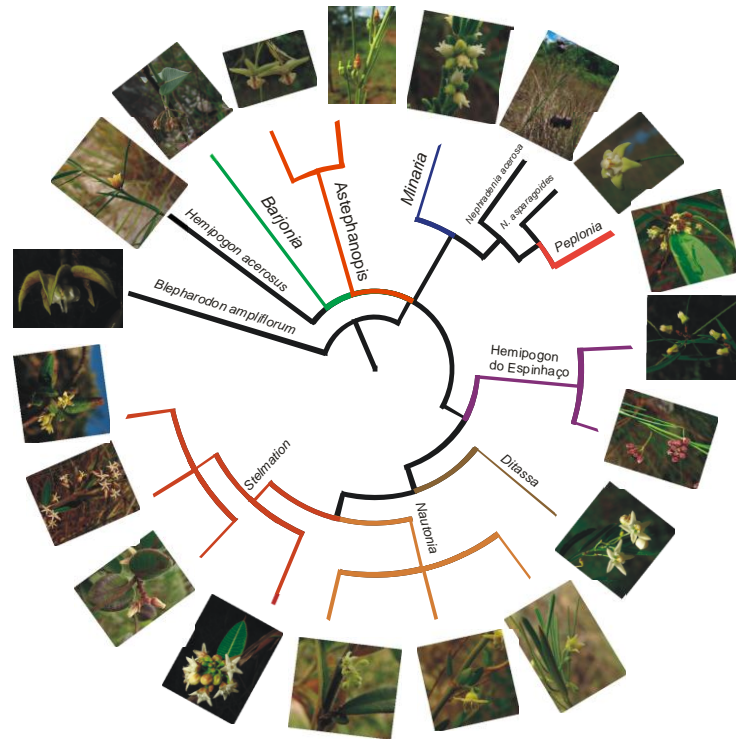


UIARA CATHARINA SOARES E SILVA



**Estudos filogenéticos moleculares em
Metastelmatinae (Asclepiadoideae, Apocynaceae)**

Feira de Santana - Bahia
2010



**Universidade Estadual de Feira de Santana
Departamento de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Botânica**



**Estudos filogenéticos moleculares em
Metastelmatinae (Asclepiadoideae, Apocynaceae)**

UIARA CATHARINA SOARES E SILVA

Dissertação 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 *Mestre em Botânica*.

ORIENTADOR: Prof. Dr. ALESSANDRO RAPINI

**Feira de Santana – Bahia
2010**

À minha família, em especial aos meus pais por todo amor e confiança e à minha avó Maria dos Anjos (*in memoriam*), pelo exemplo de mãe e mulher.

“...inferring basal relationships within a tree accurately seems to be a universal problem in phylogenetics that has no simple solution.”

(Bininda - Emonds, 2003)

AGRADECIMENTOS

São muitas as Instituições e pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. Espero não ser injusta me esquecendo de alguma delas. Desta forma, gostaria de agradecer à CAPES pela bolsa de Mestrado concedida; à FAPESB pelo financiamento do projeto “Diversidade e filogenia das Asclepiadoideae (Apocynaceae) brasileiras, com ênfase na flora do Nordeste”, coordenado por Alessandro Rapini (orientador) do qual faz parte este trabalho; à UEFS pelas oportunidades oferecidas.

Ao PPBio pelo financiamento de algumas das viagens de campo; ao PPGBot/UEFS, principalmente ao seu corpo docente pelos ensinamentos e amizade e à Adriana, por ser sempre tão solícita. Agradeço ainda ao LAMOL, onde realizei a maior parte deste trabalho, especialmente a Cássio van Den Berg (coordenador), pelo apoio logístico e computacional e a Ricardo (técnico), pela solicitude e amizade; ao LAPEM, onde foram realizadas as clonagens, em especial à Goreti por sempre fazer mágica multiplicando as placas de Petri; à Profa. Maria Gabriela pela disponibilização de alguns equipamentos do laboratório de Tecnologia em Alimentos utilizados durante o período de clonagem.

Ao Parque Nacional da Serra do Cipó, principalmente pelo alojamento fornecido, aos Parques Nacionais da Chapada dos Veadeiros, Chapada dos Guimarães e Chapada Diamantina por ter nos recebido sempre tão bem e permitido nossas coletas.

Agradeço também ao meu orientador, Alessandro Rapini, pela orientação, ensinamentos, criatividade, investimento e alguns puxões de orelha e à Sigrid Liederschumann pela parceria, preocupação, co-orientação informal e Sequências enviadas.

Aos amigos conquistados ao longo destes seis anos de UEFS (Graduação e Mestrado), especialmente Cíntia, Monique, Marry, Solange, Paulinho, Tarciso,

Alessandra, Davi, Tasciano e Grênivel, pela amizade, ajuda em muitos momentos difíceis, mas também companheiros de estudo e de muitas festas. Aos queridos amigos mineiros Fabrício e Ana Luísa, pela coleta de *P. asteria*, pelos divertidos e saborosos almoços, jantares e pães de queijo. A todos os companheiros de laboratório, María Cristina, minha amiga e companheira de clonagem e de trabalhos nos finais de semana, Élvia; Paty Luz (também companheira de coletas); Sil, principalmente por sempre ter um computador pra me emprestar quando o meu apresentava algum problema (quantos apuros!); Laura, sempre preocupada e disposta a ajudar, seja na mudança de casa ou emprestando um ombro amigo. A Marla, Ana Luiza, Tutty, Ricardo, Juliana, Aline, Déa, Ciça, Milene e Luísa pela companhia e carinho durante estes anos de convivência.

Agradeço ainda à minha família, em especial aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado, mesmo distantes, pelo amor demonstrado e confiança depositada. Aos meus irmãos, primos, tios e avós pelo verdadeiro sentimento de família e ao meu namorado João Victor, por ser tão companheiro, paciente (e como!), compreensivo e pelo enorme carinho. Amo muito vocês!

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO

1

MATERIAL E MÉTODOS

12

RESULTADOS

19

DISCUSSÃO

38

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

51

ANEXO

61

Resumo

A subtribo *Metastelmatinae* (Asclepiadoideae, Apocynaceae) está bem distribuída ao longo do Neotrópico, com grande parte de sua diversidade concentrada nas regiões montanhosas do noroeste da América do Sul e do Brasil Central, além das ilhas do Caribe. Compreende 13 gêneros e cerca de 260 espécies cujas relações de afinidade são bastante complexas possivelmente devido à diversificação relativamente rápida e recente da linhagem, há cerca de 12 milhões de anos. O objetivo desse estudo foi reconstruir a filogenia de *Metastelmatinae* a partir de dados moleculares, incluindo mais de 70 espécies da subtribo, dentre elas *Hemipogon abietoides*, conhecida apenas pelo material-tipo coletado em 1825 e cuja afinidade taxonômica era motivo de debate. Para as análises filogenéticas, foram utilizados os marcadores plastidiais *trnT-F*, *trnS-G*, *rps16*, *matK*, *psbA* e *trnE-Y*, os dois últimos inéditos na família, e o nuclear ITS. As Análises de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana produziram resultados incongruentes entre plastídio e ITS; uma Superárvore foi, então, produzida na tentativa de reunir esses resultados. Nove clados foram detectados pelas análises de plastídio, mas apenas dois deles foram recuperados com ITS. A Superárvore apresentou 18 clados sustentados, 23 ambíguos e 15 conflitantes. Nenhum gênero avaliado se mostrou monofilético, mas alguns padrões puderam ser detectados. A proximidade entre espécies eretas e volúveis de *Hemipogon* da Cadeia do Espinhaço, antes incluídas em *Astephanus* e *Metastelma*, apresentou alto suporte. *Macroditassa* é polifilético, com *M. melantha* aparecendo entre espécies de *Ditassa*, enquanto *M. adnata* (espécie-tipo do gênero) e *M. macrophylla* formam um grado em relação a *Peplonia*, justificando a sinonimização do gênero em *Peplonia*. Da mesma forma, *Minaria* se mostrou parafilético sem a inclusão de *Barjonia harleyi* e *Hemipogon harleyi*, justificando a transferência dessas espécies para o gênero.

Palavras-Chave: Asclepiadaceae, Incongruência filogenética, ITS, marcadores plastídias, Superárvore.

Abstract

[Molecular phylogenetic studies in Metastelmatinae (Asclepiadoideae, Apocynaceae)] Metastelmatinae is widely distributed in the Neotropic and most diversified in mountain ranges of the northwestern South America and Central Brasil, besides Caribbean islands. It includes 13 genera and about 260 species with complex relationships, possibly caused by the rapid and recent diversification of the lineage at 12 million years ago. The aim of this study is to recover the phylogeny of Metastelmatinae using molecular data and more than 70 species of the subtribe. During the expeditions, rare species were collected to fill important taxonomic gaps, including *Hemipogon abietoides*, known only because of the type collected in 1825 and whose taxonomic affinities have been discussed. For phylogenetic analyses, the plastidial regions *trnT-F*, *trnS-G*, *rps16*, *matK*, *psbA*, and *trnE-Y*, these last two are used for the first time in the family, and the nuclear ITS were sequenced. Parsimony analyses and Bayesian inferences produced several conflicts between plastidial regions and ITS. Topological information from the trees generated with plastidial regions and with ITS were fused in a Supertree. Nine clades emerged from the plastidial combined analyses, but only two of them were recovered by ITS. The Supertree presented 18 supported clades, 23 equivocal clades and 15 clades that conflict with the source trees. There is not any genus that emerged as monophyletic, but some patterns could be detected. Affinities between erect and voluble species of *Hemipogon* from the Espinhaço Range previously included in *Astephanus* and *Metastelma* presented high support. *Macroditassa* is polyphyletic, having *M. melhantha* among species of *Ditassa* whereas *M. adnata* (the type of the genus) and *M. macrophylla* form a grade to *Peplonia*, which justify the synonymization of the former genus in the latter. Likewise, without *Barjonia harleyi* and *Hemipogon harleyi*, *Minaria* is paraphyletic, justifying the transference of the two species to *Minaria*.

Key Words: Asclepiadaceae, phylogenetic incongruences, plastidial markers, ITS, Supertree.

**Estudos filogenéticos moleculares em
Metastelmatinae (Asclepiadoideae, Apocynaceae)**

INTRODUÇÃO

Grupo de estudo

De acordo com a atual classificação (Endress & Bruyns, 2000; Endress & al., 2007), Apocynaceae compreende cinco subfamílias: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae. Abrange cerca de 400 gêneros e 4.500 espécies, estando entre as dez maiores famílias de angiospermas (Rapini, 2004). Possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo principalmente nos trópicos e subtropicais (Struwe & al., 1994).

Desde o “renascimento” de Apocynaceae s.l. (primeiro simpósio de Apocynaceae, XVI Congresso Internacional de Botânica, St. Louis, 1999), passando pelo “iluminismo” (segundo simpósio da família, XVII Congresso Internacional de Botânica, Viena, 2005) até os dias atuais, muito se tem acrescentado à sistemática da família, principalmente em Asclepiadoideae, sua maior subfamília, com cerca de 3.000 espécies e 172 gêneros (Meve, 2002; Endress & al., 2007). Este acréscimo no conhecimento deve-se, sobretudo, ao grande número de estudos filogenéticos utilizando dados moleculares e que levaram a mudanças taxonômicas, produziram hipóteses biogeográficas mais consistentes e propiciaram interpretações mais objetivas sobre a evolução morfológica no grupo.

Liede (1997) fez uma sinopse das subtribos de Asclepiadeae, baseada em supostas sinapomorfias morfológicas, sinonimizando alguns de seus gêneros. Bruyns (1999) se mostrou insatisfeito em relação às supostas sinapomorfias morfológicas que, segundo ele, representariam homoplasias. Além disso, gêneros sulamericanos representativos foram omitidos na classificação de Liede, dentre eles *Barjonia* Decne., *Jobinia* E.Fourn., *Nephradenia* Decne. e *Petalostelma* E.Fourn. Ainda assim, a proposta de Liede (1997) é a mais abrangente e atualizada para a classificação da tribo.

Rapini (2002) discutiu a circunscrição e a classificação de alguns gêneros neotropicais de Asclepiadoideae (para a morfologia geral de Asclepiadoideae, veja Rapini & al., 2001), mostrando que a taxonomia da subfamília, especialmente em Asclepiadeae, é pragmática e, em muitos casos, artificial, baseada em poucos caracteres selecionados *a priori*. Ele sugeriu então, que a morfologia vegetativa, a qual tem sido bastante desprezada, talvez ofereça caracteres mais conservativos que os florais, já que estes, como é o caso da coroa, possuem grande plasticidade mesmo no nível de espécie, o que dificulta o seu uso na delimitação de gêneros.

