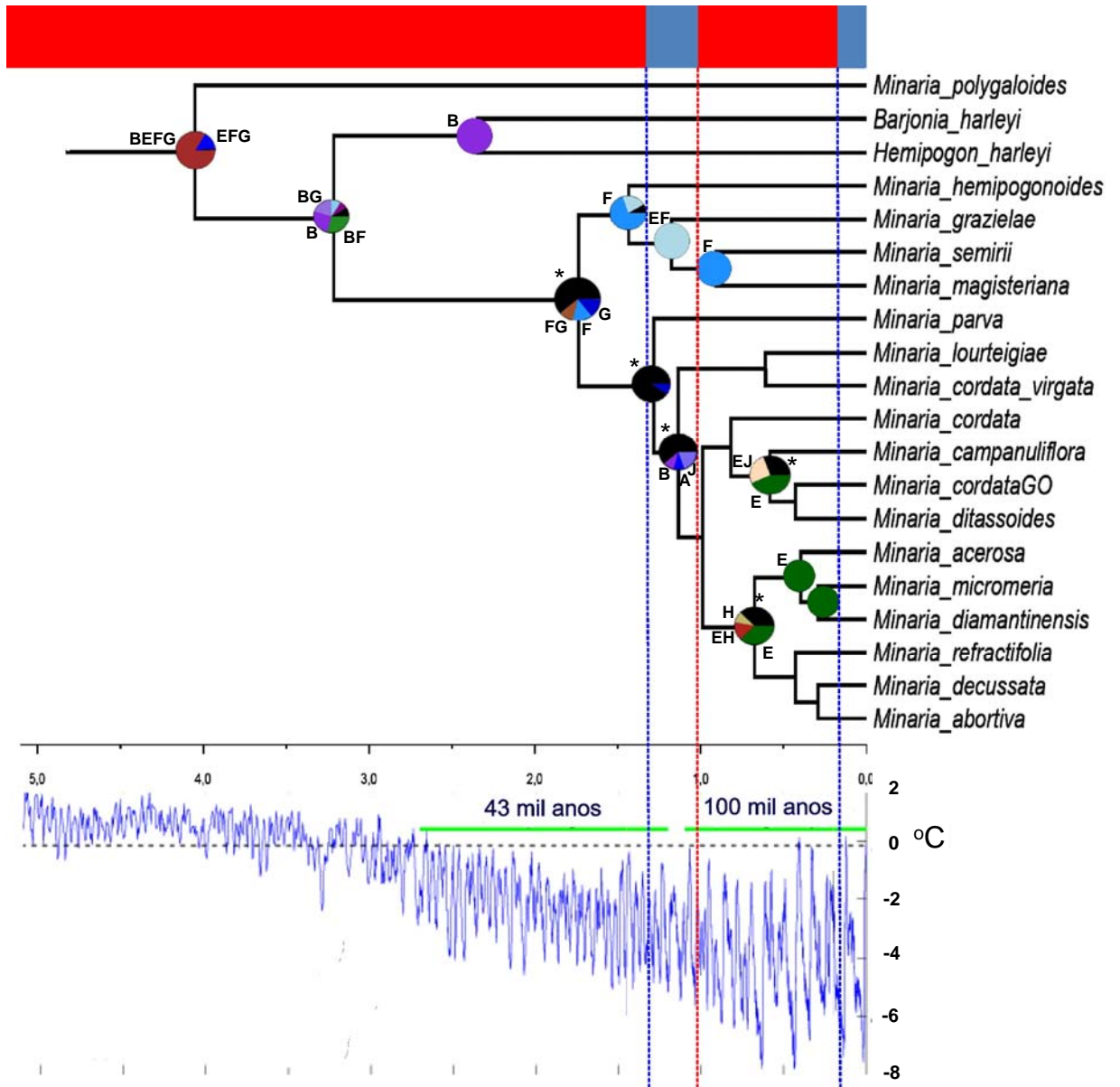
A perda da coma nas sementes parece ter limitado a expansão de um dos clados de *Minaria* do bloco Sul do Espinhaço. Essa linhagem se diferenciou na Serra do Cipó e foi capaz de ampliar sua distribuição, mas apenas ao longo da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, diferente do seu grupo-irmão, que colonizou rapidamente os cerrados do Planalto Central. Uma maior capacidade de dispersão aumenta as chances de colonização de novas áreas e é adaptativa em ambientes instáveis, porém uma dispersão limitada pode se mostrar vantajosa em ambientes estáveis (Dynesius & Jansson, 2000). As espécies de *Minaria* sem coma são especializadas em solos litólicos e a maioria das sementes acaba permanecendo nos arredores rochosos, não se perdendo em solos onde provavelmente não seriam recrutadas. As ilhas de vegetação nos afloramentos rochosos ocorrem geralmente nas porções mais altas do Espinhaço, onde a aridez das estações secas é amenizada pela umidade orográfica e a pouca quantidade de combustível impede o alastramento do fogo, formando ambientes relativamente estáveis, capazes de abrigar espécies sensíveis à aridez e à ação do fogo, muitas delas endêmicas (Neves & Conceição, 2010).

A dispersão do clado sem coma e do clado com coma teve extensão espacialmente distinta, porém foi cronologicamente coincidente, sugerindo que uma mudança no ambiente, há ca. 1,4 Ma tenha favorecido a expansão desses grupos. O aumento da distribuição dessas linhagens criou condições para que uma nova retração levasse à diversificação a partir de isolamentos geográficos, dando origem a espécies com distribuição restrita, várias delas endêmicas da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, principalmente do Planalto de Diamantina. Esse padrão ajuda a explicar a taxonomia complexa de *M. cordata* e espécies afins. Cerca de metade deste clado é composto por espécies vegetativamente semelhantes: subarbustos ramificados na base, com folhas cordadas, revolutas e levemente buladas. As flores podem ser bem discrepantes em algumas espécies (e.g., *M. campanuliflora*), porém a sobreposição dos caracteres florais pode impedir o reconhecimento claro de outras. Por este motivo, alguns táxons do complexo foram tratados no nível de subespécies (Fontella-Pereira, 1989) ou considerados sinônimos (Konno, 2005). No entanto, seus representantes não estão proximamente relacionados filogeneticamente, aparecendo dispersos na árvore de *Minaria*. A julgar pelo padrão biogeográfico encontrado no gênero, as semelhanças fenotípicas observadas no complexo *M. cordata* representam simplesiomorfias. Durante a retração dessa linhagem de *Minaria* houve a formação de isolados geográficos. Algumas linhagens se diferenciaram prontamente e podem ser atualmente reconhecidas como espécies distintas, enquanto outras mantiveram as características do ancestral que se dispersou para além do Espinhaço e por isso seus representantes acabam sendo

identificados como uma única espécie, *M. cordata*. Na Cadeia do Espinhaço, os representantes deste complexo podem ser claramente reconhecidos em espécies distintas (Rapini, 2010), sugerindo que a diferenciação morfológica, e até mesmo genética, possa ter sido mais rápida nesta região. Como as espécies de *Minaria* apresentam distribuição geralmente reduzida no Espinhaço, é possível que a deriva genética tenha exercido um papel importante na diferenciação dos isolados geográficos e na irradiação do grupo.

O segundo episódio de expansão em *Minaria* aconteceu nos últimos 400 mil anos, mais de 1 Ma depois do primeiro episódio. Duas linhagens se dispersaram a partir do Planalto de Diamantina, no bloco Sul da Cadeia do Espinhaço, e ocuparam o Brazil Central, uma delas chegando até a Bolívia e a Argentina. A distribuição atual de *M. acerosa* (Capítulo 4) sugere que essa dispersão pode ter ocorrido pelo sul do Espinhaço, alcançando inicialmente a Serra de São João del Rey e se expandindo então pelas áreas de cerrado do Planalto Central. Atualmente, as duas linhagens representam espécies de ampla distribuição, com várias populações disjuntas. No entanto, diferenciações morfológicas relevantes não foram observadas entre essas populações, indicando pouca estruturação entre elas ou uma disjunção recente (Capítulo 4).





**Figura 3.** Cronograma de *Minaria* baseado em dados combinados moleculares. Escala em milhões de anos atrás. Interpretação do período de retração (barra vermelha) e dispersão (barra azul). Gráficos de pizza indicam a probabilidade da distribuição ancestral e as letras indicam áreas mais prováveis de distribuição conforme Suppl. Fig. S5. As cores nas pizzas indicam áreas ou combinação delas identificadas pelas letras. Abaixo, gráfico de oscilação de temperatura modificado de Zachos *et al.* (2001). Linhas verdes indicam a duração dos ciclos orbitais que predominaram neste período.

## Diversificação na Cadeia do Espinhaço

A diversificação dos grupos atuais de plantas neotropicais ocorreu principalmente a partir do Pleistoceno, o que geralmente é associado às oscilações climáticas que marcaram esse período (e.g., Rull, 2008). Essa relação tem sido estabelecida para explicar as altas taxas de riqueza e endemismo em várias regiões tropicais (e.g., Haffer, 1969; Fjeldsa & Lovett, 1997; López-Pujol *et al.*, 2011; Schnitzer *et al.* 2011). Neste contexto, áreas ricas em endemismo, especialmente regiões montanhosas, representariam refúgios para várias espécies durante o resfriamento global e a instabilidade climática que caracterizaram o Quaternário. Durante os períodos de retração, regiões estáveis teriam condições de abrigar espécies antigas, com menor capacidade de adaptação e dispersão e também espécies recentes, diferenciadas a partir do isolamento geográfico de linhagens ancestrais com distribuição mais ampla em períodos favoráveis.

Segundo o modelo proposto para explicar a elevada diversidade e as altas taxas de endemismos na Cadeia do Espinhaço (Harley, 1988; Alves & Kolbek, 1994; Harley, 1995; Giulietti *et al.*, 1997; Rapini *et al.*, 2008), durante os períodos interglaciais mais úmidos e quentes do Pleistoceno, as áreas campestres ficariam contraídas no topo das serras, que representariam refúgios do calor. A diversificação dos campos rupestres se daria, então, pela sucessão periódica de ciclos de retração e expansão provocados pelas oscilações climáticas, com diferenciações por isolamento geográfico durante os períodos interglaciais e hibridações durante os glaciais. *Minaria* realmente se irradiou durante o Pleistoceno. No entanto, sua diversificação parece ter sido conduzida por uma tendência à retração a longo-prazo, interrompida por poucos e rápidos episódios de expansão, enquanto os ciclos pleistocênicos que atuaram durante o Plioceno ao Pleistoceno Inferior foram de 43 mil anos, e os que prevaleceram após 900 mil anos foram de 100 mil anos (Zachos *et al.*, 2001). Dessa maneira, os pulsos de expansão detectados em *Minaria* não correspondem às dezenas de ciclos climáticos provocados pelas variações periódicas na órbita da Terra durante o Neogeno, mesmo considerando os desvios nas datações dos eventos biogeográficos.

O surgimento de Metastelmatinae nos cerrados durante o Mioceno Tardio e de *Minaria* nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço durante o início do Plioceno coincidem com a queda contínua do CO<sub>2</sub> atmosférico que vinha acontecendo desde o Ótimo Climático do Mioceno (15 Ma), provocando resfriamento e aridez global. Esse processo que culminou com o estabelecimento de desertos e a diversificação de várias linhagens de plantas suculentas (Arakaki *et al.*, 2011) também foi responsável pelo domínio das gramíneas com fotossíntese C<sub>4</sub> sobre as gramíneas C<sub>3</sub> em latitudes e altitudes mais baixas, levando à formação e expansão das savanas modernas sob o regime do fogo (Cerling *et al.*, 1997; Jacobs *et al.*, 1999; Beerling & Osborne,

2002; Simon *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2010; Strömberg, 2011). Uma vez que a retração de *Minaria* à Cadeia do Espinhaço ocorreu em paralelo com o resfriamento global, não parece provável que os topos de suas serras representem abrigos ao calor durante períodos interglaciais. A conservação filogenética de *Minaria* aos campos rupestres parece estar relacionado à aridez e ao regime de fogo, que também passaram a influenciar os ambientes tropicais de maneira mais determinante a partir do final do Mioceno, intensificados conforme a extensão e a intensidade da sazonalidade na região. As áreas de altitude da Cadeia do Espinhaço são ambientes com sazonalidade menos acentuada, onde a umidade ao longo do ano torna a estação seca mais branda do que nos cerrados e caatingas de baixa altitude. Nos topos de morro, as temperaturas mais baixas e o predomínio de afloramentos rochosos diminuem a quantidade de gramíneas C<sub>4</sub> que servem de combustível para as queimadas nos cerrados, dificultando o alastramento das queimadas pela Cadeia do Espinhaço. Dessa maneira, as ilhas de vegetação nos afloramentos rochosos funcionam como refúgios para espécies menos tolerantes a longos períodos de seca e/ou mais sensíveis ao fogo, que passam a ficar restrita a essas áreas.

A expansão para fora da Cadeia do Espinhaço deve ter ocorrido a partir de mudanças climáticas influenciadas por fatores causados não diretamente por variações nos parâmetros orbitais da Terra. A zona de Convergência Intertropical, por exemplo, é responsável pela sazonalidade mais branda nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil, provocando precipitações em decorrência do encontro entre massas polares úmidas e massas tropicais quentes (Behling, 2002). Mudanças na posição dessa Zona poderiam, então, alterar o regime de chuvas, amenizando a sazonalidade nas Regiões Nordeste e Centro-Oeste, moderando também a ocorrência das queimadas nos cerrados. Durante esses episódios, algumas linhagens poderiam se expandir rapidamente até que o retorno das condições anteriores reestabelecesse as estações secas e o regime de fogo, promovendo uma nova retração e levando à irradiação gradual e contínua em decorrência dos isolamentos geográficos e diferenciações. Este padrão, no entanto, contrasta com aquele sugerido para *Hoffmannseggella* H.G. Jones (Orchidaceae), um gênero também rico em espécies rupícolas endêmicas da Cadeia do Espinhaço. Segundo Antonelli *et al.* (2010), a diversificação dessas orquídeas teria sido determinada pela expansão (*vs.* retração em *Minaria*) dos campos rupestres em paralelo ao resfriamento global, promovendo a irradiação a partir de hibridações na zona de contato entre populações previamente disjunta (*vs.* isolamentos geográficos de linhagens com distribuição ampla e subsequente divergência dos isolados).

As oscilações climáticas ocasionadas por mudanças na órbita terrestre ocorrem há pelo menos 50 Ma, sendo o resfriamento global e a diminuição da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico os aspectos climáticos que mais marcaram o Quaternário (Willis & Niklas, 2004). As mudanças

ambientais provocadas pelas flutuações climáticas têm sido menores no hemisfério sul, sendo ainda menos pronunciadas em baixas latitudes (Dynesius & Jansson, 2000) e possivelmente não possuem papel relevante na formação de espécies (Bennet, 2004). A evolução de *Minaria* parece sustentar este padrão geral, tendo sido mais influenciada por uma tendência geral à retração de sua distribuição, possivelmente associada aos efeitos do aumento da sazonalidade, da aridez e do regime do fogo, que devem ter prevalecido sobre os demais aspectos climáticos durante a maior parte do Neogeno.