Os primeiros estudos filogenéticos em Asclepiadoideae focaram grupos taxonômicos mais inclusivos (famílias e subfamílias), utilizando os marcadores plastidiais codificantes *rbcL* (Sennblad & Bremer, 1996, 2000) e *matK* (Civeyrel & al., 1998). A partir daí, outros estudos focaram grupos menos inclusivos, principalmente do Velho Mundo, utilizando o marcador nuclear ribossomal ITS (dois espaçadores e o gene 5.8; Meve & Liede, 2001; Liede & Kunze, 2002) e os plastidiais, principalmente da região *trnT-F* (espaçadores *trnT-L* e *trnL-F* e o intron *trnL*; Liede & Täuber, 2000, 2002; Liede, 2001; Meve & Liede, 2001, 2002; Potgieter & Albert, 2001; Liede & Kunze, 2002; Liede & al., 2002).

As relações entre as Asclepiadoideae do Novo Mundo, compostas principalmente por membros de Asclepiadeae, sua maior tribo, passaram a ser mais bem compreendidas a partir de análises filogenéticas com *trnL-F* (Rapini & al., 2003). Esses estudos revelaram que as espécies neotropicais estão divididas em apenas quatro linhagens: *Marsdenia* R.Br., *Asclepias* L., *Cynanchum* L. subg. *Mellichampia* Sundell e o clado MOOG (incluindo as subtribos Metastelmatinae, Orthosiinae, Oxypetalinae e Gonolobinae).

A região neotropical representa um dos principais centros de diversidade de Asclepiadoideae, incluindo cerca de 40% das espécies da subfamília (Mevé, 2002; Rapini

& al., 2007). A maior parte dessa diversidade (cerca de 760 espécies) pertence ao clado MOOG, linhagem predominantemente sulamericana responsável por 80% das espécies de Asclepiadoideae do continente (Rapini, dados não publicados). Além das subtribos supra mencionadas, o clado é formado por um grado basal composto pelos gêneros *Pentacyphus* Schltr. e *Diplolepsis* R.Br. (Liede-Schumann & al., 2005). *Pentacyphus* é o grupo irmão do restante do clado e inclui três espécies andinas com distribuição disjunta, *P. andinus* (Ball.) Liede no Peru, *P. lehmannii* (Schltr.) Liede no Equador e na Colômbia e *P. tamanus* (Morillo) Liede na Colômbia e na Venezuela. *Diplolepsis* está restrito à Argentina e Chile e inclui cerca de dez espécies. Enquanto as relações entre Metastelmatinae, Oxypetalinae e Gonolobinae (MOG) não estão resolvidas no núcleo do clado, a posição de Orthosiinae como grupo irmão de MOG é bem sustentada (Liede-Schumann & al., 2005).

Os estudos filogenéticos mais recentes (Liede-Schumann & al., 2005; Rapini & al., 2006) indicaram que *Funastrum* E.Fourn., inicialmente incluído em Asclepiadinae (Schumann, 1895) e posteriormente em Metastelmatinae (Liede & Albers, 1994; Liede, 1997) é grupo irmão das demais Oxypetalinae, cujo grupo central é composto por dois cladros principais: *Oxypetalum* e *Araujia-Philibertia*, mas as relações entre suas espécies e o monofiletismo do seu maior gênero, *Oxypetalum* (ca. 120 espécies), ainda não foram estabelecidos (Farinaccio, 2007). Apesar dos avanços em Gonolobinae (Krings & al., 2008), a qual já foi considerada uma tribo à parte (Gonolobeae; Schumann, 1895), as relações entre a maioria de seus representantes permanece confusa e a delimitação de seu maior gênero, *Matelea* Aubl., não foi resolvida. Metastelmatinae, por sua vez, é uma das subtribos mais promissoras para estudos filogenéticos no Brasil e sua taxonomia tem apresentado progressos notáveis.

Metastelmatinae

A subtribo Metastelmatinae (senso Liede, 1997) tem como provável sinapomorfia a presença de uma corona ginostegial, derivada da fusão das partes estaminal e interestaminal. Ela está bem distribuída ao longo do Neotrópico com grande parte de sua diversidade concentrada nas regiões montanhosas do noroeste da América do Sul e do Brasil Central, além das ilhas do Caribe, tornando-se menos diversa para a América do Norte e sul da América do Sul (Liede & Meve, 2004; Rapini & al., 2007). Compreende 13 gêneros e cerca de 260 espécies, incluindo desde gêneros monotípicos, como *Nautonia* Decne. (*N. nummularia* Decne.), até seus dois maiores gêneros, *Metastelma* R.Br. e *Ditassa* R.Br., com cerca de 70 e 100 espécies, respectivamente (Liede & Meve, 2004; Konno & Fontella, 2004). Embora vários de seus gêneros tenham sido incluídos em estudos filogenéticos com dados moleculares (Rapini & al., 2003, 2006, 2007; Liede-Schumann & al., 2005), a circunscrição genérica na subtribo continua instável. O monofiletismo de alguns gêneros tem sido contestado, mas a falta de estudos mais abrangentes e a ausência de sustentação para alguns clados têm impedido rearranjos confiáveis em sua taxonomia.

A dificuldade na sistemática de Metastelmatinae parece estar relacionada à grande diversidade morfológica associada a uma diversificação relativamente rápida e recente na subtribo, há cerca de 12 milhões de anos (Ma) (Rapini & al., 2007). Tal combinação parece ter levado a um descompasso entre a grande variabilidade morfológica observada no grupo e a baixa variabilidade molecular verificada através dos diversos marcadores plastidiais. Há, também, uma grande dificuldade de se trabalhar com sequências nucleares com altas taxas de substituição, como o ITS. Isso porque eles apresentam cópias parálogas polimórficas em um mesmo indivíduo, exigindo clonagem dos produtos da PCR para o sequenciamento (Rapini & al., 2006).

Alguns estudos recentes têm contribuído para uma mudança na taxonomia das Asclepiadoideae brasileiras, especialmente em Metastelmatinae, levando à recircunscrição e criação de gêneros. *Hemipogon* Decne., por exemplo, passou a incluir espécies antes tratadas em *Astephanus* R.Br. e *Metastelma*, compondo um grupo cujas flores podem ou não possuir corona (Rapini & al., 2001). *Peplonia* Decne., definido pela corona dupla, foi expandido de modo a incluir as espécies de *Gonioanthea* Malme, com corona simples (Rapini & al., 2004; Liede-Schumann & al., 2005) e *Minaria* T.U.P.Konno & Rapini foi proposto para abrigar 19 espécies segregadas de *Ditassa*, e pode apresentar corona simples, dupla ou ausente (Konno & al., 2006; Rapini & al., 2006). A delimitação de muitos gêneros da subtribo, no entanto, permanece artificial e o acesso à natureza filogenética desses táxons ainda é escasso.

Caracterização dos gêneros de Metastelmatinae

Barjonia foi descrito por Decaisne (1844) e recebeu este nome em homenagem a Barjon, doutor em História Natural das Guianas. Inclui subarbustos eretos, raramente ramificados, com folhas subsésseis, patentes, coriáceas e glabras, e flores campanuladas. Inclui sete espécies: *B. chloraeifolia* Decne., *B. cymosa* E.Fourn., *B. erecta* (Vell.) K.Schum. (espécie-tipo), *B. glaziovii* Marquete, *B. grazielae* Fontella & Marquete, *B. harleyi* Fontella & Marquete e *B. laxa* Malme. Sua posição taxonômica já foi bastante questionada devido à caracterização dos seus polínios. Schumann (1895) incluiu o gênero em Marsdenieae por considerar seus polínios quase sempre eretos. Entretanto, considera-se atualmente seus polínios pendentes e *Barjonia* é classificada em Asclepiadeae (Marquete, 1979).

O gênero encontra-se distribuído nos cerrados, campos limpos e rupestres dos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás, Distrito Federal, Bahia,

Minas Gerais, São Paulo e Paraná, sendo que *B. erecta* chega ao Suriname (Fontella-Pereira & Pereira, 2005). Sua afinidade com *Blepharodon* Decne. e *Nephradenia* (gêneros também pertencentes a Metastelmatinae) foi considerada por Malme ainda em 1900 e confirmada por outros estudos (ex.: Rapini & al., 2007). Esses estudos mostraram que o gênero *Blepharodon* foi o primeiro a divergir em Metastelmatinae, seguido pelo grado sulamericano composto por *Minaria* e o clado *Barjonia-Nephradenia*.

Blepharodon inclui principalmente trepadeiras, exceto *B. lineare* (Decne.) Decne. (espécie-tipo, subarbusto ereto), com lacínias da corola ciliadas e lobos da coroa geralmente naviculares. É um gênero com 8 a 14 espécies (Goyder, 2009), ocorrendo desde a América Central ao Norte da Argentina, em campos rupestres, cerrados, restingas, brejos, caatingas, floresta pluvial primária, capoeiras e ambientes antropizados (Ferreira & Pereira, 2005).

Ao fazer a revisão de *Blepharodon*, Morillo (1976) o definiu como um gênero polifilético. Estudos moleculares (Rapini & al., 2003, 2006; Liede-Schumann & al., 2005; Silva, 2008) atestaram o polifiletismo do gênero, sugerindo que ele deva ser reduzido a apenas duas espécies, *B. lineare* (Decne.) Decne. e *B. ampliflorum* E.Fourn., as quais já foram consideradas sinônimos (Morillo, 1976; Ferreira & Pereira, 2005).

Ditassa é um gênero composto por cerca de 100 espécies e está distribuído por toda a América Latina, exceto no Chile. Apresenta como centros de diversidade o Planalto das Guianas, sobretudo na Venezuela, e o Planalto Central Brasileiro, principalmente em Minas Gerais (Konno, 2005). Ocorre em campos rupestres, cerrados, campos de altitude, caatingas, restingas, floresta pluvial primária e secundária, orla da floresta e lugares sob forte ação antrópica (Konno & Pereira, 2005).

O gênero foi descrito por Brown (1810), sendo definido principalmente por incluir subarbustos de ramos volúveis e flores com corola sub-rotácea e coroa estaminal dupla.

Entretanto, com a descrição de mais espécies, a circunscrição do gênero foi ampliada e *Ditassa* passou a incluir uma maior diversidade morfológica, incluindo espécies com hábito ereto, por exemplo. Outros gêneros, como *Macroditassa* Malme e *Minaria*, foram segregados de *Ditassa*, o primeiro por apresentar inflorescências opostas e axilares, contrastando com as inflorescências alternas e subaxilares de *Ditassa* (Fontella-Pereira & Ferreira, 2005), e o segundo pelo hábito subarborescente com folhas diminutas, sendo seu monofiletismo bem sustentado com base em dados moleculares (Rapini & al., 2006).

Ao revisar as espécies brasileiras de *Ditassa*, Konno (2005) chegou a reconhecer cinco complexos morfológicos e quatro grupos de espécies, baseados em similaridades morfológicas e, quase sempre, condicionados a um determinado habitat ou distribuição. Contudo, esse gênero permanece polifilético (Rapini & al., 2003, 2006; Liede-Schumann & al., 2005; Silva 2008) e uma delimitação mais adequada do ponto de vista filogenético ainda não está disponível.

Hemipogon, outro gênero cuja circunscrição é bastante complexa, inclui cerca de 10 espécies, sendo reconhecido pelas folhas estreitas, corona raramente presente e asas da antera geralmente triangulares ou falcadas medianamente (Rapini, 2002). Tem como centro de diversidade o Planalto Central Brasileiro e a Cadeia do Espinhaço. Ocorre em cerrados e campos rupestres nos estados de Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Bahia, São Paulo e Paraná.

Algumas espécies de *Hemipogon* foram tratadas em *Astephanus* R.Br., gênero definido pela ausência de corona. Liede (1994), no entanto, restringiu *Astephanus* às espécies da África do Sul. As espécies brasileiras de *Astephanus* com hábito volúvel e folhas lineares foram então consideradas em *Hemipogon*, e o gênero passou a incluir também espécies eretas e com corona, tratadas previamente em *Metastelma* (Rapini & al., 2001). A proximidade filogenética entre esses dois grupos de espécies representados por *H.*

carassensis (Malme) Rapini e *H. luteus* E.Fourn., sem corona, e *H. hemipogonoides* (Malme) Rapini, com corona foi recentemente sinalizada com base em dados moleculares (Silva, 2008).

Hypolobus E.Fourn. é um gênero monotípico (*H. infractus* E.Fourn.). Sua espécie é conhecida apenas pela coleção-tipo, coletada por Luschnath ainda no século XIX, e tem sido considerada extinta (Fontella-Pereira & Konno, 1999). Era tratado em Gonolobinae (Liede, 1997), porém Fontella-Pereira & Konno (1999) consideraram-no afim de *Petalostelma* e sugeriram sua transferência para Metastelmatinae. Ele difere de *Petalostelma* principalmente pelas inflorescências em cincínios alongados, mas estudos objetivos ainda são necessários para que seu posicionamento seja confirmado.

Macroditassa Malme é um gênero exclusivo da América do Sul, sendo encontrado na Guiana, Venezuela, Peru, Bolívia e Brasil. Inclui 14 espécies, 11 destas representadas no Brasil, nos estados da Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo. Habitam florestas pluviais atlânticas, cerrado, cerradão, campos rupestres, campos altimontanos e restingas (Fontella-Pereira & Ferreira, 2005). É caracterizado pelas trepadeiras com inflorescências axilares e opostas e flores com corona composta, sendo possivelmente afim de *Peplonia* (Rapini & al., 2004; Fontella-Pereira & Ferreira, 2005).