## CONCLUSÃO

A diversificação de *Minaria* parece ter sido orientada principalmente pela sazonalidade, a aridez e o regime do fogo. Como *Minaria*, muitas linhagens não se adaptaram a essas novas condições ambientais e que começaram a se estabelecer após o Ótimo Climático do Mioceno. Elas encontram nas porções altas da Cadeia do Espinhaço um ambiente mais estável, com estações secas brandas e áreas mais protegidas do fogo. Episódios de expansão devem estar associados a eventos climáticos esporádicos capazes de diminuir a sazonalidade da região, amenizando as estações secas e a incidência do fogo no entorno da Cadeia do Espinhaço. A diversificação ocorre por irradiação não adaptativa gradual e contínua a partir de isolamentos geográficos formados durante a retração da linhagem quando as condições climáticas anteriores são reestabelecidas. O padrão de diversificação de *Minaria* assemelha-se ao encontrado para a flora do Cabo, que também é caracterizada pela riqueza de endemismos e está sujeita à forte sazonalidade climática, aridez e incidência de fogo (Linder & Hardy, 2004; Bytebier *et al.*, 2011; Schnitzler *et al.*, 2011). A resposta às mudanças ambientais pode variar de grupo para grupo, mas é provável que vários outros grupos ricos em espécies endêmicas da Cadeia do Espinhaço apresentem padrão de diversificação similar ao de *Minaria*.

## REFERÊNCIAS

- Almeida Abreu, P.A. & Pflug, R. (1994) The geodynamic evolution of the southern Serra do Espinhaço, Minas Gerais, Brazil. *Zentralblatt für Geologie und Paläontologie*, **1**, 21-44.
- Alvez, R.J.V. & Kolbek, J. (1994) Plant species endemism in savanna vegetation on table mountains (*Campo Rupestre*) in Brasil. *Vegetatio*, **113**, 125-139.
- ANA (2011) Agência Nacional de Águas. Bacias hidrográficas Otto-codificadas. Available at: <http://ana.gov.br/shapes/> (accessed 5 june 2011).

- Antonelli, A., Verola, C.F., Parisod, C. & Gustafsson, A.L.S. (2010) Climate cooling promoted the expansion and radiation of a threatened group of South American orchids (Epidendroideae: Laeliinae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **100**, 597-607.
- Arakaki, M., Christin, P.A., Reto, N., Lendel, A., Eggli, U., Ogbum, R.M., Spriggs, E., Moore, M.J. & Edwards, E.J. (2011) Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, **108**, 8379-8384.
- Assis, A.C.C., Coelho, R.M., Pinheiro, E.S. & Durigan, G. (2011) Water availability determines physiognomic gradient in an area of low-fertility soils under Cerrado vegetation. *Plant Ecology*, **212**, 1135-1147.
- Berling, D.J. & Osborne, C.P. (2006) The origin of the savanna biome. *Global Change Biology*, **12**, 2023-2031.
- Behling, H. (2002) South and Southeastern Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Paleogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **177**, 19-27
- Bennet, K.D. (2004) Continuing the debate on the role of Quaternary environmental changes for macroevolution. *Philosophical Transactions of Royal Society of London B*, **359**, 295-303.
- Borba, E.L., Felix, J.M., Solferini, V.N. & Semir, J. (2001) Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany*, **88**, 419-428.
- Bytebier, B., Antonelli, A., Bellstedt, D.U. & Linder, P. (2011) Estimating the age of fire in the Cape flora of Soutg Africa from an orchid phylogeny. *Proceedings of the Royal Society B*, **278**, 188-195.
- Cerling, T.E., Harris, J.M., MacFadden, B.J., Leakey, M.G., Quade, J., Eisenmann, V. & Ehleringer, J.R. (1997) Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary. *Nature*, **389**, 153-158.
- Collinson, M.E., Manchester, S.R., Wild, V. & Hayes, P. (2010). Fruit and seeds floras from exceptionally preserved biotas in the European Paleogene. *Bulletin of Geosciences*, **85**, 155-162.
- Conceição, A.A. (2006). Plant ecology in 'Campos Rupestres' of the Chapada Diamantina, Bahia. *Towards greater knowledge of the Brazilian semi-arid biodiversity* (org. by L.P. Queiroz, A. Rapini and A.M. Giulietti), pp. 63-67. Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília.
- Conceição, A.A. & Pirani, J.R. (2005). Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: Substrato, composição florística e aspectos estruturais. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, **23**, 85-111.

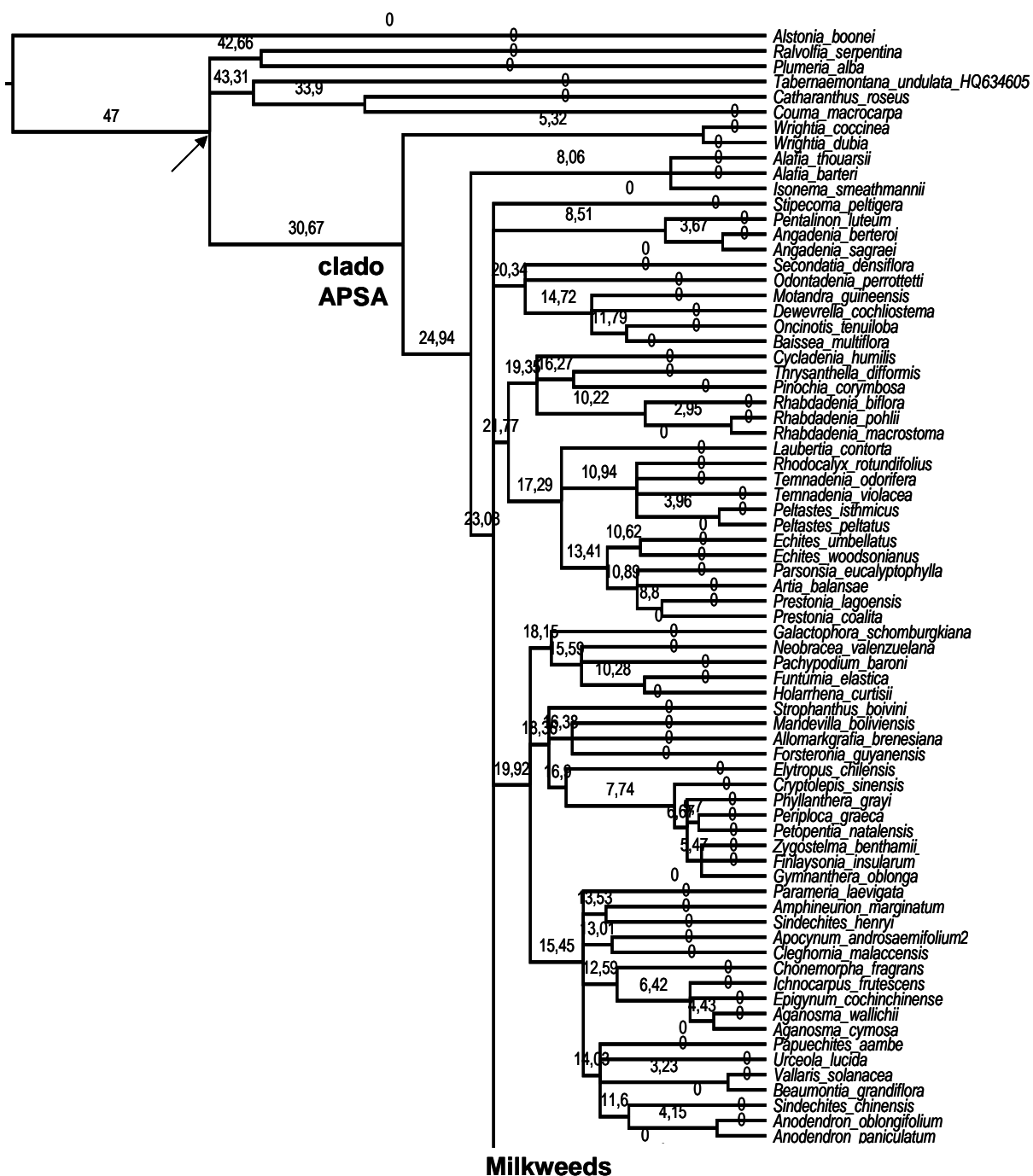
- Costa, F.N., Trovo, M. & Sano, P.T. (2008) Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. *Megadiversidade*, **4**, 117-125
- Crisp, M.D., Arroyo, M.T.K., Cook, L.G., Gandolfo, M.A., Jordan, G.J., McGlone, M.S., Weston, P.H., Westoby, M., Wilf, P. & Linder, H.P. (2009) Phylogenetic biome conservatism on a global scale. *Nature*, **458**, 754-756
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BioMed Central Evolutionary Biology*, **7**, 214.
- Dynesius, M. & Jansson, R. (2000) Evolutionary consequences of changes in species' geographical distributions driven by Milankovitch climate oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, **97**, 9115-9120.
- Edwards, E.J., Osborne, C.P., Strömberg, C.A.E, Smith, S.A. & C<sub>4</sub> Grasses Consortium (2010) The origins of C<sub>4</sub> grasslands: integrating evolutionary and ecosystem science. *Science*, **328**, 587-591.
- Fjeldsa, J. & Lovett, J.C. (1997) Geographical patterns of old and young species in African forest biota: the significance of specific montane areas as evolutionary centre. *Biodiversity and Conservation*, **6**, 325-346.
- Fontella-Pereira, J. (1989) Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae Brasileiras XXIII: considerações sobre *Ditassa parva* (A.Silv.) Font. e espécies correlatas. *Eugeniana*, **16**, 19-27.
- Franceschinelli, E.V., Jacobi, C.M., Drummond, M.G. & Resende, M.F.S. (2006) The genetic diversity of two Brazilian *Vellozia* (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. *Annals of Botany*, **97**, 585-592.
- Giulietti, A.M., Menezes, N.L., Pirani, J.R., Meguro, M. & Wanderley, M.G.L. (1987) Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e lista de espécies. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, **9**, 1-152.
- Giulietti, A.M., Pirani, J.R. & Harley, R.M. (1997) Espinhaço range region. Eastern Brazil. *Centres of plant diversity. A guide and strategies for the conservation. V. 3: The Americas* (eds. by S.D. Davis, V.H. Heywood, O. Herrera-MacBryde, J. Villa-Lobos and A.C. Hamilton), pp. 397-404. WWF/IUCN, Cambridge.
- Gradstein, F., Ogg, J., Smith, A. G., Bleeker, W. & Lourens, L. J. (2004) A new geologic time scale, with special reference to precambrian and neogene. *Episodes*, **27**, 83-100.
- Haffer, J. (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, **165**, 131-137.

- Harley, R.M. (1988) Evolution and distribution of *Eriope* (Labiatae), and its relatives, in Brazil (eds. by P.E. Vanzolini and W.R. Heyer), pp. 71-120. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Harley, R.M. (1995) Introduction. *Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia* (ed. by B.L. Stannard), pp. 1-40. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Heiberg, E. (2008) *SEEVA, version 0.33. Software for spatial evolutionary and Ecological vicariance analysis*. Available at: <http://seeva.heiberg.se> (accessed 21 june 2011).
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G. & Jarvis, A. (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, **25**, 1965-1978.
- IBAMA. (2011) *Sistema compartilhado de informações ambientais: Tems vetoriais formato shapefile*. Available at: <http://siscom.ibama.gov.br/shapes/> (accessed 12 june 2011).
- Jacobs, B.F., Kingston, J.D. & Jacobs, L.L. (1999) The origin of grass-dominated ecosystems. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **86**, 590-643.
- Jesus, F.F., Solferini, V.N., Semir J. & Prado, P.I. (2001) Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. *Plant Systematic and Evolution*, **226**, 59-68.
- Jesus, F.F., Abreu, A.G., Semir, J. & Solferini, V.N. (2009) Low genetic diversity but local genetic differentiation in endemic *Minasia* (Asteraceae) species from Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, **277**, 187-196.
- Köppen, W. (1931) *Climatologia*. Fondo de Cultura Económica, Buenos Aires.
- Konno, P.U.T. (2005) *Ditassa R. Br. no Brasil (Asclepiadoideae, Apocynaceae) e revisão taxonômica de Minaria T. U. P. Konno & Rapini*. PhD thesis, Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Konno, T.U.P., Rapini, A., Goyder, D.J. & Chase, M.W. (2006) The new genus *Minaria* (Asclepiadoideae, Apocynaceae). *Taxon*, **55**, 421-430.
- Lambert, S.M., Borba, E.L. & Machado, M.C. 2006. Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus* × *albicephalus* (*Melocactus ernestii* X *M. glaucescens*) in north-eastern Brazil. *Plant Species Biology*, **21**, 93-108.
- Linder, H.P. & Hardy, C.R. (2004) Evolution of the species rich Cape flora. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, **359**, 1623-1632.