Metastelma é reconhecido por suas espécies apresentarem tirsóides frondosos, com cimeiras subaxilares e alternas, e lobos da corona simples. Está distribuído desde o nordeste da Argentina ao norte do Texas, estando no Caribe o seu centro de diversidade. É um dos gêneros mais difíceis de serem delimitados, e as estimativas sobre o número de espécies são imprecisas (cerca de 70, com 20 a 25 na América do Sul; Liede & Meve, 2004; Morillo, 1997).

Minaria compreende 19 espécies segregadas de *Ditassa*. É caracterizado por possuir hábito arbustivo de ramos eretos ou decumbentes, folhas diminutas e flores campanuladas a urceoladas (Konno, 2005; Konno & al., 2006). Forma um clado bem sustentado (Rapini & al., 2006) e está concentrado principalmente nos campos rupestres e cerrados da Cadeia do Espinhaço, principalmente em Minas Gerais, mas também em outros estados brasileiros, chegando até a Argentina ao sul e à Venezuela ao norte.

Nautonia inclui apenas uma espécie (*Nautonia nummularia* Decne.) e é reconhecido principalmente pelo hábito procumbente, ausência de corona e ginostégio longamente estipitado. Encontra-se distribuído nos estados das Regiões Sul e Sudeste, alcançando o Paraguai e a Argentina, ocorrendo em cerrados e campos limpos (Farinaccio, 2000; Pereira, 2005).

Nephradenia Decne., gênero também endêmico da América do Sul, inclui cerca de 10 espécies, caracterizadas por serem ervas eretas ou volúveis e possuírem folhas estreitas, acerosas, lineares ou filiformes (Rapini, 2002) . Ocorre em áreas de cerrado e campo, sobre solos arenosos e encharcados, nos estados da Bahia, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso (Fontella-Pereira & al., 1989).

Peplonia é representado por seis espécies caracterizadas por serem trepadeiras com folhas coriáceas, inflorescências axilares e opostas e corona simples ou composta, como em *Macroditassa*. É um gênero exclusivamente brasileiro e tem como centro de diversidade o Rio de Janeiro, ocorrendo principalmente em áreas de restinga (Rapini & al., 2004).

Petalostelma inclui cerca de sete espécies, distribuídas na Argentina, Paraguai e Brasil, nos estados da Bahia, Ceará, Distrito Federal, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco e Rio de Janeiro, ocorrendo em cerrados, matas, campos rupestres e caatingas (Fontella-Pereira & al., 2004). Compreende subarbustos volúveis com inflorescências

subaxilares, flores pequenas, geralmente purpúreas com lobos da corona compostos, sendo os externos aneliformes e os internos cruciformes (Fontella-Pereira, 1994).

Rhysostelma Decne. foi descrito em 1844 e inclui apenas *R. nigricans* Decne., erva de folhas cordadas, inflorescências subaxilares e flores nigrescentes. Está restrito à Argentina (<http://www.botanicus.org/page/163540>).

Estudos filogenéticos com base em dados moleculares (Rapini & al. 2003, 2006; Liede-Schumann & al., 2005) estabeleceram uma base sólida para a classificação das Asclepiadoideae neotropicais nos níveis de tribo e subtribo. Com exceção de *Tassadia*, a maioria dos gêneros do clado MOOG pode ser classificada com segurança em Metastelmatinae, Oxypetalinae, Orthosiinae ou Gonolobinae. Entretanto, a relação entre essas subtribos não foi resolvida e as relações internas em cada uma delas são praticamente desconhecidas. Estudos filogenéticos em Oxypetalinae e Gonolobinae foram realizados recentemente com base em dados moleculares. Farinaccio (2007) amostrou 79 espécies de Oxypetalinae, utilizando dados morfológicos e moleculares (plastidiais: *trnH-psbA*, *trnD-T*, *trnC-ycf6*; e nuclear ITS) e Krings & al. (2008) amostraram 66 espécies de Gonolobinae utilizando dados moleculares (plastidiais: *trnL-F* e *rps16*; e nuclear: LEAFY). Os resultados em ambos os casos não foram muito elucidativos, geralmente gerando cladogramas pouco sustentados estatisticamente.

Diante da representatividade de Metastelmatinae no Brasil e de sua diversidade no país, estudos filogenéticos nesta subtribo são essenciais para entender as relações entre a maioria dos grupos brasileiros de Asclepiadoideae, a evolução morfológica e a biogeografia da subfamília no Neotrópico, além de auxiliar na estabilidade taxonômica de seus gêneros. O trabalho mais abrangente em Metastelmatinae incluiu 36 espécies e nove gêneros da subtribo (Liede-Schumann & al., 2005) e utilizou apenas dois marcadores (*trnT-L* e *rps16*). O estudo que utilizou mais marcadores (*trnT-L*, *rps16*, *trnS-G* e *matK*;

Rapini & al., 2006), por outro lado, amostrou apenas 19 espécies da subtribo. Em ambos os casos, foram utilizados apenas marcadores plastidiais e gêneros representativos da subtribo, como *Macroditassa*, não foram amostrados.

O objetivo deste estudo é desenvolver uma análise filogenética com dados moleculares, focando exclusivamente as relações internas em Metastelmatinae. Para tanto, a amostragem da subtribo foi duplicada e mais caracteres moleculares utilizados, incluindo dois marcadores plastidiais (*psbA-trnH* e *trnE-Y*) ainda inéditos para os estudos em Metastelmatinae, e um nuclear (ITS). Espera-se que com essa abordagem seja possível detectar um padrão hierárquico que possibilite o reconhecimento de grupos monofiléticos capazes de ajudarem na definição dos gêneros e no entendimento da evolução inicial de Metastelmatinae. Como a maioria dos gêneros da subtribo está concentrada no Brasil Central, em especial aqueles que supostamente teriam divergido no início da evolução do grupo, como *Minaria*, *Barjonia* e *Nephradenia* (Rapini & al. 2006), atenção especial foi dada para coletas nessa região, mas espécies do norte da América do Sul e da América Central também foram incluídas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas

Dada a grande diversidade de Asclepiadoideae na região da Cadeia do Espinhaço, incluindo várias espécies raras e de posição taxonômica discutível (Rapini & al., 2001, 2002, 2009), expedições nesta região foram direcionadas para coletas específicas, tanto na porção mineira (Serra do Rola-Moça, Serra do Cipó e Planalto de Diamantina; além das Serras de Tiradentes e São João del Rei, mais ao Sul) quanto na baiana (Chapada Diamantina: Morro do Chapéu, Lençóis, Mucugê, Palmeiras e Rio de Contas). Foram visitadas também áreas de caatinga na Serra do Ramalho e em Monte Santo (nas porções Sudoeste e norte da Bahia, respectivamente) e de cerrado na Chapada dos Veadeiros, Goiás, e Chapada dos Guimarães, em Mato Grosso.

Amostragem

Estudos filogenéticos (Liede-Schumann & al., 2005; Rapini & al., 2006) demonstraram que *Blepharodon lineare* e *B. ampliflorum* formam juntos o grupo irmão do restante das Metastelmatinae, relação altamente sustentada. Dessa maneira, essas espécies (ou uma delas) foram utilizadas como grupo externo; o grupo interno foi então composto pelas demais espécies de Metastelmatinae. Todos os gêneros da subtribo foram amostrados, exceto os monotípicos *Hypolobus* e *Rhyssostelma*. Buscou-se amostrar a espécie-tipo de cada gênero e ampliar a representatividade dos gêneros mais diversos ou posicionados na base da subtribo (consulte a tabela 2 para indicação das espécies amostradas em cada análise, material-testemunha ou número de acesso no GenBank; www.ncbi.nlm.nih.gov).

Extração de DNA e PCR

O DNA total foi isolado de tecido vegetal fresco (folhas/botões) ou desidratado em sílica-gel (Chase & Hills, 1991) utilizando uma versão modificada do protocolo 2x CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Além do marcador nuclear ITS (regiões 18S, ITS 1, 5.8S, ITS2, 26S), foram selecionados seis marcadores plastidiais: *trnT-L* (regiões *trnT-L*, *trnL* e *trnL-F*), *trnS-G*, *rps16*, *matK*, *psbA-trnH* e *trnE-Y*.

A amplificação do ITS foi realizada em 30 µL de reação, contendo uma concentração final de 1x de tampão de reação, 2,5 mM MgCl₂, 171 mM dNTPs, 0,5 µM de cada *primer*, 1µg de albumina de soro bovino (BSA), 1,25 unidades de Taq DNA polimerase. Para redução de problemas relacionados à estrutura secundária durante a amplificação e o sequenciamento, 2% dimetilsulfóxido (DMSO) e betaína 1,0 M foram adicionados à PCR. A amplificação de todas as regiões plastidiais foi realizada em 50 µL de reação com uma concentração final de 1x de tampão de reação, 2,5 mM MgCl₂, 1mM dNTPs, 0,5 µM de cada *primer*, 1µg de BSA, 1,25 unidades de Taq DNA polimerase. O sequenciamento do marcador *trnE-Y* foi realizado na Alemanha, em colaboração com o grupo de pesquisa liderado pela Dra. Sigrid Liede-Schumann, Universidade de Bayreuth (a lista de *primers* e programa de PCR de cada região encontram-se na Tabela 1).

As PCRs foram realizadas em termociclador GeneAmp System 9700 (Applied Biosystems). Os fragmentos de PCR foram quantificados através de eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente purificados com o kit enzimático Exonuclease I (EXO) e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP) (Amersham Biosciences). O material foi seqüenciado em ambas as direções com seqüenciador automático (Macrogen Inc., Seul, Coréia do Sul) e utilizando os mesmos *primers* utilizados nas PCRs. Algumas espécies foram seqüenciadas novamente devido à má qualidade da seqüência depositada no

Tabela 1. *Primers* e programas utilizados para a amplificação do ITS e das regiões de plastídio.

Primers	Denaturação	Amplificação	Nº ciclos na amplificação	Extensão final
ITS¹				
17SE forward (ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG)	94° (3 min)	94° (1 min) + 52° (1 min) + 72° (3 min)	28	72° (7 min)
26SE reverse (TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC)				
<i>trnT-L</i>²				
A forward (CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT)	94° (2 min)	94° (1 min) + 50° (1 min) + 72° (2 min)	36	72° (3 min)
B reverse (TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC)				
<i>trnL-F</i>²				
C forward (AGA AAT CGG TAG ACG CTA CG)	94° (2 min)	94° (1 min) + 50° (1 min) + 72° (2 min)	36	72° (3 min)
F reverse (ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG)				
<i>trnS-G</i>³				
(GCU) forward (GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC)	94° (2 min)	94° (1 min) + 50° (1 min) + 72° (2 min)	36	72° (3 min)
(UCC) reverse (GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C)				
<i>rps16</i>⁴				
1F forward (GTG GTA GAA AGC AAC GTG CGA CTT)	94° (1 min)	94° (1 min) + 50° (1 min) + 72° (1 min)	32	72° (3 min)
2R reverse (TCG GGA TCG AAC ATC AAT TGC AAC)				
<i>matK</i>⁵				
390F forward (CGATCTATTCATTCAATATTTTC)	94° (1 min)	94° (30 seg) + 53° (40 seg) + 72° (40 seg)	40	72° (5 min)
1326R reverse (TCTAGCACACGAAAGTCGAAAGT)				
<i>psbA-trnH</i>⁶				
<i>psbA</i> forward (GTTATGCATGAACGTAATGCTC)	94° (2 min)	94° (1 min) + 55° (1 min) + 72° (2 min)	36	72° (3 min)
<i>trnH</i> reverse (CGCGAATGGTGGATTCACAAATC)				

1- Sun & al. (1994); 2- Taberlet & al. (1991); 3- Hamilton (1999); 4- Oxelman & al. (1997); 5- Johnson & Soltis (1994, 1995); 6- Sang & al. (1997).

GenBank, dúvidas em relação à identidade da sequência, contaminação ou presença de múltiplas repetições, prejudicando o alinhamento: *Barjonia chloraeifolia* (ITS), *Hemipogon acerosus* (apenas *trnT-L*), *Nephradenia acerosa* (apenas *trnT-L*) e *Nephradenia asparagoides*.

Edição de sequência e alinhamento das matrizes

Os eletroferogramas foram editados e montados utilizando o pacote Staden (Staden & al., 1999) e alinhados utilizando o programa Muscle versão 3.6 (Edgar, 2004) sendo o resultado do alinhamento manualmente corrigido quando necessário no programa Mesquite2 (Maddison & Maddison, 2007), seguindo as diretrizes de Kelchner (2000). Regiões ambíguas foram excluídas da análise. Sequências de ITS polimórficas tiveram seus produtos de PCR clonados utilizando o kit pGEM[®]-T conforme o protocolo do fabricante (Promega).