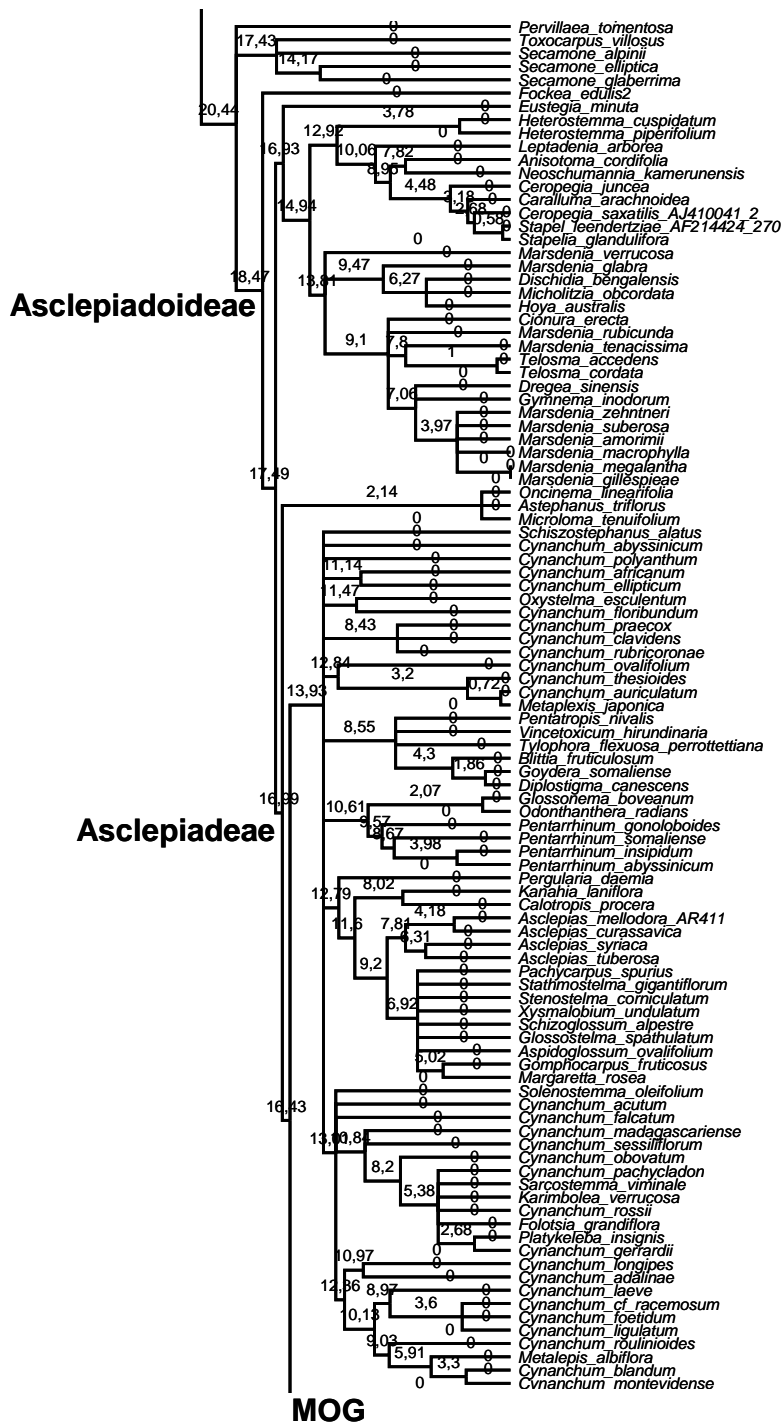
- Livshultz, T. 2010. The phylogenetics position of milkweeds (Apocynaceae subfamilies Secamonoideae and Asclepiadoideae): evidence from nucleus and chloroplast. *Taxon*, **59**, 1016-1030.
- López-Pujol, J., Zhang, F.-M., Sun, H.-Q., Ying, T.-S. & Ge, S. (2011) Centre of plant endemism in China: places for survival or for speciation? *Journal of Biogeography*, **38**, 1267-1280.
- Lousada, J.M., Borba, E.L., Ribeiro, K.T., Ribeiro, L.C. & Lovato, M.B. (2011) Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica*, **139**, 431-440.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente (2011) *Mapas para geoprocessamento*. Available at : <http://mapas.mma.gov.br/i3geo/datadownload.htm> (accessed 12 june 2011).
- Muller, J. 1981. Fossil pollen records of extant angiosperms. *Botanical Review*, **47**, 1-142.
- Neves, S.P.S. & Conceição, A.A. (2010) Campo rupestre recém-queimado na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: plantas de rebrota e sementes, com espécies endêmicas na rocha. *Acta Botanica Brasilica* **24**, 697-707.
- Pedreira, A.J. (1997) Sistemas deposicionais da Chapada Diamantina centro-oriental, Bahia. *Revista Brasileira de Geociências*, **27**, 229-240.
- Pereira, A.C.S., Borba, E.L., Giulietti, A.M. (2007) Genetic and morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae), from the Chapada Diamantina, Brazil: implications for conservation and taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **153**, 401--416.
- Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2007) *Tracer, version 1.4*. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (accessed 28 june 2011).
- Rambaut, A. (2009) *Figtree, version 1.2.2*. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree> (accessed 23 june 2011).
- Rapini, A. (2010) Revisitando as Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço. *Boletim de Botanica da Universidade de São Paulo*, **28**, 97-123.
- Rapini, A., Berg, C. & Liede-Schumann, S. (2007) Diversification of Asclepiadoideae (Apocynaceae) in the New World. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **94**, 407-422.
- Rapini, A., Chase, M.W. & Konno, T.U.P. (2006) Phylogenetics of South American Asclepiadeae (Apocynaceae). *Taxon*, **55**, 119-124.
- Rapini, A., Ribeiro, P.L., Lambert, S. & Pirani, J.R. (2008) A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade*, **4**, 16-24.
- Ribeiro, P.L., Borba, E.L., Smidt, E.C., Lambert, S.M., Schnadelbach, A.S., van den Berg, C.



- (2008) Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian campos rupestres: implications for taxonomy and biogeography. *Plant Systematics and Evolution*, **270**, 109--137.
- Rull, V. (2008) Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary–Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology*, **17**, 2722—2729.
- Saadi, A. (1995) A geomorfologia da Serra do Espinhaço em Minas Gerais e de suas margens. *Geonomos*, **3**, 41-63.
- Sanderson, M.J. (1997) A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constance. *Molecular Biological and Evolution*, **14**, 1218-1231.
- Sanderson, M.J. (2002) Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. *Molecular Biological and Evolution*, **19**, 101-109.
- Schnitzler, J., Barraclough, T.G., Boatwright, J.S., Goldblatt, P., Manning, J.C., Powell, M.P., Rebelo, T. & Savolainen, V. (2011) Causes of plant diversification in the cape biodiversity hotspot of South Africa. *Systematic Biology*, **60**, 1-15.
- Simon, M.F., Grether, R., Queiroz, L.P., Skema, C., Pennington, R.T. & Hughes, C.E. (2009) Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, **106**, 20359-20364.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, **22**, 2688-2690.
- Strömberg, C. (2011) Evolution of grasses and grassland ecosystems. *Annual Review Earth Planet Science*, **39**, 517-544.
- Willis, K.J. & Niklas, K.J. (2004) The role of Quaternary environmental change in plant macroevolution: the exception or the rule? *Royal Society London*, **359**, 159-172.
- Yu, Y., Harris, A.J. & He, X.J. (2010) S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis): A tool for inferring biogeographic histories. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **56**, 848-850.
- Yu, Y., Harris, A.J. & He, X.J. (2011) *RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies, version 1.1)*. Available at: <http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/RASP> (accessed 4 june 2011).
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E. & Billups, K. (2001) Trends, Rhythms, and Aberrations in Global Climate 65 Ma to Present. *Science*, **292**, 686-693.



**Figura suplementar 1 Parte 1.** Cronograma de Apocynaceae baseado na matriz de *trnL-F* (intron *trnL* e espaçador *trnL-F*) com 295 táxons obtido pelo programa r8s com o método NPRS (*Non-Parametric Rate Smoothing*). Seta indica o ponto de calibração.



**Figura suplementar 1 Parte 2.** Cronograma de Apocynaceae baseado na matriz de *trnL-F* (intron *trnL* e espaçador *trnL-F*) com 295 táxons obtido pelo programa r8s com o método NPRS (Non-Parametric Rate Smoothing).

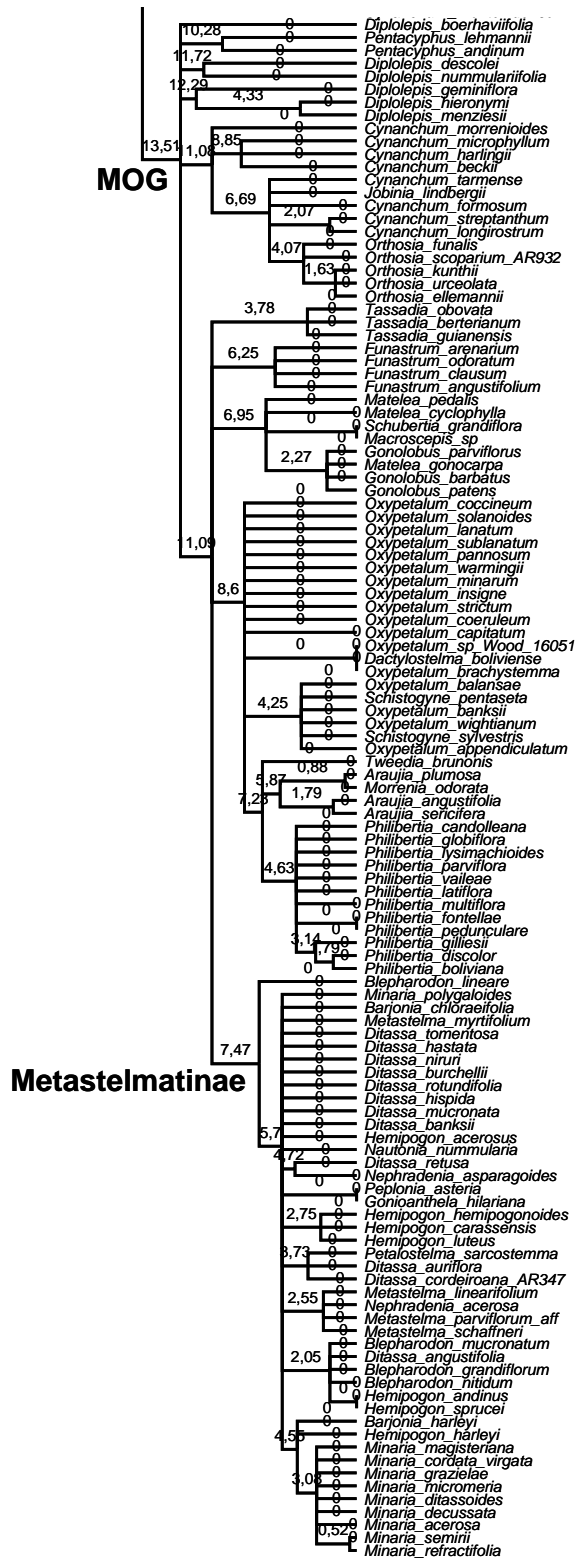


Figura suplementar 1 Parte 3. Cronograma de Apocynaceae baseado na matriz de *trnL-F* (intron *trnL* e espaçador *trnL-F*) com 295 táxons obtido pelo programa r8s com o método NPRS (Non-Parametric Rate Smoothing).

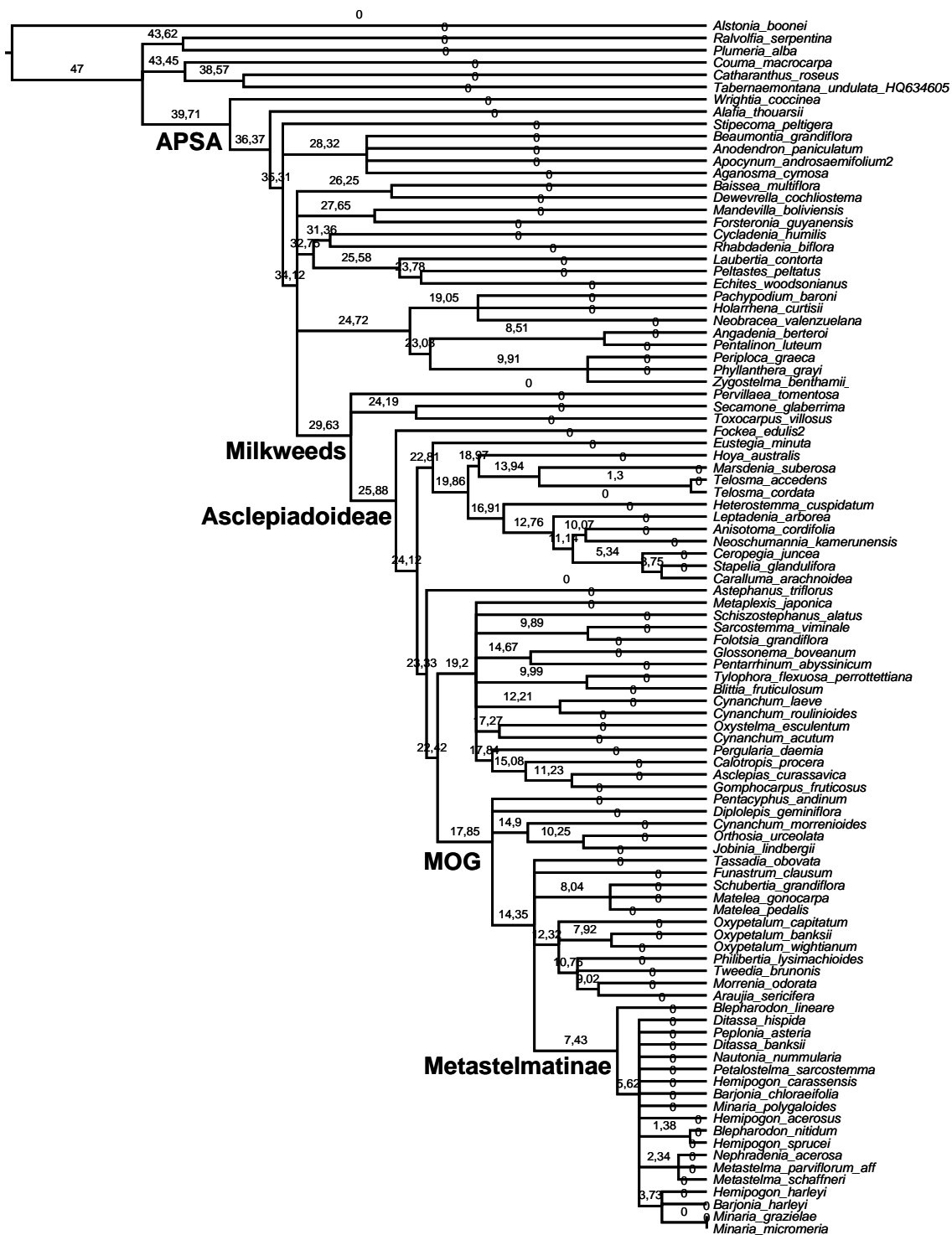


Figura suplementar 2. Cronograma de Apocynaceae baseado na matriz de *trnL-F* (intron *trnL* e espaçador *trnL-F*) com 99 táxons obtido pelo programa r8s com o método NPRS (*Non-Parametric Rate Smoothing*).

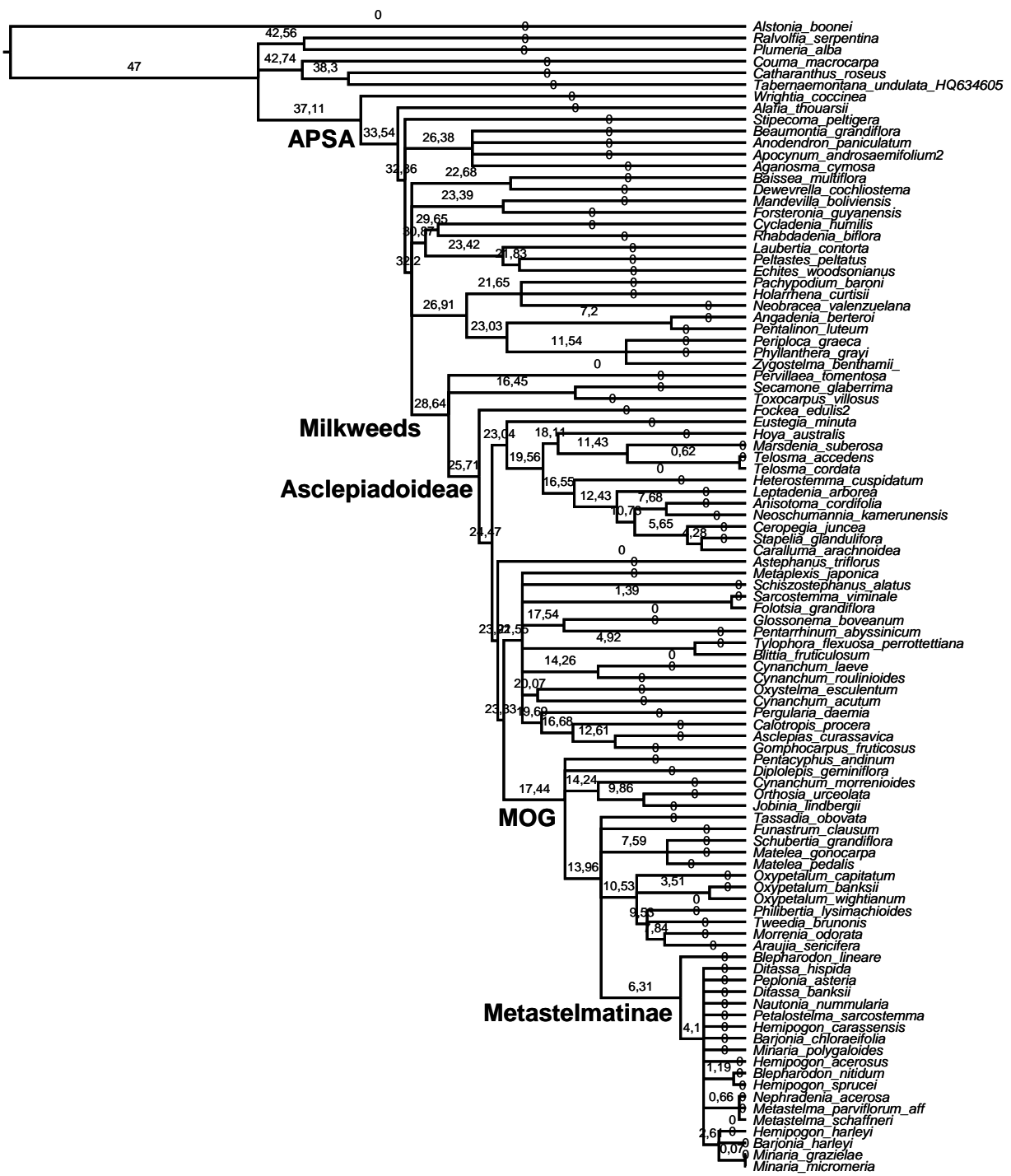
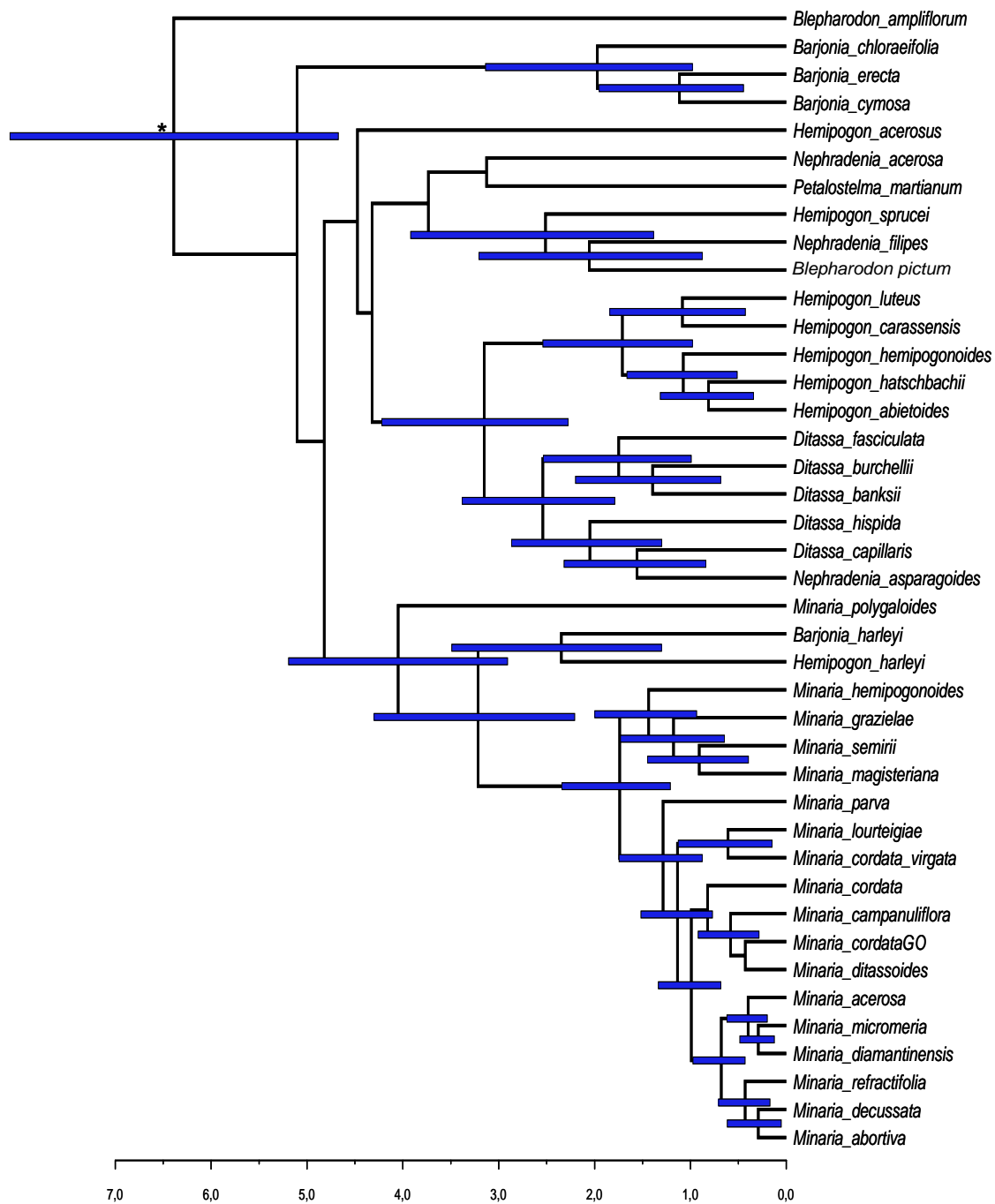
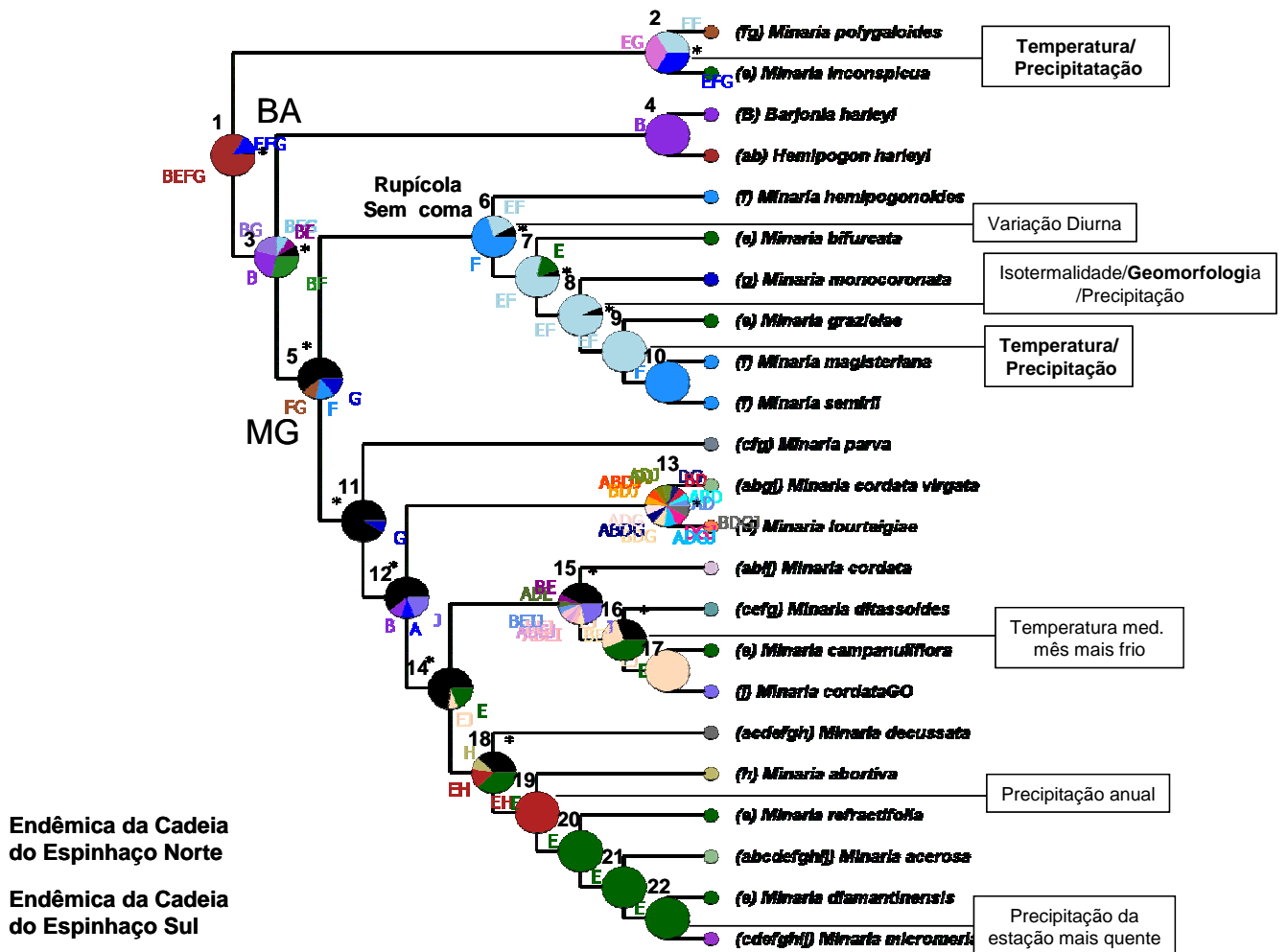


Figura suplementar 3. Cronograma de Apocynaceae baseado na matriz de *trnL-F* (intron *trnL* e espaçador *trnL-F*) com 99 táxons obtido pelo programa r8s com o método PL (*Penalized Likelihood*).



**Figura suplementar 4.** Cronograma de máxima credibilidade de clados (idade média em milhões de anos), obtido por inferência Bayesiana, de Metastelmatinae baseado na matriz combinada plastidial (*psbA-trnH*, *trnS-G*, *trnE-Y* e *rps16*) e nuclear (ITS e ETS). Asterisco indica o ponto de calibração. Barras em azul indicam intervalo acima de 95% de densidade posterior da probabilidade posterior na idade dos nós.



**Figura suplementar 5.** Hipótese filogenética baseada em evidência total (dados moleculares e morfológicos) de *Minaria* com o resumo estatístico da otimização da distribuição espacial ancestral (S-DIVA) e de variáveis ambientais (SEEVA) significativas ( $D \geq 0,75$  e  $p \leq 0,0023$ ). Gráficos de pizza indicam a proporção da otimização feita em seis mil árvores Bayesianas. Número do nó sobre o gráfico. Letras indicam áreas de acordo a Fig. 1. As cores diferenciam áreas ou combinação delas identificadas pelas letras.



# **Capítulo 4**

**Variabilidade genética de espécies de *Minaria*  
(Apocynaceae) com diferentes extensões de  
distribuição**

## Variabilidade genética de espécies de *Minaria* (Apocynaceae) com diferentes extensões de distribuição

### Resumo

O gênero *Minaria* (Apocynaceae) inclui 21 espécies, 75% endêmicas da Cadeia do Espinhaço e metade microendêmicas. Espécies que não possuem coma na semente possuem distribuição restrita, porém aquelas com sementes comosas apresentam extensões variáveis de distribuição, independentes da idade da linhagem. Nós utilizamos marcadores ISSR para investigar a diversidade e estrutura genética de três espécies do gênero com sementes dispersas pelo vento, com origem no Planalto de Diamantina e aproximadamente a mesma idade, mas com diferentes extensões de distribuição: *M. acerosa*, *M. ditassoides* e *M. refractifolia*. As espécies apresentaram diversidade moderada em proporção de locos polimórficos e heterozigidade. Esses valores foram semelhantes entre elas, embora a endêmica *M. refractifolia* mostrou-se pouco mais variável. Essa variabilidade reflete o *pool* gênico de um ancestral com distribuição restrita e indica uma dispersão rápida e recente.

**Palavras-chave:** Campos rupestres Dispersão Diferenciação genética Endemismo Metastelmatinae

\* Manuscrito formatado para a revista Plant Systematics and Evolution.

## Introdução

O gênero *Minaria* T.U.P. Konno & Rapini (Apocynceae) divergiu próximo à raiz de Metastelmatinae (tribo Asclepiadeae), uma subtribo recente (cerca de 7 M.a.) de Asclepiadoideae exclusiva do Novo Mundo (Rapini et al. 2003, 2006, 2007; Capítulo 3). Compreende 21 espécies reconhecidas principalmente por caracteres vegetativos, hábito subarborescente e folhas reduzidas, associada à sua distribuição centrada na Cadeia do Espinhaço, leste do Brasil (Konno et al. 2006). Surgiu no início do Plioceno, mas irradiou-se no Pleistoceno, principalmente nos últimos 500 mil anos (Capítulo 3). Cerca de 80% das suas espécies têm distribuição restrita e, destas, 52% são microendêmicas. Apenas quatro espécies se distribuem amplamente, entre elas *M. acerosa* (Mart.) T.U.P. Konno & Rapini, distribuída em praticamente toda a área de ocorrência do gênero.

*Minaria* ocorre principalmente em áreas de altitude superior a 900 m, na Cadeia do Espinhaço, em vegetação de campos rupestres. Esta vegetação é composta por diversas fisionomias, geralmente com espécies de pequeno porte, com poucos arbustos espaçados entre ilhas de afloramentos rochosos, frequentemente dependentes da profundidade do solo e disponibilidade de água (Harley 1995; Conceição e Pirani 2005; Assis et al. 2011). A diversidade de microambientes, favorecida pela topografia e erosão diferenciada, é sugerida como possível causa da alta diversidade beta na Cadeia do Espinhaço. Isto pode ser evidenciado desde a subestruturação genética no nível de populações (e.g. Lambert et al. 2006a, b; Ribeiro et al. 2008) até o elevado endemismo de espécies (Giulietti et al. 1987; Rapini et al. 2008).

O núcleo de *Minaria* está dividido em dois clados apresentando sistemas de dispersão diferentes (Capítulo 1). Um desses inclui seis espécies com sementes sem coma, dispersas provavelmente por gravidade e o outro, 11 espécies com sementes comosas, dispersadas pelo vento. No primeiro, todas as espécies são microendêmicas, sendo conhecidas no máximo por três populações restritas a habitats rupícolas. No segundo, sete espécies têm distribuição restrita à Cadeia do Espinhaço, com diferentes extensões, desde endêmicas a toda Cadeia do Espinhaço até a uma única serra. Esta diferenciação de amplitude de distribuição não parece estar relacionada com o tempo de divergência dessas linhagens, já que espécies com a mesma idade apresentam distribuição com diferentes extensões (Capítulo 3). *Minaria acerosa*, *M. ditassoides* (Silveira) T.U.P. Konno & Rapini e *M. refractifolia* (K.Schum.) T.U.P. Konno & Rapini possuem aproximadamente a mesma idade, morfologia floral e sistema de dispersão

semelhantes, apesar de *M. ditassoides* possuir flores com corola branca e urceolada, enquanto as outras duas possuem corola amarelada e rotácea. No entanto, as três espécies possuem distribuições com extensões distintas (Fig. 1).

A diversidade genética de populações de plantas da Cadeia do Espinhaço vem sendo investigada em vários grupos (Asteraceae: Gomes et al. 2004; Jesus et al. 2001, 2009; Bromeliaceae: Cavallari et al. 2006; Cactaceae: Lambert et al. 2006a, b; Eriocaulaceae: Pereira et al. 2007; Leguminosae: Conceição et al. 2008; Orchidaceae: Azevedo et al. 2007; Borba et al. 2001, 2007a, b; Cruz et al. 2011; Ribeiro et al. 2008; Velloziaceae: Franceschinelli et al. 2006; Lousada et al. 2011; e Verbenaceae: Viccini et al. 2004), revelando padrões variáveis de diversidade genética, possivelmente condicionados por restrição filogenética (Rapini et al. 2008). No entanto, níveis elevados de estruturação genética foram encontrados na maioria desses estudos (e.g. Borba et al. 2007b; Jesus et al. 2001, 2009; Lambert et al. 2006a), demonstrando que a compartimentalização dos campos rupestres e a especificidade microambiental de cada espécie podem estar influenciando na diferenciação dessas populações.