Análises filogenéticas

Análises de Máxima Parcimônia (MP) foram realizadas no PAUP* 4b10 (Swofford, 2002) para o ITS, para as regiões plastidiais individualmente e de maneira combinada. Os caracteres foram considerados não ordenados e com pesos iguais para todas as mudanças (Fitch, 1971). Foram realizadas também duas análises de ITS, uma sem (ITS Geral) e outra com clones (ITS Completa), e duas combinadas de plastídio, uma com todas as regiões, exceto *trnE-Y* (Plastídio Geral), e outra incluindo também o *trnE-Y* (Plastídio Total) a partir de Inferência Bayesiana (IB) utilizando o programa MrBayes 3.1 (Ronquist & Huesenbeck, 2003).

Para as análises de MP, foram realizadas buscas heurísticas a partir de 2.000 replicações iniciadas com adições aleatórias de terminais, seguida de uma série de rearranjos do tipo TBR (*tree-bisection and reconnection*) na árvore inicial, retendo no

máximo 15 árvores mais parcimoniosas por replicação para evitar buscas extensivas em ilhas subótimas. As árvores na memória foram, então, submetidas a uma nova rodada de rearranjos (TBR) para explorar as topologias obtidas na análise inicial extensivamente, estabelecendo um limite de 10.000 árvores. O suporte dos cladogramas foi avaliado através de *bootstrap* não paramétrico (BT) (Felsenstein, 1985) com 1.000 pseudo-replicações a partir de adição simples de terminais e rearranjos do tipo TBR, retendo até 20 árvores por pseudo-réplica.

A congruência entre os dados nucleares e plastidiais foi avaliada através do teste de homogeneidade de partição (*Incongruence-length difference test* – IDL) (Farris & al., 1994), realizado no PAUP através de buscas heurísticas a partir de 500 replicações e 10 adições randômicas de sequências.

Os modelos evolutivos para a IB foram obtidos através do Teste de Razão de Verossimilhança Hierárquico (hLRTs), no MrModeltest 2.3 (Nylander, 2008), individualmente para cada região (nucleares 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 e 26S; plastidiais: *trnT-L*, *trnL*, *trnL-F*, *rps16*, *trnS-G*, *matK*, *psbA* e *trnE-Y*). Nas análises combinadas, os dados de cada região foram particionados e a cada um deles aplicado o modelo evolutivo mais adequado. Eles foram analisados em conjunto, mas desligados entre si, de modo que os parâmetros foram estabelecidos individualmente para cada uma das regiões (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Para as análises combinadas de plastídio Geral (sem *trnE-Y*), ITS Completa (uma sequência por espécie apenas) e Evidência Total foram conduzidas 10.000.000 de gerações, salvando uma árvore a cada 1.000 gerações, em duas corridas simultâneas, cada qual com três cadeias quentes e uma fria. Para as análises de Plastídio Total (incluindo *trnE-Y*) e de ITS Completa (com uma sequência por espécie), foram conduzidas 2.000.000 gerações, salvando uma árvore a cada 200 gerações. Em cada análise, as árvores que precederam a convergência entre as corridas (desvio padrão das

freqüências entre as corridas $< 0,01$) foram excluídas (*burn-in*) e as árvores restantes utilizadas para construir um consenso de maioria no PAUP, de modo que as porcentagens de cada clado representam sua probabilidade posterior (PP).

Os consensos de maioria (incluindo todos os ramos compatíveis) produzidos pelas IBs de Plastídio Geral e de ITS Geral foram tratados como árvores primárias e submetidos ao programa SuperTree 0.85 (Salamin & al., 2002) para a construção de uma matriz binária. A codificação foi realizada a partir do método de Baum-Ragan (Baum, 1992), mais sensível à informação hierárquica e que oferece maior resolução sem produzir redundância quando aplicado a poucas árvores e com pesagem dos caracteres (Purvis, 1995). A matriz produzida pelo SuperTree foi submetida a uma análise de Parcimônia no PAUP, onde os caracteres foram tratados como irreversíveis (Parcimônia de Camin-Sokal; Camin & Sokal, 1965) e pesados conforme o suporte dos ramos nas árvores primárias, estabelecendo peso 9 para PP=100%. Foi realizada, então, uma busca heurística conforme as realizadas para as análises moleculares. O suporte qualitativo dos cladogramas da Superárvore (modificado de Bininda-Emonds, 2003) foi categorizado em três classes com base nas árvores primárias: Sustentados – cladogramas presentes em pelo menos uma das árvores primárias e não contradito pela outra; Ambíguos – cladogramas presentes em uma das árvores primárias, mas contradito pela outra ou que não estavam presentes em nenhuma das árvores primárias, mas que também não eram contraditos por elas; e Conflitantes – cladogramas ausentes nas duas árvores primárias e contradito por pelo menos uma delas. Cladogramas com terminais não amostrados na análise de plastídio ou de ITS foram considerados ambíguos (?) para a respectiva árvore primária.

Os filogramas foram construídos a partir dos consensos de maioria das IBs Gerais de Plastídio e de ITS e o comprimento dos ramos estabelecido através de otimização tipo ACCTRAN (ACCElERATED TRANsformation) no PAUP. A reconstrução da história

evolutiva dos caracteres (hábito, posição das inflorescências e inversão de 54pb na região *trnS-G*) foi realizada no consenso de maioria produzido na IB Plastídio Geral, também com otimização do tipo ACCTTRAN realizada no Mesquite2.

RESULTADOS

Coletas

Durante as expedições, foram coletadas cerca de 30 espécies de Asclepiadoideae, incluindo as espécies-tipo de *Barjonia*, *Hemipogon*, *Nephradenia* e *Petalostelma*, essenciais para atrelar implicações taxonômicas/nomenclatórias aos resultados filogenéticos. Destacam-se também a coleta de espécies raras: *Nephradenia filipes* Malme, conhecida até então apenas pela coleta de Malme em 1894, foi recoletada nas escarpas da Chapada dos Guimarães, Mato Grosso; e *Hemipogon abietoides* E.Fourn., também conhecida apenas pelo material-tipo, mas coletado por Riedel ainda em 1825 foi novamente encontrada na Serra da Lapinha. Além da importância dessas coletas em termos de conservação, elas ofereceram material recente para extração de DNA de boa qualidade, fundamental para que essas espécies fossem incluídas nas análises, especialmente no caso de *H. abietoides*, cuja posição taxonômica tem sido motivo de debate (Anexo).

Amostragem

Este estudo inclui cerca de 300 sequências inéditas, contabilizadas por região e incluindo clones de ITS para 15 espécies. Algumas regiões não puderam ser sequenciadas para *Metastelma linearifolium*, *M. parviflorum*, *M. schaffneri*, *Nautonia nummularia* e *Petalostelma sarcostemma* por falta de DNA e o Sequenciamento de uma ou duas regiões não foi bem sucedida para outras 11 espécies mesmo após inúmeras tentativas. Ao todo, as análises incluíram 90 sequências inéditas de ITS, 30 de *rps16*, 42 de *trnS-G*, 40 de *matK*, 57 de *psbA*, 28 de *trnT-L*, 32 de *trnL* e de *trnL-F* e 44 para *trnE-Y*. As análises combinadas de Plastídio Total incluíram 35 terminais e as de Plastídio Geral, 62, enquanto as de ITS Completa incluíram 93, e a Geral, 70 (apenas uma sequência por espécie); para o número de terminais nas matrizes individuais e combinadas consulte Tabela 2.

Tabela 2. Espécies analisadas indicando material-testemunho e número de acesso do *GenBank*. * inidica espécies analisadas pela primeira vez neste estudo, e ^C, as que aquelas incluídas na matriz combinada de Plastídio Geral.

Táxon	Voucher	<i>trnT-F</i> (inclui <i>trnT-L</i> , íntron <i>trnL</i> e <i>trnL-F</i>)	<i>rps16</i>	<i>trnS-G</i>	<i>matK</i>	<i>psbA</i>	<i>trnE-Y</i>	ITS
<i>Barjonia chloraeifolia</i> Decne. ^C	<i>trnT-F</i> , <i>rps16</i> e <i>trnS-G</i> : Rapini 485/ ITS : Rapini 1395/ demais: Rapini 1059	AJ 704464/7	AJ 704463	DQ 026752	DQ026717	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Barjonia cymosa</i> E.Fourn.* ^C	Rapini 1878	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	-	Inédito
<i>Barjonia erecta</i> (Vell.)K.Schum.* ^C	Rapini 1733	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Barjonia glazioui</i> Marquete* ^C	Carvalho 329	Inédito	Inédito	Inédito	-	Inédito	-	Inédito
<i>Barjonia harleyi</i> Fontella* ^C	Rapini 354	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	-	-	Inédito
<i>Barjonia laxa</i> Malme* ^C	Rapini 1877	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	-	Inédito
<i>Blepharodon ampliflorum</i> E.Fourn.* ^C	ITS: Rapini 706/ demais: Rapini 1611	<i>trnT-L</i> : - <i>trnL</i> e <i>trnL-F</i> Inéditos	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Blepharodon bicuspidatum</i> E.Fourn.* ^C	Rapini 1842	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	-	-
<i>Blepharodon costae</i> Fontella* ^C	Rapini 1072	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Blepharodon lineare</i> (Decne.) Decne. ^C	Forzza 2027	AJ 704465/8	AJ 704466	DQ 026753	DQ026718	-	-	Inédito
<i>Blepharodon manicatum</i> (Decne.) Fontella* ^C	Rapini 1504	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito

<i>Blepharodon pictum</i> (Vell.) J.F. Macbr. ^c	<i>trnT</i> -F: Rapini 938/ demais: LPQ 9196	AJ 704468/ AY 163669	AJ 704467	DQ 026754	DQ026720	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Ditassa auriflora</i> Rapini ^c	<i>trnT</i> -F, <i>rps16</i> , ITS e <i>trnSG</i> :Rapini 785/ demais: Rapini 1107	AJ 704469/70/1	AJ 704472	DQ 026755	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Ditassa banksii</i> R.Br. ex Schult. ^c	Konno 754	AJ 704474/AY 163674	AJ 704473	DQ 026756	DQ026719	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Ditassa blanchetii</i> Decne. * ^c	Rapini 1143	<i>trnT</i> -L: - <i>trnL</i> e <i>trnL</i> -F Inéditos	-	Inédito	Inédito	-	-	Inédito
<i>Ditassa burchellii</i> Hook & Arn. ^c	Kaprovickas 41170	AJ 699294/5/6	AJ 699293	DQ 026757	DQ026721	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Ditassa capillaris</i> E. Fourn. * ^c	Rapini 1508	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Ditassa conceptionis</i> Fontella * ^c	Rapini 1016	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Ditassa cordeiroana</i> Fontella * ^c	ITS: Rapini 347/ demais: Rapini 1359	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Ditassa crassifolia</i> Decne. * ^c	Rapini 1154	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Ditassa eximia</i> Decne. * ^c	Rapini 1302	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Ditassa fasciculata</i> E.Fourn. * ^c	Rapini 1303	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Ditassa hastata</i> Decne.	<i>trnT</i> -F e <i>rps16</i> : Harley 18999/ <i>trnS</i> -G e ITS:Rapini 777/ demais: DC 2318	AJ 704221/2/3	AJ 704224	DQ 026761	DQ026725	Inédito	-	Inédito
<i>Ditassa hispida</i> (Vell.) Fontella ^c	<i>trnT</i> -F, <i>rps16</i> e <i>trnSG</i> : Konno 779/ demais: Rapini 1431	AJ 704478/9/80	AJ 704477	DQ 026762	DQ026726	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Ditassa mucronata</i> Mart. ^c	<i>trnT</i> -F, <i>rps16</i> e <i>trnSG</i> : Arbo 3885/ ITS:	AJ 704259/70/78	AJ 704279	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito

Estudos Filogenéticos em Metastelmatinae – Uíara Catharina Soares e Silva

	Rapini 605/ demais: Rapini 1077							
<i>Ditassa obcordata</i> Mart. * ^C	Rapini 1050	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Ditassa pohliana</i> E.Fourn. * ^C	Rapini 1784	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Ditassa retusa</i> Mart. ^C	<i>trnT-L</i> e <i>rps16</i> - Coradin 6075/ <i>trnS-G</i> - Rapini 605/ ITS	AJ 704281/2/3	AJ 704280	DQ 026764	DQ026728	Inédito	Inédito	Inédito
	Rapini 365/ demais: Rapini 1362							
<i>Ditassa rotundifolia</i> (Decne.) Baill. ex K.Schum. ^C	<i>trnT-F</i> , <i>rps16</i> e <i>trnSG</i> : Harley 22334/ demais: AKAS 1095	AJ 704284/5/6	AJ 704287	Inédito	Inédito	-	-	-
<i>Ditassa tomentosa</i> (Decne.) Fontella ^C	<i>trnTF</i> , <i>rps16</i> e <i>trnSG</i> : Konno 780/ demais: Rapini 616	AJ 704584/5/6	AJ 704483	DQ 026765	DQ026729	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Hemipogon abietoides</i> E.Fourn. * ^C	PLR 283	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédit	Inédito
<i>Hemipogon acerosus</i> Decne. ^C	<i>trnT-L</i> , <i>psbA</i> , ITS: Rapini 1875/ demais, Wood. & Goyder 15689	AJ 704289/90/1	AJ 704288	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Hemipogon carassensis</i> (Malme) Rapini * ^C	Rapini 1364	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Hemipogon harleyi</i> Fontella * ^C	Rapini 1410	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	-	Inédito
<i>Hemipogon hatschbachii</i> (Fontella & Marquete) Rapini * ^C	PLR 268	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Hemipogon hemipogonoides</i> (Malme) Rapini *	Rapini 1373	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Hemipogon luteus</i> E.Fourn. ^C	<i>trnT-F</i> , <i>rps16</i> , <i>trnSG</i> e ITS: Forzza 610/ demais: Rapini 1384	AY 163693	AJ 704489	DQ 026769	Inédito	-	-	Inédito

Estudos Filogenéticos em Metastelmatinae – Uiara Catharina Soares e Silva

<i>Hemipogon sprucei</i> E.Fourn. ^C	<i>trnT-F</i> e <i>rps16</i> : Wood. & Goyder 15719/ demais UCSS 106	AJ 704297/8/9	AJ 704296	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Macroditassa adnata</i> (E.Fourn.) Malme * ^C	Rapini 1752	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	-	Inédito
<i>Macroditassa grandiflora</i> (E.Fourn.) Malme *	Konno 810	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Macroditassa macrophylla</i> Malme * ^C	Rapini 1000	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	-	Inédito
<i>Macroditassa melantha</i> (Silveira) Rapini * ^C	Rapini 1076	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	-	Inédito
<i>Metastelma giuliettianum</i> Fontella * ^C	Rapini 1057	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Metastelma harleyi</i> Fontella * ^C	Rapini 1163	<i>trnT-L</i> : - <i>trnL</i> e <i>trnL-F</i> Inéditos	-	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Metastelma linearifolium</i> A.Rich. ^C	Urquiola 561	AJ428807/8/9	AJ 699341	Inédito	-	Inédito	Inédito	-
<i>Metastelma myrtifolium</i> Decne. ^C	Ganev 3332	AJ 704492/3/4	AJ 704495X	DQ 026774	DQ026733	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Metastelma parviflorum</i> R.Br. ^C	Liede & Meve 3328	AJ 428777/8/9	AJ 699342	Inédito	-	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Metastelma schaffneri</i> A.Gray ^C	Liede & Conrad 2962	AJ 410214/5/6	AJ 699343	Inédito	-	Inédito	Inédito	-
<i>Minaria abortiva</i> (E.Fourn.) Rapini*	PLR 300	-	-	-	-	-	-	Inédito
<i>Minaria acerosa</i> (Mart.) T.U.P.Konno & Rapini ^C	Ribas & Santos 889	AJ 699286/7/8	AJ 699285	-	-	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Minaria cordata</i> (Turcz.) T.U.P.Konno & Rapini*	PLR 341	-	-	-	-	-	-	Inédito
<i>Minaria cordata virg.</i> *	PLR 113	-	-	-	-	-	-	Inédito
<i>Minaria campanuliflora</i> Rapini*	COA 339	-	-	-	-	-	-	Inédito

Estudos Filogenéticos em Metastelmatinae – Uiara Catharina Soares e Silva

<i>Minaria decussata</i> (Mart.) T.U.P.Konno & Rapini* ^C	<i>trnT</i> -F e <i>rps16</i> -Arbo 4039/ <i>trnS</i> -G-Rapini 556/ ITS: Rapini 909	AJ 704218/9/20	AJ 704217	DQ 026758	DQ026722	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Minaria diamantinensis</i> (Fontella) T.U.P.Konno & Rapini*	Rapini 810	-	-	-	-	-	-	Inédito
<i>Minaria ditassoides</i> (Silveira) T.U.P.Konno & Rapini ^C	<i>trnT</i> -F, <i>rps16</i> e <i>trnS</i> G: Rapini 557/ ITS: Rapini 552	AJ 704475/AY 163678	AJ 704476	DQ 026759	DQ026723	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Minaria grazielae</i> (Fontella & Marquete) T.U.P.Konno & Rapini ^C	<i>trnT</i> -F e <i>rps16</i> -Omlor 147/ <i>trnS</i> -G e ITS: Rapini 379	AJ 410202/3/4	AJ 699339	DQ 026760	DQ026724	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Minaria hemipogonoides</i> (E. Fourn.) T.U.P.Konno & Rapini*	Rapini 1770	-	-	-	-	-	-	Inédito Inédito
<i>Minaria lourteigiae</i> (Fontella) T.U.P.Konno & Rapini*	PLR 197	-	-	-	-	-	-	Inédito
<i>Minaria magisteriana</i> (Rapini) T.U.P.Konno & Rapini ^C	Rapini 597 ITS: PLR 200	AJ 704481/AY 163681	AJ 704482	DQ 026763	DQ026727	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Minaria micromeria</i> (Decne.) T.U.P.Konno & Rapini ^C	Silva 2040 ITS: PLR 186	AJ 704226/37/48	AJ 704225	Inédito	-	Inédito	-	Inédito
<i>Minaria parva</i> (Silveira) T.U.P.Konno & Rapini*	PLR 188	-	-	-	-	-	-	Inédito
<i>Minaria polygaloides</i> (Silveira) T.U.P.Konno & Rapini	PLR 263	Inédito	Inédito	Inédito	-	-	-	Inédito
<i>Minaria refractifolia</i> (K.Schum.) T.U.P.Konno & Rapini*	PLR 225	-	-	-	-	-	-	Inédito
<i>Minaria semirii</i> (Fontella) T.U.P.Konno & Rapini*	PLR 336	-	-	-	-	-	-	Inédito
<i>Nautonia nummularia</i> Decne. ^C	Liede & Meve 3031	AJ 410226/7/8	AJ 699344	-	-	Inédito	Inédito	-
<i>Nephradenia acerosa</i> Decne. ^C	<i>trnT</i> -F, <i>rps16</i> e <i>trnS</i> - G: Philcox 3303/ demais: UCSS 118	AJ 704497/AY 163704/5	AJ 704496	DQ 026775	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Nephradenia asparagoides</i> (Decne.) E.Fourn. – UC *	UCSS 01	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito

Estudos Filogenéticos em Metastelmatinae – Uíara Catharina Soares e Silva

<i>Nephradenia filipes</i> Malme * ^c	UCSS 110	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	-	-	Inédito
<i>Peplonia asteria</i> (Vell.) Fontella & E.A.Schwarz ^c	<i>trnT</i> -F, <i>rps16</i> e <i>trnS</i> -G: Konno 773/ demais: FM 2113	AJ 704300/1/2	AJ 704303	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Peplonia organensis</i> (Malme) Fontella & Rapini ^c	<i>trnT</i> -F, <i>rps16</i> e <i>trnS</i> -G: Rapini 710/ demais: Rapini 1294	AJ 704487/AY 163688	AJ 704488	DQ 026767	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Petalostelma martianum</i> E.Fourn. * ^c	UCSS 127	<i>trnT</i> -L: - <i>trnL</i> e <i>trnL</i> -F Inéditos	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito	Inédito
<i>Petalostelma sarcostemma</i> (Lillo) Liede & Meve	Liede & Conrad 3090	AJ 428786/7/8	AJ 699345	-	-	Inédito	Inédito	-

Máxima Parcimônia (MP)

O ITS foi o marcador com maior proporção de caracteres variáveis (ca. 35%) e informativos para a parcimônia (15%), seguido pelo *psbA* (ca. 30 e 12%, respectivamente); os índices de retenção e consistência desses dois marcadores, no entanto, são baixos, indicando uma grande quantidade de homoplasias. A matriz combinada de Plastídio Geral (exceto *trnE-Y*) totalizou quase 5.000 caracteres, mas apenas 15% variáveis e 4% informativos para parcimônia, enquanto na matriz de ITS Geral, os caracteres informativos para parcimônia representaram ca. 45% dos variáveis. A matriz de *rps16* apresentou os menores índices de consistência e retenção dentre os marcadores plastidiais, enquanto as de *trnT-L* e o *trnS-G* apresentaram os maiores (Tabela 3).

O resultado das análises individuais das regiões plastidiais foi semelhante, sempre apresentando pouca resolução e baixo suporte, merecendo destaque apenas a presença do clado *Minaria* presente em todas as análises individuais, e o clado *Metastelma*, entretanto, com suporte fraco de Bootstrap (50-74%) ou moderado (75-84%). As topologias obtidas com as matrizes de ITS e com as matrizes combinadas de plastídio serão discutidas com base principalmente nos resultados da IB a partir das análises das matrizes Gerais de plastídio (sem *trnE-Y*) e de ITS (com apenas uma sequência por espécie).

Tabela 3. Características das matrizes e das árvores mais parcimoniosas nas análises de máxima parcimônia individuais (MP) e combinadas de plastídio para as sequências de Metastelmatinae.

Característica	<i>trnT-L</i>	<i>trnL</i>	<i>trnL-F</i>	<i>rps16</i>	<i>trnS-G</i>	<i>matK</i>	<i>psbA</i>	<i>trnE-Y</i>	ITS Geral	ITS Completa	Plastídio Geral (sem <i>trnE-Y</i>)	Plastídio Total
Número de táxons	55	59	59	58	59	59	58	41	70	93	62	35
Comprimento da matriz (pb)	952	598	431	895	751	1359	603	1546	913	1035	5589	6980
Caracteres analisados	922	549	358	799	656	859	534	865	913	850	4952	6653
Caracteres constantes	859	526	322	674	596	801	381	796	598	555	4298	6117
Caracteres variáveis (%)	6,83	4,18	10,05	15,64	9,15	6,75	28,65	7,98	34,5	18,5	13,2	5,65
Caracteres informativos para parcimônia (%)	4,03	1,64	4,18	5,76	3,51	2,79	11,99	2,31	15,77	16,23	3,86	2,4
Número de árvores	10.000	852	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	4617
Comprimento das árvores	65	25	41	188	65	71	245	87	590	552	881	712
Índice de Consistência	0,9333	0,9091	0,8000	0,5577	0,9231	0,8732	0,5972	0,6486	0,5410	0,5435	0,5944	0,6120
Índice de Retenção	0,9744	0,9524	0,8889	0,6738	0,9778	0,8831	0,7238	0,7759	0,7763	0,4565	0,7328	0,6978

Inferência Bayesiana (IB)

Os modelos evolutivos que melhor se adequaram às regiões do ITS foram JC+I para a porção do gene 18S, GTR+G para os dois espaçadores (ITS1 e ITS 2), K80+G para o gene 5.8S e JC para o 26S; para as regiões de plastídio, foram GTR para *trnT-L*, F81+I+G para *trnL*, HKY+G para *trnL-F*, F81+G para *trnS-G*, GTR+G para *rps16*, GTR+I+G para *matK* e F81+G para *psbA*.

As convergências entre as duas corridas do MrBayes foram atingidas a partir de: 5.676.000 gerações na análise de ITS Geral, 1.701.000 na de ITS Completa, 9.213.000 na de Plastídio Geral (interrompida com 9.456.000 gerações por pane no sistema), e 1.155.000 na de Plastídio Total. As árvores das duas corridas de cada análise foram analisadas em conjunto, sendo excluídas 5.675 árvores na análise de ITS Geral, 8.505 na de ITS Completa, 9.212 da análise de Plastídio Geral e 5775 da análise de Plastídio Total (*burn-in*), totalizando 8.652, 1.495, 488 e 8.452 árvores, respectivamente. De modo geral, as topologias obtidas através de IB foram congruentes com aquelas obtidas através de MP.

Análises Combinadas de Plastídio

Além do grupo externo, nove principais clados foram detectados em Metastelmatinae: *Astephanopsis*, *Peplonia*, *Barjonia*, *Minaria*, *Hemipogon* do Espinhaço, *Metastelma*, *Ditassa*, *Nautonia* e *Stelmation* (Figs. 1 e 2). Oito espécies representando seis gêneros e incluindo as espécies-tipo de *Hemipogon*, *Nephradenia* e *Petalostelma*, no entanto, ficaram sem posição definida, formando uma grande politomia basal com os nove clados.