Asclepiadoideae está representada por 133 espécies na Cadeia do Espinhaço, 30% endêmicas (Rapini 2010). No entanto, nada se conhece sobre as características genéticas dessas espécies. Neste trabalho, são investigadas a variabilidade e estrutura genética de *M. refractifolia*, *M. ditassoides* e *M. acerosa*, três espécies filogeneticamente relacionadas, com características semelhantes, mas que apesar disso apresentam distribuições com extensões distintas relacionadas com crescentes amplitudes de distribuição. Nosso objetivo é detectar características genéticas que possam estar associadas a padrões de distribuição na Cadeia do Espinhaço, de modo a compreender a estrutura de suas populações.

## **Material e métodos**

### Amostragem, extração e amplificação

Foram coletadas 13 populações de *M. acerosa* (Fig. 2), com distâncias entre 35 e 1.900 km (Anexo 1); seis de *M. ditassoides* (Fig. 3), entre 18 e 313 km, e seis de *M. refractifolia* (Fig. 4), entre 7 e 51 km. Os exemplares de cada população foram depositados no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) (Tab. 1). As amostras consistiram de folhas jovens de 11 a 15 indivíduos espaçados em cada população, que foram desidratadas em sílica gel. O DNA de cada amostra foi extraído

conforme protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987) com tampão CTAB 2%. Cerca de 10 ng de DNA genômico foi usado para amplificação através da PCR. Os dados genéticos populacionais foram acessados a partir de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), seguindo o protocolo de Wolfe et al. (1998). Sete *primers* foram selecionados com base na consistência, reprodutibilidade e variabilidade das bandas: (CA)<sub>6</sub>-RY; (GT)<sub>6</sub>-YR; (GA)<sub>7</sub>-RG; (AG)<sub>7</sub>-YC; (CAC)<sub>4</sub>-RC; (CTC)<sub>4</sub>-RC; (AG)<sub>8</sub>-YC (Talhinhas et al. 2003; Wolfe et al. 1998).

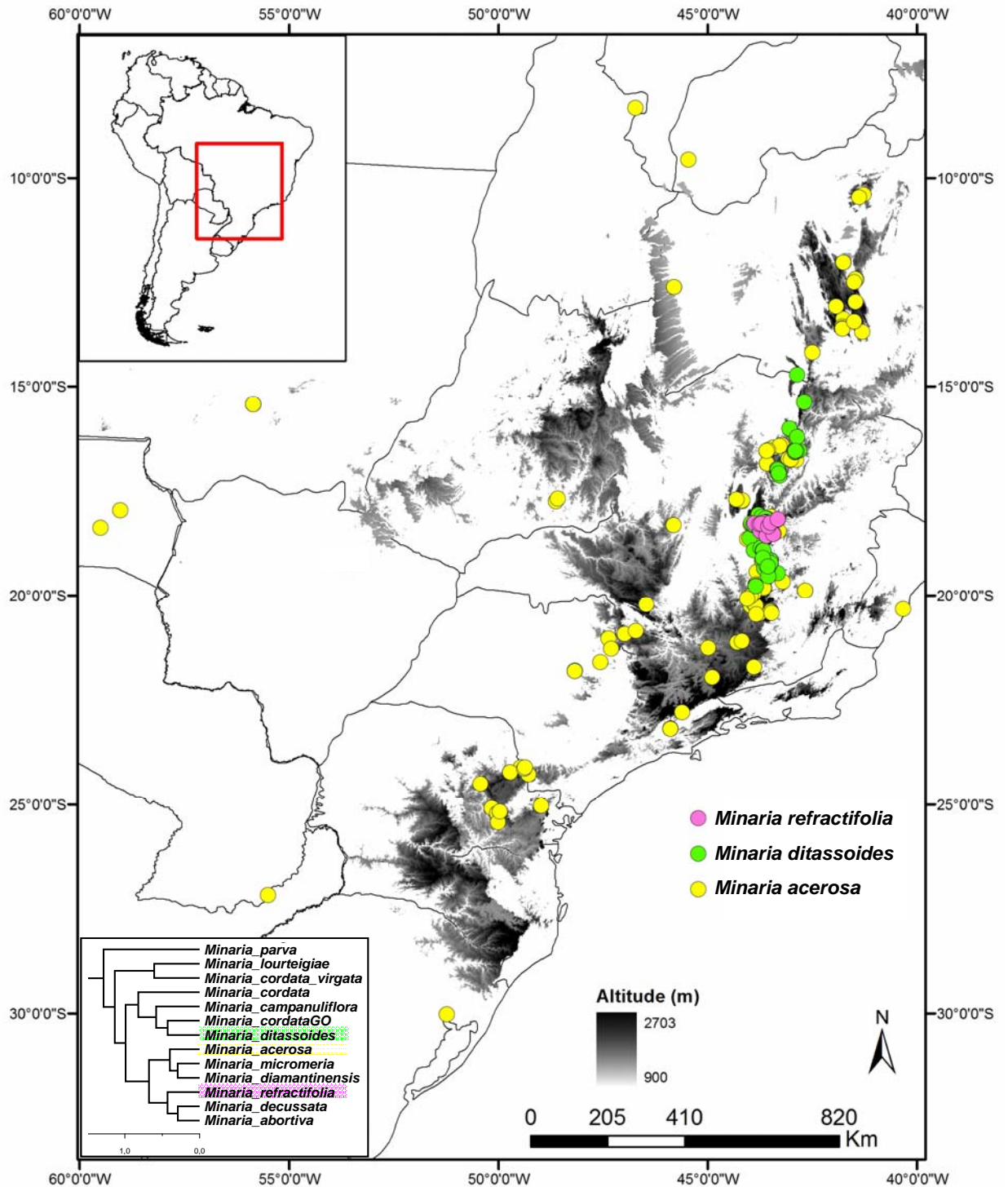
Os produtos da PCR foram separados e visualizados através da eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão SB (Brody e Kern 2004), corado posteriormente com banho de brometo de etídio 1%. O tamanho das bandas foi avaliado com marcador de 100 pb. Os géis foram fotografados pelo sistema Kodak 1D 3.6. Os padrões de bandas foram analisados no programa GelComparII<sup>®</sup> Applied Maths NV, gerando uma matriz de presença e ausência. Foram consideradas apenas bandas de tamanhos entre 300 e 1.500 pb. Cada amplificação foi acompanhada de controle positivo e negativo e, algumas amostras foram replicadas para verificar a consistência das bandas entre reações.

#### Análises dos dados

Para computar as frequências alélicas e estimar os parâmetros de diversidade genética foi utilizado o algoritmo Bayesiano implementado no programa AFLP-SURV (Vekemans et al. 2002). Foram calculados o percentual de locos polimórficos ( $P$ ), heterozigidade total ( $H_T$ ), heterozigidade dentro da população ( $H_S$ ) e heterozigidade média para cada população ( $H_e$ ). Os valores de  $H_T$  e  $H_S$  das espécies foram utilizados para calcular os índices de diferenciação entre populações ( $G_{ST}$ ,  $G'_{ST}$ ,  $G''_{ST}$  e  $D$ ), conforme fórmulas sumarizadas em Meirmans e Van Tienderen (2004). A partição da variação entre e dentro das populações foi analisada (AMOVA: Excoffier et al. 1992) utilizando o programa GENODIVE. O algoritmo Bayesiano do AFLP-SURV também foi utilizado para gerar 1.000 matrizes de distância de Nei (1978), que foram utilizadas para construir 1.000 árvores com o algoritmo *neighbor-joining* no módulo NEIGHBOR do pacote PHYLIP 3.69 (Felsenstein 1989, 2011) e o consenso delas no módulo CONSENSE com valores de bootstrap, para avaliar as relações entre as populações. O teste de correlação (teste de Mantel, 1.000 iterações) entre as distâncias

genéticas de Nei (1978) e geográficas (em Km) foi realizado no programa PC ORD (McCune e Mefford 1999).

O número de grupos genéticos foi inferido através de um modelo baseado em algoritmo de agrupamento (análise Bayesiana de estrutura) implementado no programa STRUCTURE versão 2.3.3 (Pritchard et al. 2000). Como o marcador utilizado é dominante, usamos o ajuste para dados haplóides. Utilizou-se o modelo de mistura (*admixture model*), com frequências alélicas correlacionadas e parâmetro de distribuição de frequência do alelo  $\lambda$  inferido durante a corrida. O algoritmo foi executado com um *burn-in* de comprimento 100.000 iterações da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), seguido por 500.000 iterações para estimar os parâmetros. Correu-se o algoritmo em valores crescentes de K, de 1 a N + 1 (N = número esperado de populações) para cada espécie. As análises foram replicadas 10 vezes para melhor estimativa dos valores do parâmetro. Os resultados do STRUCTURE foram analisados no programa Structure Harvester (Earl 2011), que disponibiliza gráficos dos parâmetros estimados para a decisão do K mais provável, conforme Pritchard et al. (2000) e Evanno et al. (2005). O número total estimado de agregados genéticos para cada espécie foi determinado com base no  $\Delta K$ , de acordo com Evanno et al. (2005). A visualização gráfica da estrutura populacional do K mais provável foi salva do próprio Structure.

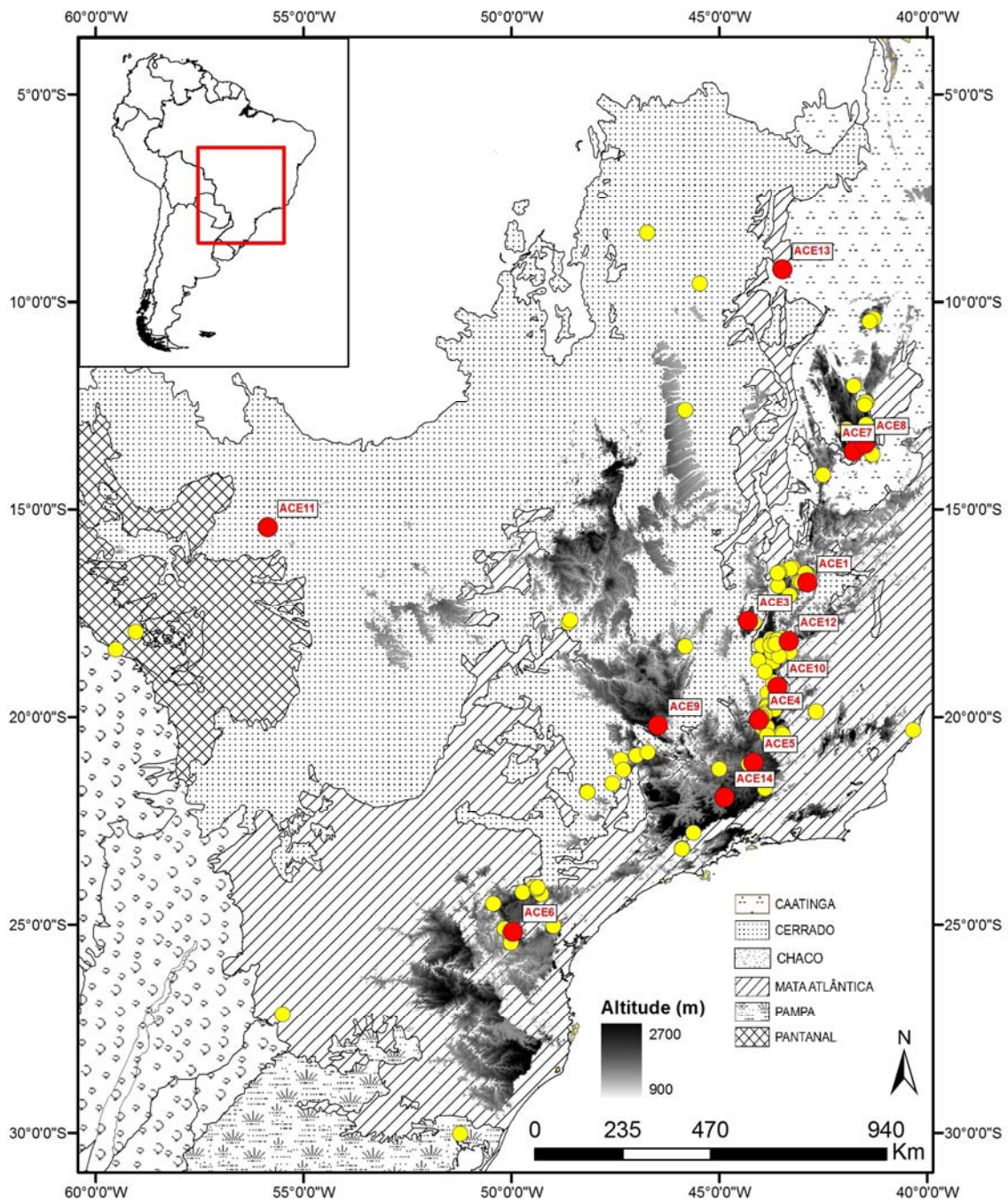


**Figura 1.** Mapa de distribuição de *Minaria acerosa*, *M. ditassoides* e *M. refractifolia* na América do Sul. Em detalhe, o cronograma das espécies comosas do núcleo de *Minaria* baseado na matriz molecular (Capítulo 3) ilustrando a posição filogenética e idade em milhões de anos.

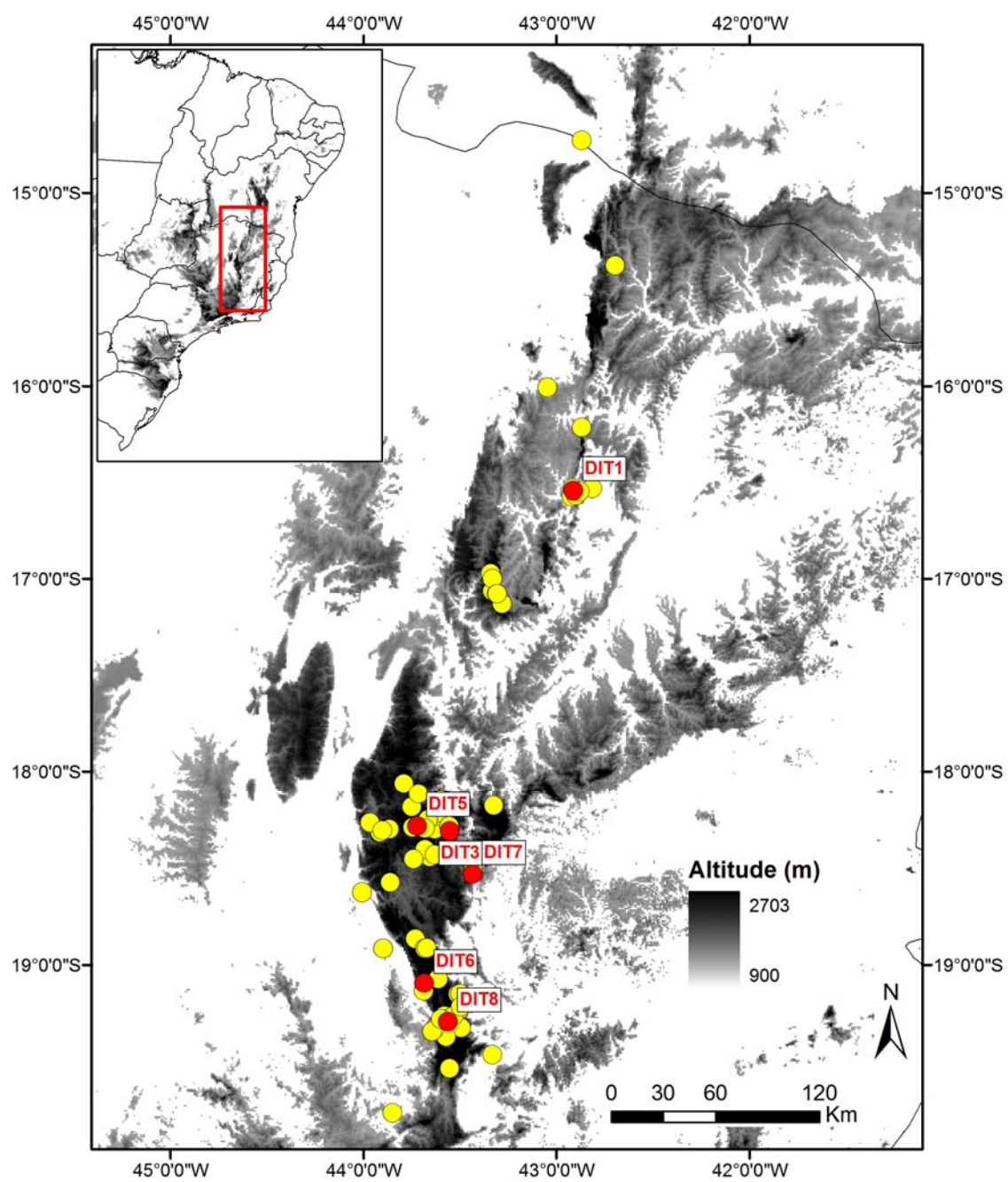
**Tabela 1.** Populações de *Minaria acerosa*, *M. ditassoides* e *M. refractifolia* coletadas no Brasil. N, número de indivíduos amostrados por população.