O clado *Astephanopsis* faz referência ao subgênero *Atephanopsis* Malme de *Astephanus*, cuja espécie-tipo é *Hemipogon sprucei*. Ele aparece fortemente sustentado (PP=100/BT=90) e tem *Blepharodon manicatum* como grupo irmão

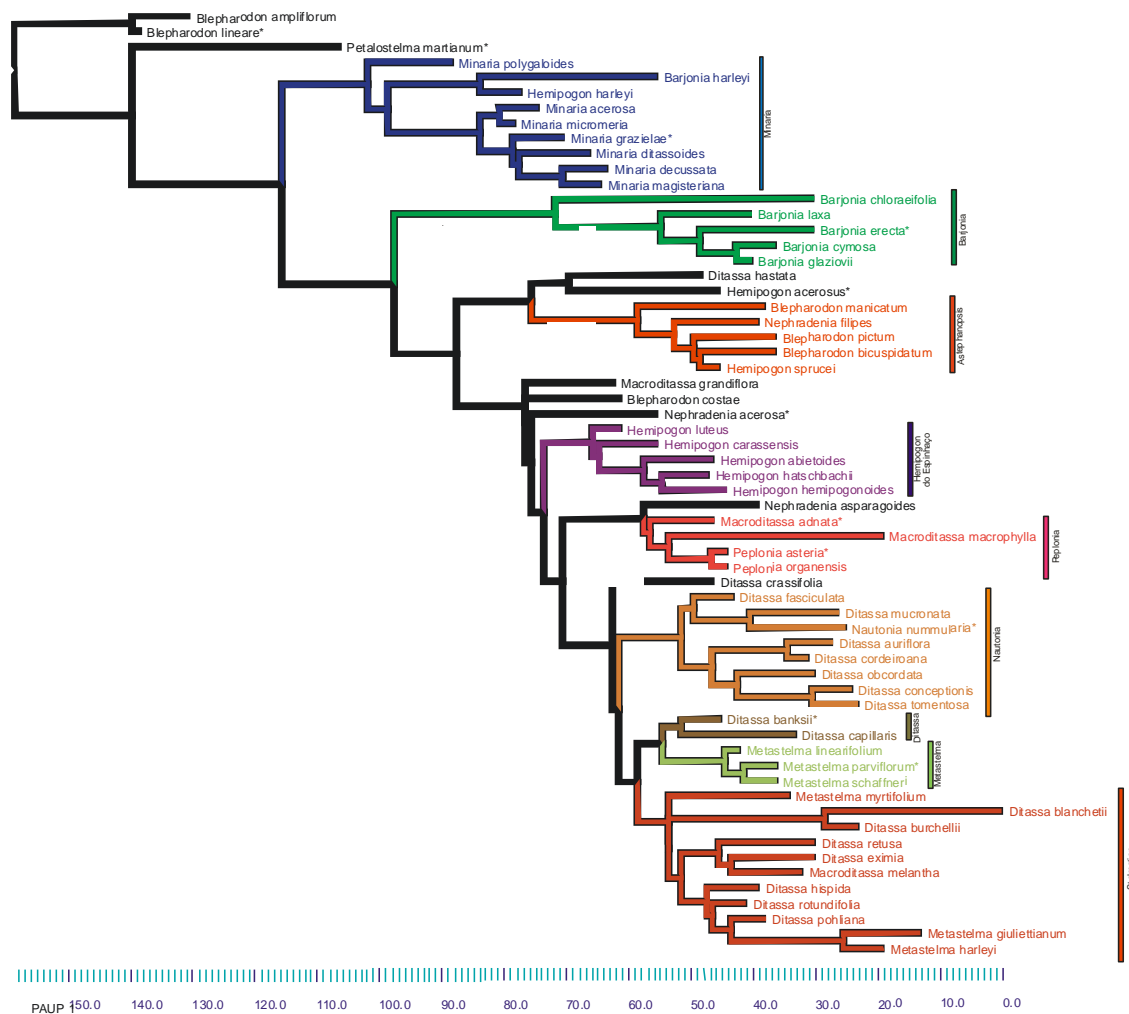


Figura 1. Filograma a partir do consenso de maioria (95%) produzido na Inferência Bayesiana de Plastídio Geral (*trnT-F*, *rps16*, *trnS-G*, *matK* e *psbA*); as cores denotam clados discutidos no texto. Após os terminais, * indica a espécie-tipo do gênero.

do restante do clado. O clado *Peplonia* (99/52) está bem resolvido internamente, tendo *Macroditassa adnata* formando um grado com *M. macrophylla* e as duas espécies de *Peplonia* formando um clado mais derivado. O clado *Barjonia* (100/96) é composto pelas espécies de *Barjonia* (exceto *B. harleyi*) e tem *B. chloraeifolia* como grupo-irmão do clado que reúne as demais espécies. O clado *Minaria* (PP=99) é composto predominantemente por espécies de *Minaria* e não aparece no consenso estrito da MP. Ele tem *M. polygaloides* como grupo-irmão do restante do clado (100/58), além de *Barjonia harleyi* e *Hemipogon harleyi*, duas espécies endêmicas da Chapada Diamantina, em uma politomia com o clado

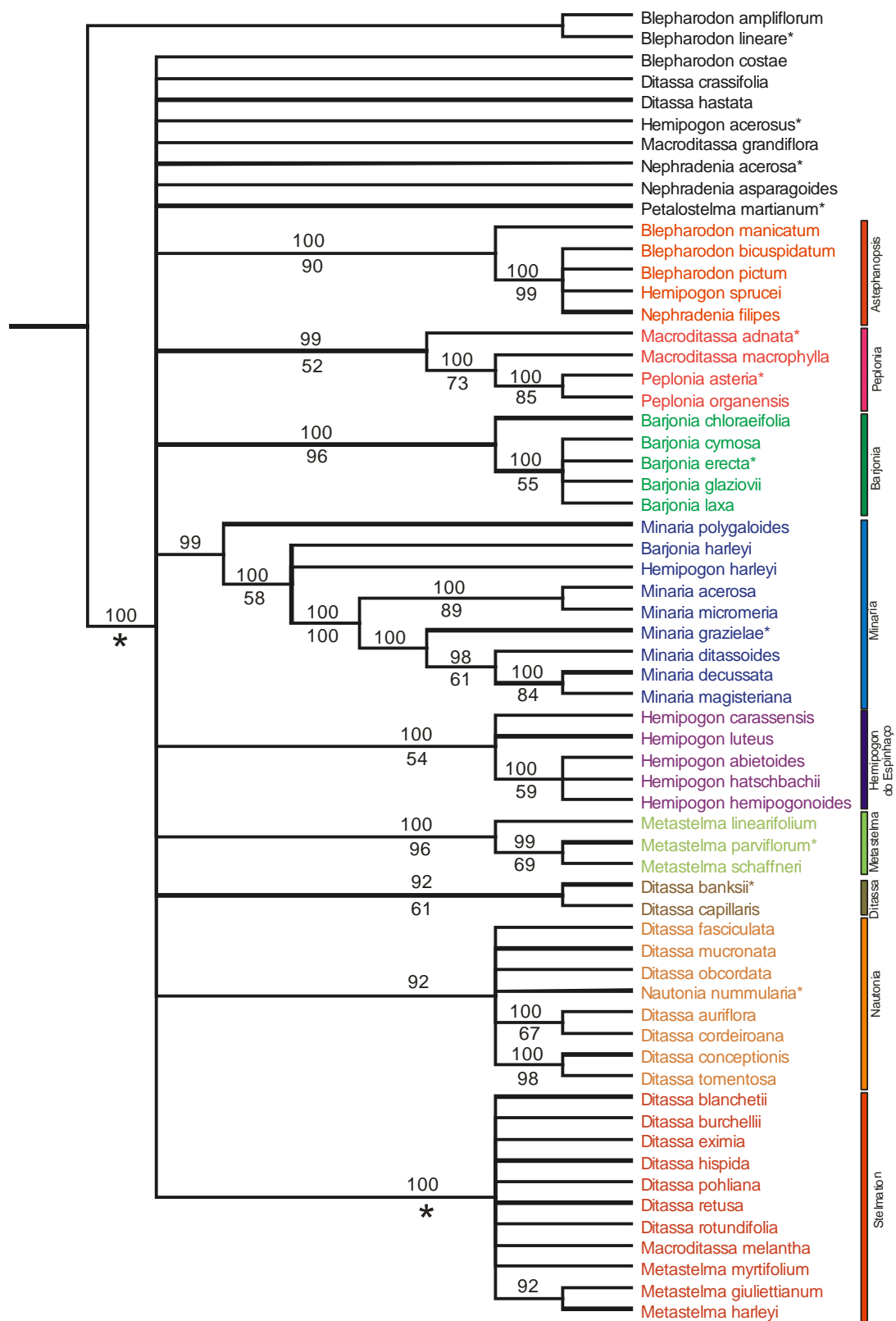


Figura 2. Consenso de maioria (90%) obtido na Inferência Bayesiana de Plastídio Geral (*trnT-F*, *rps16*, *trnS-G*, *matK* e *psbA*), evidenciando os clados discutidos no texto. Os valores acima dos ramos indicam Probabilidade Posterior (PP) dos clados e abaixo deles, o Bootstrap (BT); * indica ramos presentes no consenso estrito da análise de Máxima Parcimônia com BT<50%. Após os terminais, * indica a espécie-tipo do gênero.

que inclui as demais espécies de *Minaria*, predominantemente endêmicas da porção mineira da Cadeia do Espinhaço. O clado Hemipogon do Espinhaço (100/54) inclui espécies de *Hemipogon*, sendo a maioria delas endêmica da Cadeia do Espinhaço. Nele, é formada uma linhagem (100/59) composta por espécies eretas (*H. abietoides*, *H. hatschbachii* e *H. hemipogonoides*), formando uma politomia com as volúveis (*H. carassensis* e *H. luteus*). O clado *Metastelma* (100/96) inclui espécies de *Metastelma* do Norte da América do Sul e da América Central. Ele abrange *M. parviflorum*, a espécie-tipo do gênero, mas não as espécies de *Metastelma* endêmicas da Chapada Diamantina (*M. giuliettianum*, *M. harleyi* e *M. myrtifolium*).

A maioria das espécies de *Ditassa* aparece dividida nos outros três clados de Metastelmatinae: *Ditassa*, *Nautonia* e *Stelmation*. O clado *Ditassa* é composto (92/61) apenas por duas espécies, *D. banksii*, a espécie-tipo do gênero, e *D. capillaris*. O clado *Nautonia* (92/<50%) inclui além de *Nautonia nummularia*, uma diversidade de espécies de *Ditassa* e não foi detectado pela MP. O clado *Stelmation* (100/<50%) faz referência ao gênero criado por Fournier (1885) para incluir *Metastelma myrtifolium*. Ele inclui as espécies de *Metastelma* endêmicas da Chapada Diamantina, *Macroditassa melantha* e uma diversidade de espécies de *Ditassa*.

A análise combinada de Plastídio Total (incluindo *trnE-Y*) gerou uma árvore (Fig. 3) com alta sustentação para todos os clados (exceto o clado *Metastelma*, não amostrado). O cladograma é marcado por uma politomia basal de onde emergem, além de *Hemipogon acerosus* e *Blepharodon costae*, os clados *Barjonia*, *Astephanopsis*, *Minaria-Nephradenia*-*Peplonia* e um clado com *Ditassa crassifolia*, o clado Hemipogon do Espinhaço e os clados de *Ditassa*. *Nephradenia* forma um grado em relação a *Peplonia* e os clados *Nautonia* e *Stelmation* aparecem juntos, tendo o clado *Ditassa* como grupo irmão. Dada a falta de resolução para os primeiros nós de Metastelmatinae e a ausência de terminais, como as

espécies do clado *Metastelma*, importantes para conclusões taxonômicas sobre grupos mais derivados, as discussões serão focadas nos resultados produzidos pela IB de plastídio Geral.

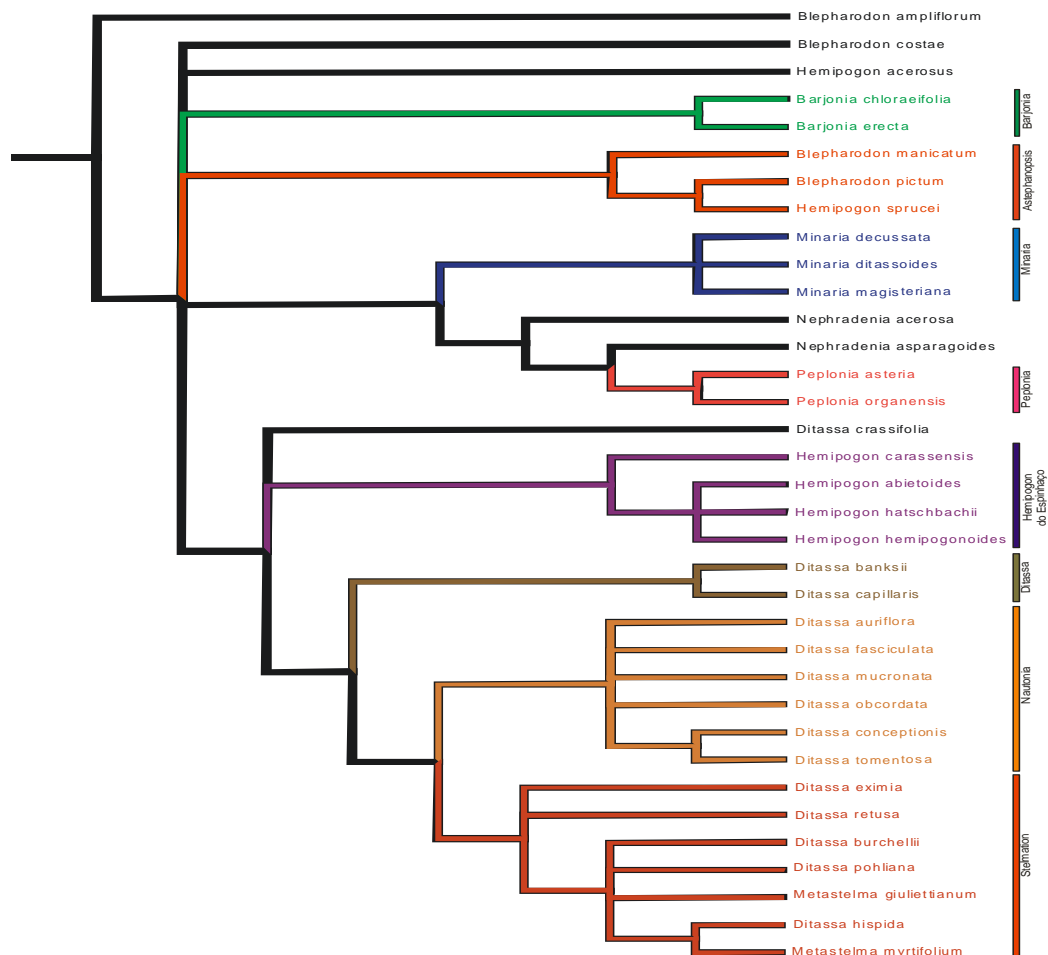


Figura. 3. Consenso de maioria (95%) produzido na Inferência Bayesiana de Plastídio Total (*trnT-F*, *rps16*, *trnS-G*, *matK*, *psbA* e *trnE-Y*), evidenciando os clados discutidos no texto.