Voucher	População	Localização	N	Latitude	Longitude
<b><i>M. acerosa</i></b>					
PLR 183	ACE1	Cristália, MG	15	-16,7611	-42,8891
PLR 198	ACE3	Joaquim Felício, MG; Serra do Cabral	15	-17,703	-44,3161
PLR 211	ACE4	Ibirité, MG; Serra do Rola Moça	14	-20,0745	-44,0554
PLR 295	ACE5	Sta Cruz de Minas, MG; Serra do São José	15	-21,096	-44,1825
AR 1746	ACE6	Ponta Grossa, PR	15	-25,1726	-49,9685
PLR 377	ACE7	Rio de Contas, BA	15	-13,6201	-41,7803
PLR 345	ACE8	Jussiape, BA	11	-13,4481	-41,5056
PLR 362	ACE9	São Roque de Minas, MG; Serra da Canastra	15	-20,2113	-46,4751
PLR 367	ACE10	Santana do Riacho, MG; Serra do Cipó	15	-19,296	-43,5991
PLR 404	ACE11	Chapada dos Guimarães, MT	15	-15,4324	-55,8551
PLR 408	ACE12	São Gonçalo do Rio Preto, MG	15	-18,1912	-43,3369
ALAC 181	ACE13	Cascavel, PI; Serra das Confusões	15	-9,22894	-43,4848
FM 2217	ACE14	Baependi, MG; Serra da Mantiqueira	15	-21,9333	-44,8739
<b>Total</b>	<b>13</b>		<b>187</b>		
<b><i>M. ditassoides</i></b>					
PLR 180	DIT1	Grão Mogol, MG	14	-16,544	-42,9153
PLR 219	DIT3	Diamantina, MG	15	-18,3087	-43,5539
PLR 230	DIT5	Diamantina, MG	15	-18,2835	-43,7239
PLR 261	DIT6	Santana do Riacho, MG; Lapinha	11	-19,096	-43,6862
PLR 315	DIT7	Serro, MG	15	-18,5336	-43,4363
PLR 274	DIT8	Santana do Riacho, MG	15	-19,296	-43,5636
<b>Total</b>	<b>6</b>		<b>85</b>		
<b><i>M. refractifolia</i></b>					
PLR 225	REF1	Diamantina, MG	15	-18,2526	-43,6576
PLR 308	REF2	Presidente Kubitschek, MG	15	-18,5732	-43,5933
PLR 314	REF3	Serro, MG	15	-18,5314	-43,4359
PLR 323	REF4	Diamantina, MG	15	-18,2835	-43,7239
PLR 386	REF5	Diamantina, MG	15	-18,2619	-43,5014
PLR 407	REF6	São Gonçalo do Rio Preto, MG	15	-18,1785	-43,3301
<b>Total</b>	<b>6</b>		<b>90</b>		

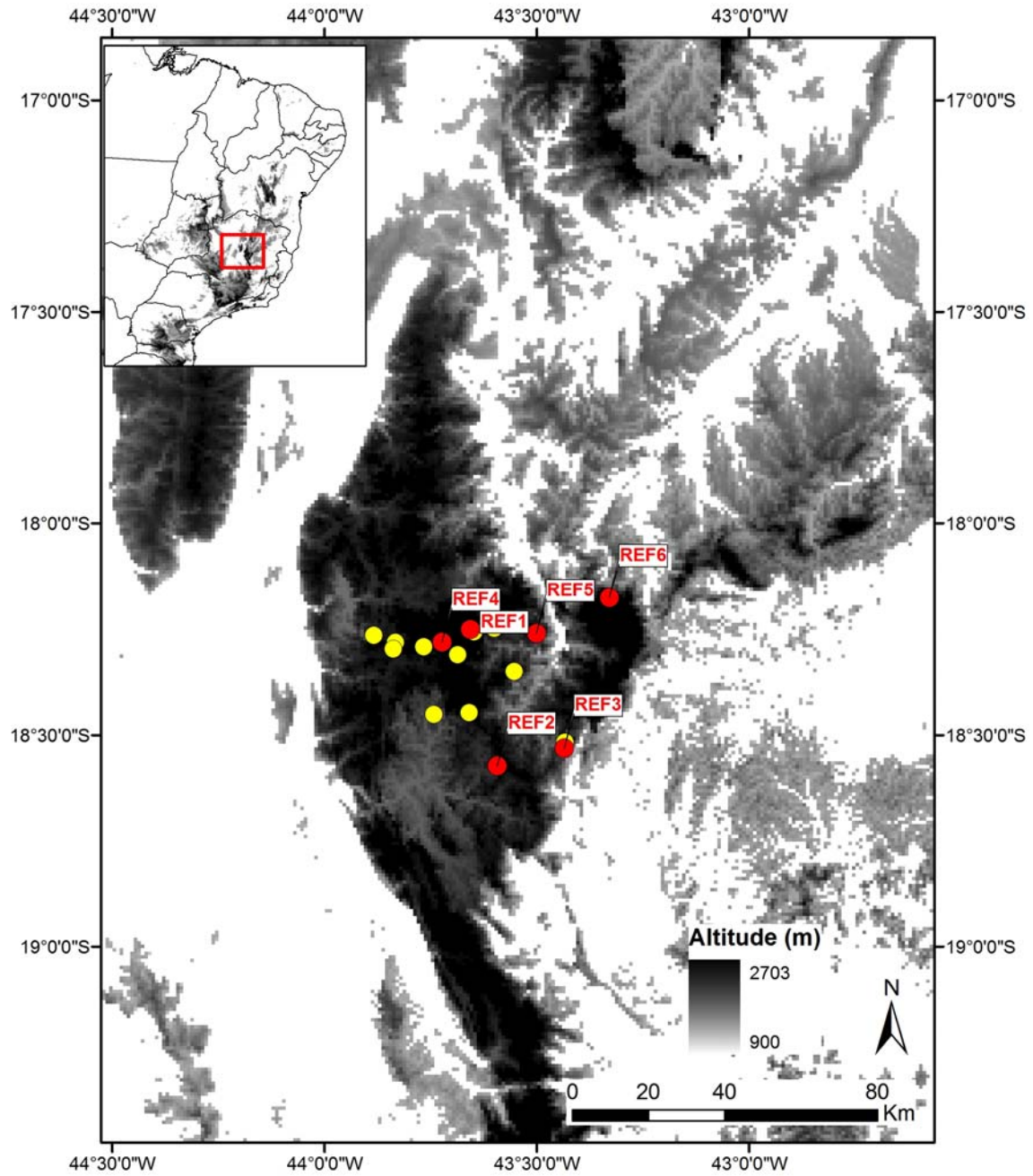




**Figura 2.** Mapa de distribuição de *Minaria acerosa* (em amarelo) na América do Sul, com indicação de biomas. As populações analisadas estão em vermelho.



**Figura 3.** Mapa de distribuição de *Minaria ditassoides* (em amarelo) na Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brasil. As populações analisadas estão em vermelho.



**Figura 4.** Mapa de distribuição de *Minaria refractifolia* (em amarelo) no Planalto de Diamantina, Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brasil. As populações analisadas estão em vermelho.

## Resultados

O número de fragmentos para cada espécie variou entre 129 em *M. ditassoides* e 149 em *M. acerosa*. O percentual de polimorfismo por loco foi em média 52,22% em *M. acerosa*, 56,1% em *M. ditassoides* e 65,33% em *M. refractifolia*. A heteroziguidade esperada entre as populações foi semelhante entre as espécies, variando de 0,186 em *M. acerosa* e 0,231 em *M. refractifolia* (Tabela 2). Em *M. acerosa*, a população ACE5, da Serra de São José, foi a que apresentou maior variabilidade e a ACE10, da Serra do Cipó, a menor. Em *M. ditassoides*, a população de Grão Mogol se destaca como a mais variável. Em *M. refractifolia*, a variação é bem semelhante entre as populações.

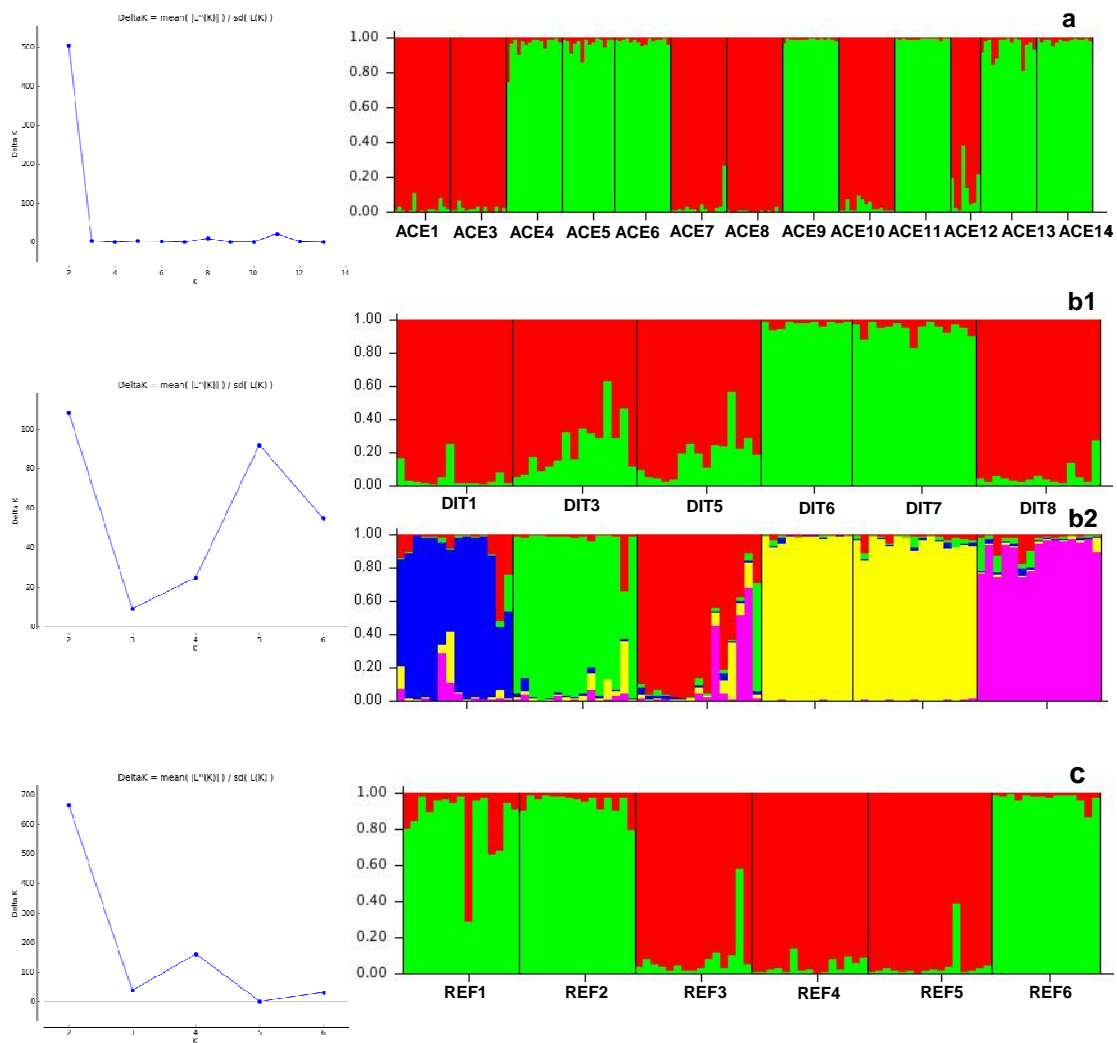
Para todas as espécies, a maior parte da diversidade genética está localizada dentro das populações (Tabela 3). Entretanto, para *M. ditassoides* e *M. acerosa*, a diversidade encontrada entre as populações foi elevada. Para todos os parâmetros de estrutura genética, a diferenciação entre populações é proporcional à amplitude de distribuição. Todas as espécies apresentaram valores baixos de  $D$  (Jost) e apenas dois grupos genéticos foram detectados pelo STRUCTURE (Fig. 5). Em *M. acerosa*, um deles com populações representantes da Cadeia do Espinhaço e o outro incluindo populações de fora do Espinhaço (Fig. 2). O  $G_{ST}$  e seus derivados  $G'_{ST}$  e  $G''_{ST}$  detectaram elevada estruturação genética em *M. acerosa*, alta em *M. ditassoides* e moderada em *M. refractifolia*. As distâncias genéticas e geográficas não apresentaram correlação significativa para nenhuma das espécies (Anexos 1-3), mesmo utilizando o logaritmo da distância. O agrupamento entre as populações das espécies foi correspondente com os grupos inferidos pelo STRUCTURE (Fig. 6) e geralmente com alto suporte nas relações de um mesmo grupo genético. Entretanto, em *M. ditassoides* a população DIT3 mostrou-se mais similar ao outro grupo genético, provavelmente devido à presença de muitos indivíduos migrantes conforme proporção de ancestralidade mostrada na figura 5.

**Tabela 2.** Parâmetros de diversidade genética para as populações de *Minaria acerosa*, *M. ditassoides* e *M. refractifolia* baseados em marcadores ISSR. N, número de indivíduos; DP, desvio; L, número de locos considerados; P, proporção de locos polimórficos;  $H_e$ , heterozigidade esperada, I, índice de Shannon.