Análise de ITS

A árvore gerada pela análise de ITS Completa (Fig. 4) mostra que os clones tendem a formar clados. Apesar dos clones de *Ditassa cordeiroana*, *D. eximia*, *D. obcordata* e *Minaria abortiva* não formarem clados, um possível clado desses clones não é rejeitado com suporte estatístico.



Figura 4. Filograma a partir do consenso de maioria produzido na Inferência Bayesiana de ITS Completa. Os terminais em vermelho indicam clones (seqüências geradas a partir de clonagem); * indica clados com Probabilidade Posterior ≥ 95 .

Com os dados de ITS (Fig. 5), apenas dois clados evidenciados com plastídio foram recuperados: Barjonia (100/96) e Hemipogon do Espinhaço (99/66). Com exceção do grupo externo, as espécies do clado Peplonia formam uma politomia com as demais espécies de Metastelmatinae (99), clado ausente no consenso estrito da MP. A maioria da subtribo pode ser dividida então em três clados. O primeiro deles (99/64) incluindo apenas *B. manicatum* e *B. pictum*, do clado Astephanopsis. O segundo (90) inclui as espécies dos clados Barjonia e Minaria, além das espécies-tipo de *Hemipogon*, *Petalostelma* e *Nephradenia*; *N. acerosa* formando um clado com *N. filipes* (100/98). O terceiro clado (98/-) inclui as espécies do clado Hemipogon do Espinhaço, juntamente com representantes dos três clados de *Ditassa* (*Ditassa*, *Nautonia* e *Stelmation*) e *Metastelma parviflorum*, representando o clado *Metastelma*. Apesar de relativamente estruturado tanto pela IB como pela MP, não existe uma correspondência clara com os clados de *Ditassa* formados a partir de plastídio. As espécies do clado *Nautonia* aparecem, em sua maioria, formando o grupo irmão (99/50) do clado Hemipogon do Espinhaço, enquanto o clado *Ditassa* se mostra polifilético e o *Stelmation* parafilético. No clado Hemipogon do Espinhaço, são formados dois grupos, um com espécies volúveis e outro com espécies eretas. É interessante notar nesta análise que as duas sequências de *Ditassa lenheirensis* baixadas do GenBank aparecem em clados distantes, uma em um clado com espécies do clado *Nautonia* e outra com espécies dos clados *Stelmation*, *Ditassa* e *Metastelma*.

Evidencia total

O teste ILD rejeitou significativamente a congruência entre os dados de plastídio e de ITS ($p = 0,002$). Apesar disso, os dados de plastídio e ITS foram combinados em uma Supermatriz e submetidos a uma análise de IB. Após 10.000.000 de gerações, no entanto,

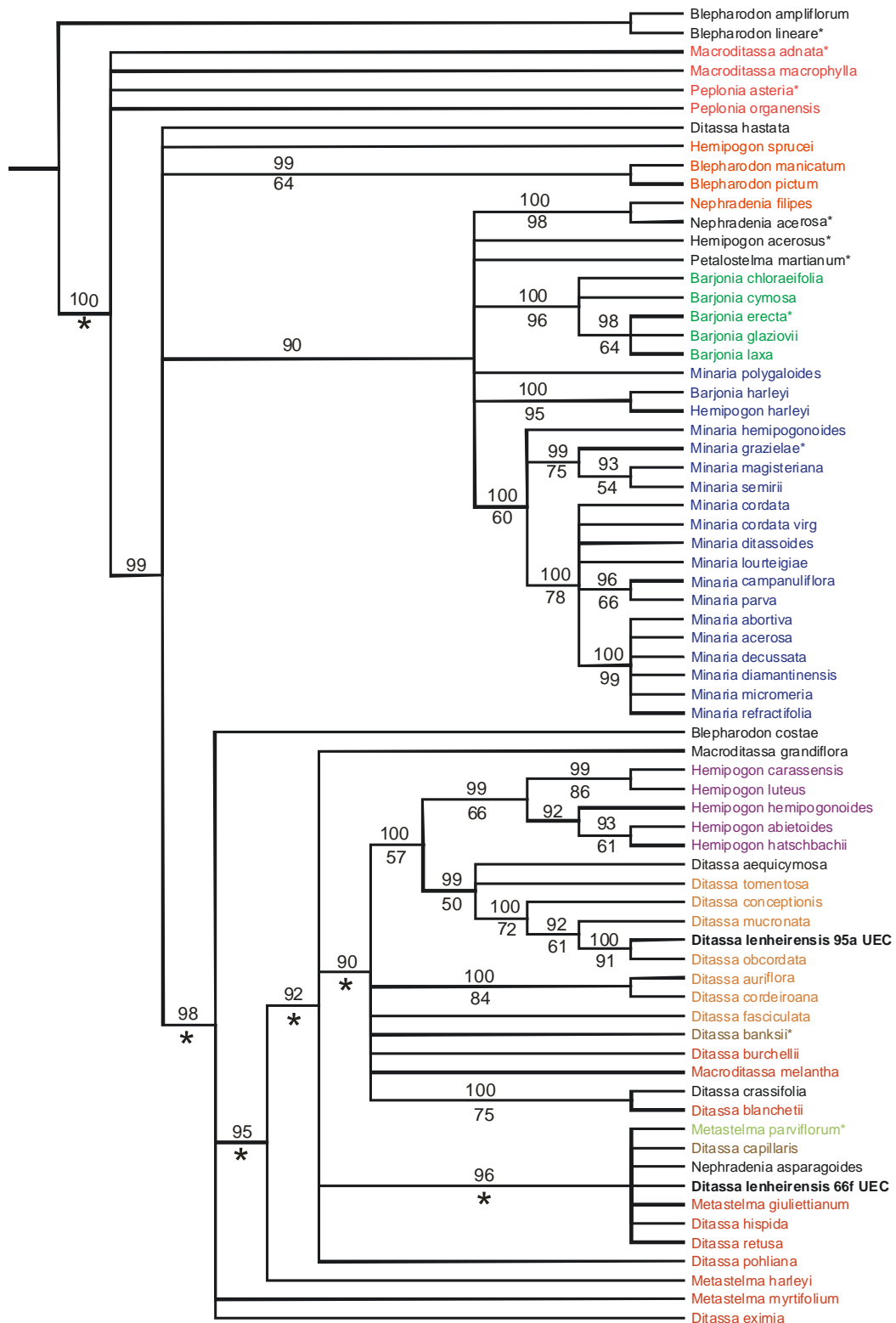


Figura. 5. Consenso de maioria (90%) produzido na Inferência Bayesiana de ITS Geral (uma sequência por espécie). As cores dos terminais indicam os clados destacados nos cladogramas das análises de plastídio (Figs. 1-2) e discutidos no texto. As sequências de *Ditassa lenheirensis* foram extraídas do GenBank e estão em destaque evidenciando a posição conflitante no cladograma. Os valores acima dos ramos indicam Probabilidade Posterior (PP) dos clados e abaixo deles, o Bootstrap (BT); * indica clados presentes no consenso estrito da análise de Parcimônia com BT < 50%

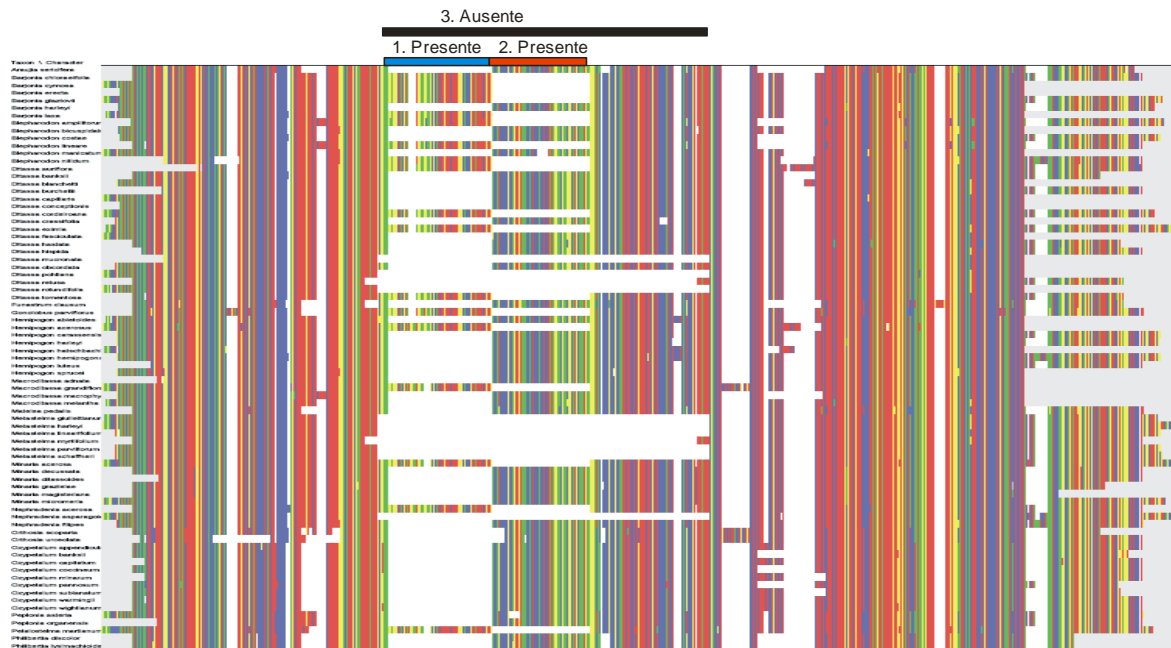
as corridas não se aproximaram da convergência (desvio padrão médio entre as corridas = 0,14), indicando uma grande diferença nas amostras das árvores. Por esse motivo, foi preferido apresentar a combinação desses dados a partir da fusão dos metadados obtidos nas análises combinadas de plastídio e ITS na forma de uma Superárvore.

A SuperÁrvore (Fig. 6) foi gerada a partir do consenso estrito de 32 árvores e apresentou 56 clados: 18 sustentados, 23 ambíguos e 15 conflitantes. Cinco dos nove clados obtidos com a análise de plastídio foram recuperados: *Peplonia* (sustentado), *Barjonia* (sustentado), *Minaria* (ambíguo), *Hemipogon* do Espinhado (sustentado) e *Metastelma* (sustentado). O clado *Astephanopsis* foi parcialmente recuperado, porém com *Ditassa hastata* no lugar de *Nephradenia filipes*. Com exceção de *D. hastata*, as espécies de *Ditassa* aparecem juntamente com as espécies dos clados *Metastelma* e *Hemipogon* do Espinhaço, além de *Blepharodon costae*, *Macroditassa grandiflora* e *Nephradenia asparagoides*. *Ditassa banksii* e *D. capillaris* (clado *Ditassa*) estão incluídas em grupos distintos, assim como as espécies do clado *Stelmation*. No entanto, as espécies do clado *Nautonia* são agrupadas juntamente com *Ditassa aequicymosa* e uma das sequências de *D. lenheirensis*, nenhuma das duas incluídas nas análises de plastídio.