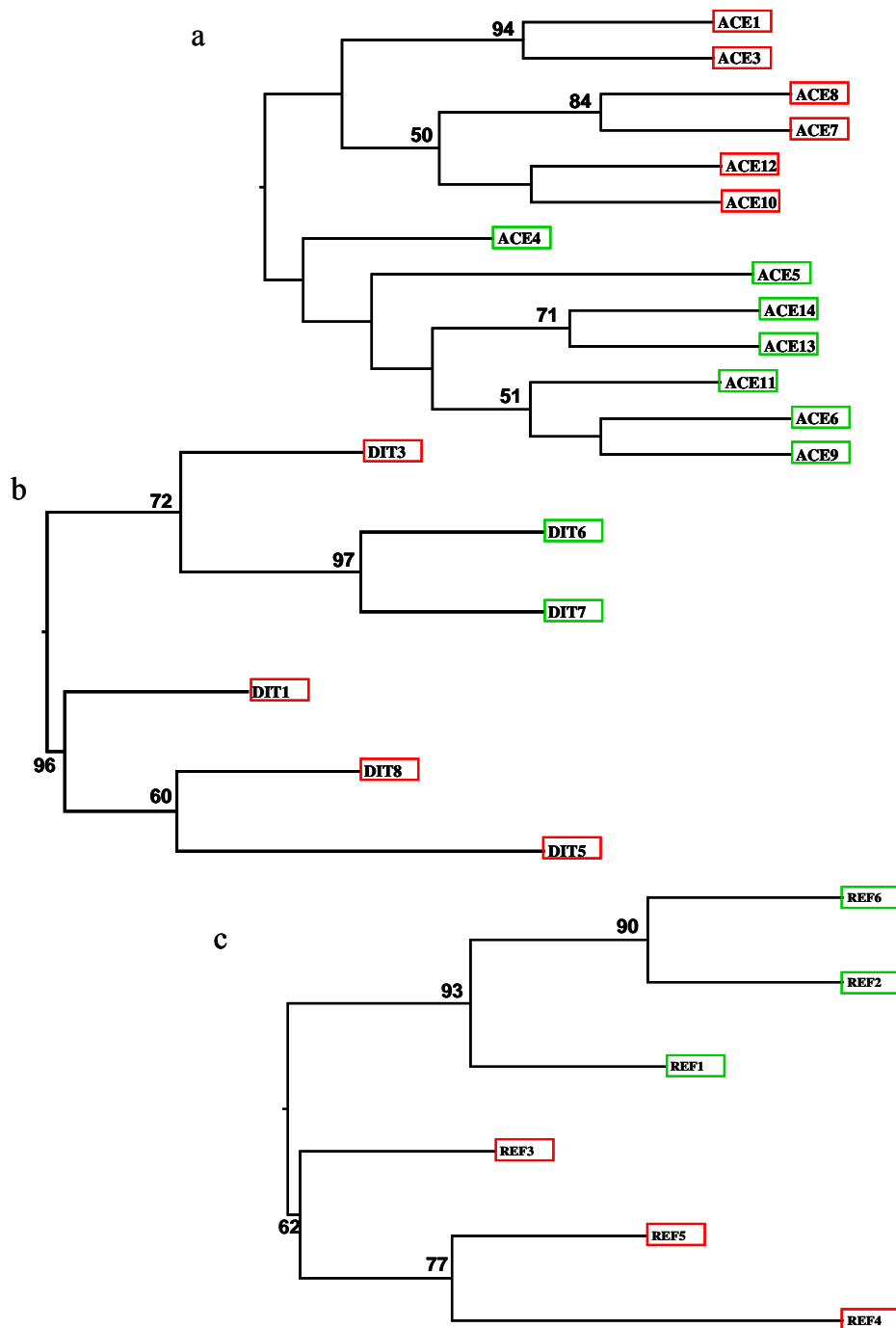
<b>Táxon</b>	<b>População</b>	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>P (%)</b>	<b><math>H_e</math> (<math>\pm</math>DP)</b>	
<i>M. acerosa</i>	ACE1	15	149	57	0,209 ( $\pm$ 0,014)	
	ACE3	15	149	56,4	0,196 ( $\pm$ 0,014)	
	ACE4	14	149	65,8	0,242 ( $\pm$ 0,014)	
	ACE5	15	149	63,8	0,254 ( $\pm$ 0,015)	
	ACE6	15	149	55,7	0,203 ( $\pm$ 0,015)	
	ACE7	15	149	48,3	0,166 ( $\pm$ 0,013)	
	ACE8	11	126	47,6	0,172 ( $\pm$ 0,015)	
	ACE9	15	149	50,3	0,181 ( $\pm$ 0,014)	
	ACE10	15	126	45,2	0,153 ( $\pm$ 0,014)	
	ACE11	15	149	44,3	0,155 ( $\pm$ 0,013)	
	ACE12	15	126	54	0,189 ( $\pm$ 0,016)	
	ACE13	15	126	50,8	0,172 ( $\pm$ 0,015)	
	ACE14	15	126	49,2	0,182 ( $\pm$ 0,015)	
	Média				52,22	0,186 ( $\pm$ 0,015)
	$H_e$ (espécie)				0,240 ( $\pm$ 0,158)	
	I (espécie)				0,382 ( $\pm$ 0,205)	
<i>M. ditassoides</i>	DIT1	14	129	82,9	0,274 ( $\pm$ 0,014)	
	DIT3	15	129	62	0,228 ( $\pm$ 0,015)	
	DIT5	15	129	53,5	0,198 ( $\pm$ 0,015)	
	DIT6	11	129	51,9	0,156 ( $\pm$ 0,015)	
	DIT7	15	129	39,5	0,150 ( $\pm$ 0,015)	
	DIT8	15	96	64,6	0,238 ( $\pm$ 0,017)	
	Média				56,10	0,197 ( $\pm$ 0,015)
		$H_e$ (espécie)				0,214 ( $\pm$ 0,146)
	I (espécie)				0,351 ( $\pm$ 0,191)	
<i>M. refractifolia</i>	REF1	15	130	70,8	0,238 ( $\pm$ 0,014)	
	REF2	15	130	62,3	0,215 ( $\pm$ 0,014)	
	REF3	15	130	64,6	0,217 ( $\pm$ 0,014)	
	REF4	15	130	62,3	0,244 ( $\pm$ 0,016)	
	REF5	15	130	70	0,249 ( $\pm$ 0,015)	
	REF6	15	130	63,1	0,230 ( $\pm$ 0,014)	
	Média				65,33	0,231 ( $\pm$ 0,015)
		$H_e$ (espécie)				0,225 ( $\pm$ 0,162)
		I (espécie)				0,359 ( $\pm$ 0,215)

**Tabela 3.** Síntese dos resultados de estrutura genética das populações obtidos com marcadores ISSR em espécies de *Minaria*. Índices de divergência entre populações: **AMOVA**, análise de variância molecular; **K**, número mais provável de grupos genéticos da análise Bayesiana de estrutura; **G<sub>ST</sub>**, (Nei 1978); **G'<sub>ST</sub>** (Hedrick 2005); **G''<sub>ST</sub>** (Meirmans e Hedrick 2011); **D** (Jost 2008).

		<i>M. acerosa</i>	<i>M. ditassoides</i>	<i>M. refractifolia</i>
<b>AMOVA</b>	<b>Entre populações</b>	34 %	28 %	17 %
	<b>Dentro de populações</b>	66 %	72 %	83 %
	<b>K</b>	2	2	2
	<b>G<sub>ST</sub></b>	0,245	0,151	0,1
	<b>G'<sub>ST</sub></b>	0,302	0,191	0,131
	<b>G''<sub>ST</sub></b>	0,307	0,199	0,137
	<b>D</b>	0,083	0,050	0,040



**Figura 5.** Grupos genéticos detectados pela análise Bayesiana de estrutura em espécies de *Minaria*, a partir de marcadores de ISSR. São ilustrados o gráfico de  $\Delta K$  e a proporção de ancestralidade dos grupos para cada espécie: **a**, *M. acerosa*; **b**, *M. ditassoides* (b1,  $K=2$  e b2,  $K=5$ ) e **c**, *M. refractifolia*.



**Figura 6.** Dendrogramas de neighbor-joining mostrando as relações fenéticas entre as populações de: **a**, *Minaria acerosa*; **b**, *M. ditassoides* e **c**, *M. refractifolia*. Populações coloridas conforme grupos genéticos detectados pela análise Bayesiana de estrutura genética. Os valores acima dos ramos representam suporte de Bootstrap acima de 50%.



## Discussão

### Diversidade genética

Os valores moderados de variabilidade genética encontrados nas espécies de *Minaria* são semelhantes aos valores obtidos em outros estudos com populações naturais de plantas, utilizando marcadores ISSR (e.g. Deshpande et al. 2001; Vicente et al. 2011), inclusive com espécies distribuídas na Cadeia do Espinhaço (Cruz et al. 2011; Lousada et al. 2011). Entretanto, todas as espécies apresentaram valores de diversidade genética intrapopulacional abaixo ou próximo àqueles descritos para plantas com características semelhantes: plantas perenes, com fecundação cruzada e dispersão pelo vento (Nybom 2004). A diversidade genética encontrada entre as espécies também foi semelhante, sendo que a endêmica *M. refractifolia* apresentou variabilidade pouco maior que suas congêneras de distribuição mais ampla, considerando valores médios das populações. No entanto, considerando a diversidade genética das espécies ( $H_e$  e  $I$ ), *M. acerosa* apresentou maior diversidade.

O sistema reprodutivo dessas espécies ainda não foi estudado, mas a morfologia floral sugere que a polinização seja cruzada. A complexa morfologia das flores das Asclepiadoideae aponta, na maioria dos casos, a dependência de insetos como vetores de polinários (Vieira e Graballos 2003). Embora casos de autocompatibilidade não sejam raros em Asclepiadeae (Kephart 1981; Lipow et al. 1999), a retirada dos polinários a partir das fendas interestaminais ainda depende da atuação de polinizadores (Vieira e Graballos 2003; Vieira e Shepherd 1999). A tribo apresenta diversos tipos de polinizadores incluindo abelhas, vespas, borboletas e moscas (Ollerton e Liede 1997). No caso de *Minaria*, as flores pequenas, brancas a amareladas, com odor forte e a floração no período chuvoso sugere que os polinizadores sejam principalmente Diptera (obs. pess.). Diptera geralmente não percorre longas distâncias e o comportamento de visita deles favorece a geitonogamia, o que levaria à diminuição dos níveis de diversidade genética (Ribeiro et al. 2008). Considerando a variação encontrada nas espécies estudadas e o comportamento do provável polinizador, portanto, é possível que a diversidade genética esteja sendo mantida nessas espécies de *Minaria* principalmente através da dispersão de sementes. No entanto, muitas espécies com sementes comosas possuem distribuição restrita. A coma é facilmente perdida e a colisão com elementos da vegetação pode limitar seu alcance (Pounden et al. 2008),

contribuindo para o isolamento das populações e, conseqüentemente, a diferenciação entre elas. A queda da coma, por outro lado, permite que a semente caia prontamente no solo sem que fique presa à vegetação e germine mais rapidamente.

Espécies com distribuição mais ampla tendem a apresentar maior variabilidade genética (Nybom 2004). No entanto, encontramos pouca diferença entre a variabilidade genética dessas três espécies de *Minaria*, apesar delas possuírem distribuições com extensões bastante distintas. Algumas espécies podem apresentar alta capacidade de dispersão, porém os limites de distribuição de uma espécie serão influenciados principalmente pela sua reprodução e as populações periféricas estão geralmente mais sujeitas a flutuações demográficas (Gaston 2011). Como as três espécies de *Minaria* se originaram no Planalto de Diamantina e se dispersaram em um tempo relativamente curto (Capítulo 3), é provável que a diversidade genética delas ainda reflita aquela presente no ancestral com distribuição restrita. A taxa de evolução lenta e/ou o tempo reduzido desde o episódio de dispersão explicariam a conservação do nicho em *Minaria* e a fragilidade das populações mais distantes do habitat ancestral. Essas espécies continuariam suscetíveis aos mesmos fatores limitantes e tenderiam à retração tão logo as condições anteriores fossem restabelecidas (Kruckeberg e Rabinowitz 1985).

#### Estrutura genética

A diferenciação entre populações reflete a amplitude da distribuição para todos os parâmetros calculados. A estruturação proporcional à distribuição indica que isolamentos por distância podem estar determinando o grau de diferenciação entre as populações. Entretanto, o teste de correlação não detectou relação entre distância genética e distância geográfica. O padrão aleatório de retrações e expansões de populações dos campos rupestres durante o Quaternário pode ter influenciado as diferenciações entre populações geograficamente próximas e correlações podem passar despercebidas. A biogeografia de *Minaria* indica que a história da linhagem foi marcada por uma contínua retração interrompida apenas por poucos e curtos pulsos de expansão (Capítulo 3).

Os índices tradicionalmente utilizados para se estimar a diferenciação genética entre populações, como  $F_{ST}$  e  $G_{ST}$ , têm sido criticados por dependerem da quantidade de variação

genética entre populações, principalmente quando a diversidade da espécie é alta (Charlesworth 1998; Jost 2008; Meirmans e Hedrick 2011), o que inviabiliza a comparação entre espécies, marcadores e regiões geográficas. Novos índices foram propostos para solucionar estes problemas. O  $G'_{ST}$  de Hedrick (2005) inclui o valor máximo do  $G_{ST}$  como meio de padronizar esta medida em função do número de populações e o  $G''_{ST}$  (Meirmans e Hedrick 2011) foi especialmente desenvolvido para corrigir a medida anterior quando o número de populações amostradas é pequeno. O  $D$  (Jost 2008), por sua vez, utiliza uma métrica baseada em número efetivo de alelos em vez da heteroziguidade. A heteroziguidade não aumenta em escala linear com a diversidade, o que leva a resultados intuitivos na descrição da diversidade (Jost 2008; Meirmans e Hedrick 2011). Porém, para dados dominantes essa medida precisa ser tratada com cautela, sendo que alelos efetivos são indiretamente estimados.

Os dados de Cruz et al. (2011) e Lousada et al. (2011), que também utilizaram locos ISSR para inferir variabilidade de espécies da Cadeia do Espinhaço, foram recalculados pelas fórmulas sumarizadas em Meirmans & Hedrick (2011) a título de comparação. Os valores de diferenciação obtidos entre as populações de *Vellozia gigantea* N.L. Menezes & Mello-Silva ( $G_{ST} = 0,196$ ;  $G'_{ST} = 0,257$ ;  $G''_{ST} = 0,265$  e  $D = 0,086$ ), espécie endêmica de afloramentos quartzíticos da Serra do Cipó, são maiores do que nas espécies com distribuição mais restrita de *Minaria* (*M. refractifolia* e *M. ditassoides*) e com valores de  $D$  semelhantes. Mas, ainda assim, são maiores do que os de *M. acerosa*, espécie amplamente distribuída. Para *Cattleya elongata* Barb. Rodr. ( $G_{ST} = 0,098$ ;  $G'_{ST} = 0,129$ ;  $G''_{ST} = 0,133$  e  $D = 0,038$ ), endêmica de solos quartzíticos da Chapada Diamantina, os valores de diferenciação foram bem semelhantes aos de *M. refractifolia*, endêmica do Planalto de Diamantina. Ainda assim, características biológicas de cada grupo podem influenciar de maneira determinante a estruturação da espécie. Portanto, comparações entre espécies congêneras são mais adequadas na comparação da estrutura populacional e na avaliação do papel do ambiente sobre elas (Gitzendanner e Soltis, 2000).

A alta concentração de variabilidade entre populações em *M. acerosa* e em *M. ditassoides* indica a estruturação destas espécies, o que pode estar ligada a isolamentos por distância. Dentro dos grupos genéticos, populações são agrupadas com alto suporte e isso reflete o fluxo gênico mais recente entre elas, enquanto que o isolamento entre os grupos

genéticos provavelmente ocorreu há mais tempo. Em *M. acerosa* por exemplo, o fluxo recente e mais constante entre as populações da Cadeia do Espinhaço reflete um maior suporte nas relações entre suas populações enquanto que o grupo genético que se espalhou pelo Cerrado se isolou deste há bem mais tempo do que suas populações se fragmentaram.

### **Considerações Finais**

A diversidade genética observada nessas três espécies de *Minaria* não está associada à extensão da distribuição geográfica. Entretanto, o aumento de diferenciação genética entre as populações proporcional à amplitude de distribuição sugere isolamento por distância. Apesar de pouco tempo de origem, essas espécies apresentaram capacidades de dispersão bastante diferenciadas. Ainda assim, os níveis de diversidade genética delas são similares e parecem refletir distribuições ancestrais com extensões semelhantes e uma dispersão relativamente rápida. Diferenciações interpopulacionais recentes surgiram e são responsáveis pela estruturação atual das populações. A julgar pelo padrão biogeográfico de expansões rápidas e retração contínua que caracterizou a evolução de *Minaria*, é provável que as espécies de maior distribuição estejam iniciando uma fase de retração de sua distribuição, começando a formar isolados geográficos que poderão se extinguir ou se diferenciar. Boa parte da distribuição periférica das espécies de ampla distribuição é efêmera e sua distribuição pode se contrair rapidamente (Gaston 2011).

Geralmente é dada prioridade para a preservação de espécies de distribuição restrita e aquelas com ampla distribuição não são enfocadas. Todavia, elas podem apresentar alta estruturação e possuem maior probabilidade de gerar novas espécies a partir de fragmentações de sua distribuição original (Kisel e Barraclough 2010). A biogeografia histórica de *Minaria* (Capítulo 3) ilustra esta idéia. No núcleo de *Minaria*, as espécies comosas se irradiaram a partir de um ancestral com ampla distribuição, dando origem a várias linhagens de distribuição mais restrita devido a uma retração contínua da distribuição da linhagem ao longo do Pleistoceno. Linhagens de ampla distribuição podem persistir ao longo da história com algumas populações se diferenciando em áreas restritas (anacladogênese; Kisel e Barraclough 2010; Stuessy et al. 2006) e este potencial evolutivo

também deve ser considerado em planos de conservação da biodiversidade (Rosauer et al. 2009).

## Referências

- Assis, ACC, Coelho RM, Pinheiro ES, Durigan G (2011) Water availability determines physiognomic gradient in an area of low-fertility soils under Cerrado vegetation. *Plant Ecol* 212:1135–1147
- Azevedo MTA, Borba EL, Semir J, Solferini, VN (2007) High genetic variability in Neotropical myophilous orchids. *Bot J Linn Soc* 153:33–40
- Borba EL, Felix JM, Solferini VN, Semir J (2001) Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *Am J Bot* 88:419–428
- Borba EL, Funch RR, Ribeiro PL, Smidt EC, Silva-Pereira V (2007a) Demography, genetic and morphological variability of the endangered *Sophranitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. *Plant Syst Evol* 267:129–146
- Borba EL, Funch RR, Ribeiro PL, Smidt EC, Silva-Pereira V (2007b) Demografia, variabilidade genética e morfológica e conservação de *Cattleya tenuis* (Orchidaceae), espécie ameaçada de extinção da Chapada Diamantina. *Sitientibus Sér Ciênc Biol* 7:211–222
- Brody JR, Kern SE (2004) Sodium boric acid: a tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechnol* 36:2–4
- Cavallari MM, Forzza RC, Veasey EA, Zucchi MI, Oliveira GCX (2006) Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Epinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodivers Conserv* 15:4357–4373
- Charlesworth B (1998) Measures of divergence between populations and the effect of forces that reduce variability. *Mol Biol Evol* 15:538–543
- Conceição AA, Pirani JR (2005) Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: Substrato, composição florística e aspectos estruturais. *Bol Bot Univ São Paulo* 23:85–111

- Conceição AS, Queiroz LP, Lambert SM, Pereira ACS, Borba EL (2008) Biosystematics of *Chamaecrista* sect. *Absus* sub-sect. *Baseophyllum* (Leguminosae-Caesalpinioideae) based on allozyme and morphometric analyses. *Plant Syst Evol* 270:183–207
- Cruz DT, Selbach-Schnadelbach A, Lambert SM, Ribeiro PL, Borba EL (2011) Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. *Plant Syst Evol* 294:87–98
- Deshpande AU, Apte GS, Bahulikar RA, Lagu MD, Kulkarni BG, Suresh HS, Singh NP, Rao MKV, Grupta VS, Pant A, Ranjekar PK (2001) Genetic diversity across natural populations of three montane plant species from the Western Ghats, India revealed by intersimple sequence repeats. *Mol Ecol* 10:2397–2408
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. *Phytochem Bull Bot Soc Am* 19:11–15
- Earl DA (2011) Structure Harvester version 0.6.6. <http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/structureHarvester/>. 20 July 2011
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genet* 131:479–491
- Felsenstein J (1989) PHYLIP: phylogeny inference package version 3.2 *Cladistics* 5:163–166
- Felsenstein J (2011) PHYLIP: phylogeny inference package version 3.69. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>. 21 July 2011.
- Franceschinelli EV, Jacobi CM, Drummond MG, Resende MFS (2006) The genetic diversity of two Brazilian *Vellozia* (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. *Ann Bot* 97:585–592
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. (2004) A primer of conservation genetics. Cambridge University Press, New York.
- Gaston, KJ (2011) Geographic range limits: achieving synthesis. *Proc R Soc B* 276:195–1406

- Gomes V, Collevatti RG, Silveira FAO, Fernandes GW (2004) The distribution of genetic variability in *Baccharis concinna* (Asteraceae), an endemic, dioecious and threatened shrub of rupestrian fields of Brazil. *Conserv Genet* 5:157–165
- Harley RM (1995) Introduction. In: Stannard BL (ed) *Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp 1–40
- Hedrick PW (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evol* 59: 1633–1638
- Jacobi CM, Carmo FF (2008) Diversidade dos campos rupestres ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero, MG. *Megadivers* 4:24–31
- Jesus FF, Abreu AG, Semir J, Solferini VN (2009) Low genetic diversity but local genetic differentiation in endemic *Minasia* (Asteraceae) species from Brazil. *Plant Syst Evol* 277:187–196
- Jesus FF, Solferini VN, Semir J, Prado PI (2001) Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. *Plant Syst Evol* 226:59–68
- Jost L (2008) GST and its relatives do not measure differentiation. *Mol Ecol* 17:4015–4026
- Kephart SR (1981) Breeding systems in *Asclepias incarnata* L., *A. syriaca* L., and *A. verticillata* L. *Am J Bot* 68:226–232
- Kisel Y, Barraclough TG (2010) Speciation has a spatial scale that depends on levels of gene flow. *Am Nat* 175:316–334
- Konno TUP, Rapini A, Goyder DJ, Chase MW (2006) The new genus *Minaria* (Asclepiadoideae, Apocynaceae). *Taxon* 55:421–430
- Kruckeberg AR, Rabinowitz D (1985) Biological aspects of rarity in higher plants. *Annu Rev Ecol Syst* 16:447–479
- Lambert SM, Borba EL, Machado MC (2006a) Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus* × *albicephalus* (*Melocactus ernestii* × *M. glaucescens*) in northeastern Brazil. *Plant Species Biol* 21:93–108
- Lambert SM, Borba EL, Machado MC, Andrade SCS (2006b) Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, north-eastern Brazil. *Ann Bot* 97:389–403

- Lipow SR, Broyles SB, Wyatt R (1999) Population differences in self-fertility in the "self-incompatible" milkweed *Asclepias exaltata* (ASCLEPIADACE). *Am J Bot* 86:1114–1120
- Lousada JM, Borba EL, Ribeiro KT, Ribeiro LC, Lovato MB (2011) Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. *Genet* 139:431–440
- McCune B, Mefford MJ (1999) PC-Ord—multivariate analysis of ecological data, version 4.10. MjM Software, Gleneden Beach
- Meirmans PG, Hedrick PW (2011) Assessing population structure: FST and related measures. *Mol Ecol Resour* 11:5–18
- Meirmans PG, Van Tienderen PH (2004) GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol Ecol Notes* 4:792–794
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genet* 89:583–590
- Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol* 13:1143–1155
- Ollerton J, Liede S (1997) Pollination systems in the Asclepiadaceae: a survey and preliminary analysis. *Bot J Linn Soc* 62:593–610
- Pereira ACS, Borba EL, Giulietti AM (2007) Genetic and morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae), from the Chapada Diamantina, Brazil: implications for conservation and taxonomy. *Bot J Linn Soc* 153:401–416
- Pounden E, Greene DF, Quesada M & Sánchez JMC (2008) The effect of collisions with vegetation elements on the dispersal of winged and plumed seeds. *J Ecol* 96:591–598
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genet* 155:945–959
- Rapini A (2010) Revisitando as Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço. *Bol Bot Univ São Paulo* 28:97–123
- Rapini A, Berg C, Liede-Schumann S (2007) Diversification of Asclepiadoideae (Apocynaceae) in the New World. *Ann Mo. Bot Gard* 94:407–422



- Rapini A, Chase MW, Goyder DJ, Griffiths J (2003) Asclepiadeae classification: evaluating the phylogenetic relationships of NewWorld Asclepiadoideae (Apocynaceae). *Taxon* 52:33–50
- Rapini A, Chase MW, Konno TUP (2006) Phylogenetics of South American Asclepiadeae (Apocynaceae). *Taxon* 55:119–124
- Rapini A, Ribeiro PL, Lambert S, Pirani JR (2008) A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadivers* 4:16–24
- Rosauer D, Laffan SW, Crisp MD, Donnellan SC, Cook LG (2009) Phylogenetic endemism: a new approach for identifying geographical concentrations of evolutionary history. *Mol Ecol* 18:4061–4072
- Stuessy TF, Jakubowsky G, Gómez RS, Pfosser M, Schlüter PM, Fer T, Sun BY, Kato H (2006) Anagenetic evolution in island plants. *J Biogeogr* 33:1259–1265
- Talhinhas P, Neves-Martins J, Leitão J (2003) AFLP, ISSR and RAPD markers reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus* spp. *Plant Breed* 122:507–510
- Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldan-Ruiz I (2002) Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Mol Ecol* 11:139–151
- Viccini LF, Costa DCS, Machado MA, Campos AL (2004) Genetic diversity among nine species of *Lippia* (Verbenaceae) based on rapd markers. *Plant Syst Evol* 246:1–8
- Vicente MJ, Segura F, Aguado M, Migliaro D, Franco JA, Martínez-Sánchez JJ (2011) Genetic diversity of *Astragalus nitidiflorus*, a critically endangered endemic of SE Spain, and implications for its conservation. *Bioch Syst Ecol* 38:175-182
- Vieira MF, Grabalos R (2003) Sistema reprodutivo de *Oxypetalum mexiae* Malme (Asclepiadaceae), espécie endêmica de Viçosa, MG, Brasil, em perigo de extinção. *Acta Bot Bras* 17:137–145
- Vieira MF, Shepherd GJ (1999) Pollinators of *Oxypetalum* (Asclepiadaceae) in southeastern Brazil. *Rev Bras Biol* 59:693–704
- Wolfe AD, Xiang QY, Kephart SR (1998) Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. *Mol Ecol* 7:1107–1125

Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ (1999) POPGENE 1.32, the user-friendly shareware for population genetic analysis. [http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene\\_download.html](http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html). 20 july 2011

**Anexo 1.** Tabela de distância genética de Nei (1978) (abaixo da diagonal) e geográfica em quilômetros (acima) de *Minaria acerosa*.

	<b>ACE1</b>	<b>ACE3</b>	<b>ACE4</b>	<b>ACE5</b>	<b>ACE6</b>	<b>ACE7</b>	<b>ACE8</b>	<b>ACE9</b>	<b>ACE10</b>	<b>ACE11</b>	<b>ACE12</b>	<b>ACE13</b>	<b>ACE14</b>
<b>ACE1</b>	0	184.2	388.4	500.8	1189.0	369.0	397.2	538.6	291.7	1392.8	166.0	840.0	611.6
<b>ACE3</b>	0.079	0	265.1	377.6	1015.6	528.9	560.7	359.6	192.6	1255.2	116.9	946.5	474.0
<b>ACE4</b>	0.112	0.125	0	114.4	830.2	757.4	785.2	253.1	98.9	1351.4	222.6	1207.5	223.5
<b>ACE5</b>	0.101	0.108	0.066	0	745.1	869.4	896.6	258.0	209.2	1383.3	334.9	1321.7	117.4
<b>ACE6</b>	0.168	0.131	0.120	0.084	0	1544.1	1576.2	657.8	925.3	1244.4	1035.0	1900.9	631.9
<b>ACE7</b>	0.112	0.094	0.146	0.106	0.106	0	35.3	886.7	660.2	1528.0	534.8	522.4	980.6
<b>ACE8</b>	0.211	0.213	0.192	0.180	0.241	0.169	0	919.2	687.5	1560.5	562.6	516.4	1008.6
<b>ACE9</b>	0.136	0.130	0.101	0.061	0.076	0.080	0.216	0	317.7	1125.8	398.8	1262.7	253.5
<b>ACE10</b>	0.221	0.217	0.181	0.195	0.260	0.218	0.049	0.225	0	1369.3	125.9	1119.5	321.9
<b>ACE11</b>	0.161	0.188	0.110	0.085	0.100	0.118	0.245	0.078	0.237	0	1366.9	1509.7	1363.1
<b>ACE12</b>	0.226	0.259	0.183	0.206	0.277	0.220	0.051	0.229	0.051	0.254	0	996.7	446.0
<b>ACE13</b>	0.260	0.257	0.198	0.181	0.247	0.247	0.076	0.207	0.090	0.237	0.087	0	1420.4
<b>ACE14</b>	0.240	0.259	0.172	0.160	0.212	0.232	0.080	0.185	0.084	0.199	0.086	0.045	0

**Anexo 2.** Tabela de distância genética de Nei (1978) (abaixo da diagonal) e geográfica em quilômetros (acima) de *Minaria ditassoides*.

	<b>DIT1</b>	<b>DIT3</b>	<b>DIT5</b>	<b>DIT6</b>	<b>DIT7</b>	<b>DIT8</b>
<b>DIT1</b>	0	207.59	211.59	295.27	228.02	313.60
<b>DIT3</b>	0.047	0	18.17	88.65	27.92	109.79
<b>DIT5</b>	0.039	0.036	0	90.44	41.16	113.84
<b>DIT6</b>	0.082	0.051	0.052	0	67.85	25.69
<b>DIT7</b>	0.047	0.035	0.036	0.024	0	85.83
<b>DIT8</b>	0.042	0.048	0.020	0.069	0.051	0

**Anexo 3.** Tabela de distância genética de Nei (1978) (abaixo da diagonal) e geográfica em quilômetros (acima) de *Minaria refractifolia*.

	<b>REF1</b>	<b>REF2</b>	<b>REF3</b>	<b>REF4</b>	<b>REF5</b>	<b>REF6</b>
<b>REF1</b>	0	36.29	38.83	7.80	16.52	35.56
<b>REF2</b>	0.012	0	17.24	35.04	35.95	51.95
<b>REF3</b>	0.024	0.027	0	41.03	30.75	40.80
<b>REF4</b>	0.030	0.045	0.020	0	23.62	43.21
<b>REF5</b>	0.023	0.038	0.022	0.014	0	20.34
<b>REF6</b>	0.039	0.031	0.063	0.066	0.059	0