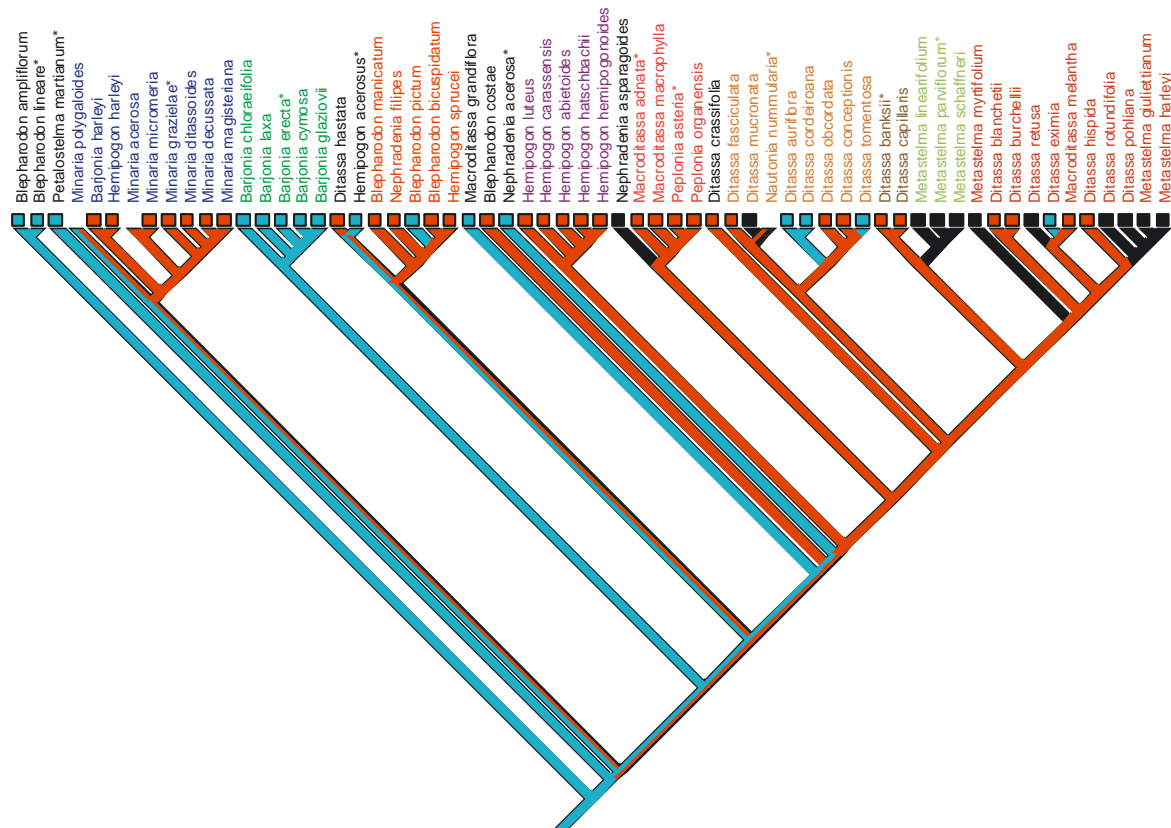
DISCUSSÃO

A maioria dos estudos filogenéticos em Asclepiadoideae tem investido nos marcadores plastidiais não codificantes mais usados em plantas, como *trnL-F*, *rps16* e *trnS-G* (Calonje & al., 2009), e nenhum deles chegou a amostrar Metastelmatinae de maneira abrangente. Este é certamente o estudo filogenético mais compreensível e robusto já realizado na subtribo. Ele reúne duas vezes mais representantes de Metastelmatinae em relação às análises anteriores e acrescenta espécies-tipo de três gêneros aos estudos filogenéticos da subtribo. Além dos marcadores plastidiais geralmente utilizados na família, duas regiões inéditas para o grupo (*psbA* e *trnE-Y*), além de um marcador nuclear bastante variável, o ITS, foram usados, totalizando cerca de 5.000 caracteres plastidiais e 1.000 nucleares. Ainda assim, não foi possível resolver os nós mais basais da subtribo.

A árvore da vida está repleta de clados cujos nós basais não são resolvidos (Bininda-Emonds & al., 2000). Esta situação não parece estar associada simplesmente à falta de dados. Geralmente, essa falta de resolução parece estar relacionada à combinação entre o tempo curto de cladogênese e a grande quantidade de homoplasias (Rokas & Carroll, 2006). Com base nos baixos índices de consistência e retenção dos marcadores mais variáveis destas análises (*psbA* e ITS), o elevado número de homoplasias associado à diversificação rápida da linhagem parece explicar a falta de resolução dos nós basais. Uma das estratégias para tentar superar esse obstáculo é a utilização de marcadores genômicos raros. Durante o alinhamento das matrizes, uma inversão de 54 pares de base (região eventualmente ausente) foi detectada na região *trnS-G* (Fig. 7A), o que poderia representar um marcador molecular raro e talvez informativo para a definição de linhagens em Metastelmatinae. Para verificar essa possibilidade, otimizamos este caráter na árvore da IB de Plastídio Geral (Fig. 7B). Os três estados de caracteres (posições 1 e 2 e ausência da



A



B

Figura. 7. A- Matriz de *trnS-G* mostrando um possível marcador molecular com três estados, uma inversão de 54pb (azul/vermelho) e uma deleção (preto). B- Otimização dos três estados de caracteres a partir da árvore produzida na Inferência Bayesiana de Plastídio Geral (Fig. 1).

região), no entanto, se mostraram homoplásticos. A posição 1 deve ser o estado ancestral na subtribo, tendo convergido pelo menos duas vezes (considerando apenas clados com suporte): uma vez em *Blepharodon pictum*, no clado *Astephanopsis*, e outra em *Ditassa eximia*, no clado *Stelmation*. Por outro lado, essa região foi deletada (estado 3) em *Nephadenia acerosa* e em mais três clados: *Metastelma*, *Stelmation* e *Nautonia*. Dessa maneira, é mais plausível supor que se trata de uma região suscetível a mutações desse tipo e, portanto, sujeita a homoplasias, não representando um marcador filogenético consistente neste nível de análise.

Em Asclepiadoideae, homoplasias não são exclusivas dos caracteres moleculares e a utilização da morfologia na definição de gêneros e no estabelecimento de relações filogenéticas em Asclepiadoideae sempre se mostrou complexa. A artificialidade da corona e da posição da inflorescência na definição de gêneros foi criticada e os caracteres vegetativos como o hábito passaram a chamar a atenção por se apresentarem mais conservados em alguns grupos e por isso possivelmente mais úteis taxonomicamente do que os florais (Rapini 2002; Liede-Schumann & al., 2005). Essas proposições foram parcialmente constatadas em dois estudos filogenéticos com dados moleculares (Liede-Schumann & al., 2005; Rapini & al., 2006). Hoje, está claro que espécies sem corona aparecem em gêneros pouco relacionados, como *Hemipogon* e *Minaria* (Rapini & al., 2006). Por outro lado, gêneros de tamanho relativamente pequeno e comprovadamente monofiléticos, como *Minaria* (s.str., sem a inclusão de *M. polygaloides*), podem apresentar uma grande variação nesse caráter, incluindo desde espécies com corona simples ou dupla até espécies sem corona, mas ainda assim apresentam um hábito relativamente homogêneo (Konno & al., 2006). Estudos filogenéticos mostraram também que as inflorescências axilares utilizadas por Malme (1927) para definir a tribo Orthosieae se mostrou convergente, tendo aparecido em dois pares de gêneros não relacionados, *Jobinia-Orthosia*

e *Peplonia-Gonioanthea*. Esses gêneros passaram, então, a ser classificados em subtribos distintas de Asclepiadeae: Orthosiinae e Metastelmatinae, respectivamente (Liede-Schumann & al., 2005). Ainda assim, as inflorescências axilares poderiam diagnosticar a relação entre *Peplonia* e *Macroditassa*, em Metastelmatinae (Rapini & al., 2004).

A otimização do hábito e da posição das inflorescências na árvore obtida com dados de plastídio mostrou que ambos são mais homoplásticos do que previamente imaginado (Fig. 8). O hábito ancestral de Metastelmatinae é ambíguo, mas a julgar pelos demais clados de MOG (incluindo *Tassadia*), onde predominam as trepadeiras, o hábito volúvel parece ter sido o estado ancestral na subtribo. Reversões nos dois sentidos, no entanto, podem ser constatadas em Metastelmatinae. No clado Minaria, o hábito ereto é revertido para volúvel em *Hemipogon harleyi*. No clado *Astephanopsis* e *Hemipogon* do Espinhaço, reversões são observadas, seja para o hábito ereto, seja para o volúvel. Finalmente, no complexo de clados de *Ditassa* e *Metastelma*, predominantemente composto por trepadeiras, o surgimento do hábito ereto é observado em *Metastelma myrtifolium* (clado *Stelmation*) e em *D. auriflora* (clado *Nautonia*). A posição axilar das inflorescências é uma sinapomorfia do clado *Peplonia*, que inclui *Peplonia* e *Macroditassa*, mas aparece de maneira independente em *Macroditassa melantha* (clado *Stelmation*) e pelo menos uma vez no clado Minaria.

As incongruências entre dados do genoma plastidial e do genoma nuclear têm sido verificadas em vários estudos (e.g., Dolphin & al., 2000; Topik, 2005; Fan & al., 2009; Spalik & al., 2009), contudo, com um grau bem menor de conflitos, geralmente restritos à posição de poucos terminais em clados pouco sustentados. A incongruência pode estar associada a diferentes histórias evolutivas desses genomas (Swofford, 1996), resolução em diferentes níveis da árvore (Felsenstein, 2004) ou como resultado de

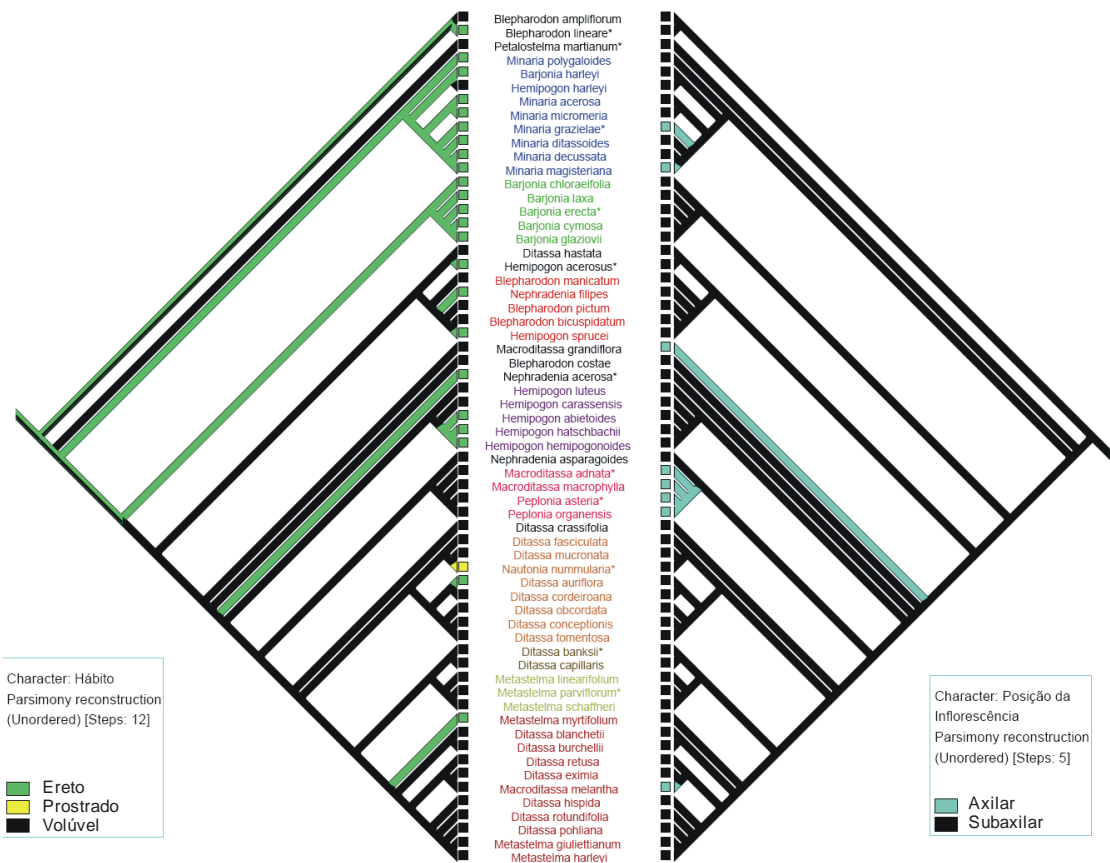


Figura 8. Otimização do hábito e da posição das inflorescências em Metastelmatinae no consenso de maioria 95% gerado com a matriz combinada de plastídio Geral através de Inferência Bayesiana.

hibridação (Heuertz & al., 2006). Tendo em vista que as espécies amostradas apresentaram clones geralmente formando clados e as divergências observadas não são sustentadas, é pouco provável que as incongruências observadas neste estudo sejam fruto de hibridações. Parece mais plausível, neste caso, suspeitar de uma incongruência entre a filogenia dos indivíduos e a de ITS, possivelmente ocasionada pela presença de cópias parálogas polimórficas nos ancestrais de várias linhagens, acompanhada de fixação aleatória e coincidente em espécies de clados não relacionados (Maddison & Knowles, 2006; Rokas & Carrol, 2006). Tendo em vista que todos os gêneros avaliados neste estudo foram contraditos pelos dados moleculares, podemos concluir que a incongruência entre os dados filogenéticos não se limitam apenas às fontes moleculares. Clados bem sustentados pelas

análises de plastídio formam uma composição bastante diversificada e pouco elucidativa do ponto de vista morfológico (Fig. 9). A falta de resolução para os nós basais de Metastelmatinae com base em dados plastidiais e nucleares, a incongruência entre dados plastidiais e nucleares para seus terminais e a falta de coesão entre os resultados de ambas as fontes de dados moleculares e a morfologia, atestam que as linhagens dessa subtribo são filogeneticamente crípticas e de difícil recuperação.

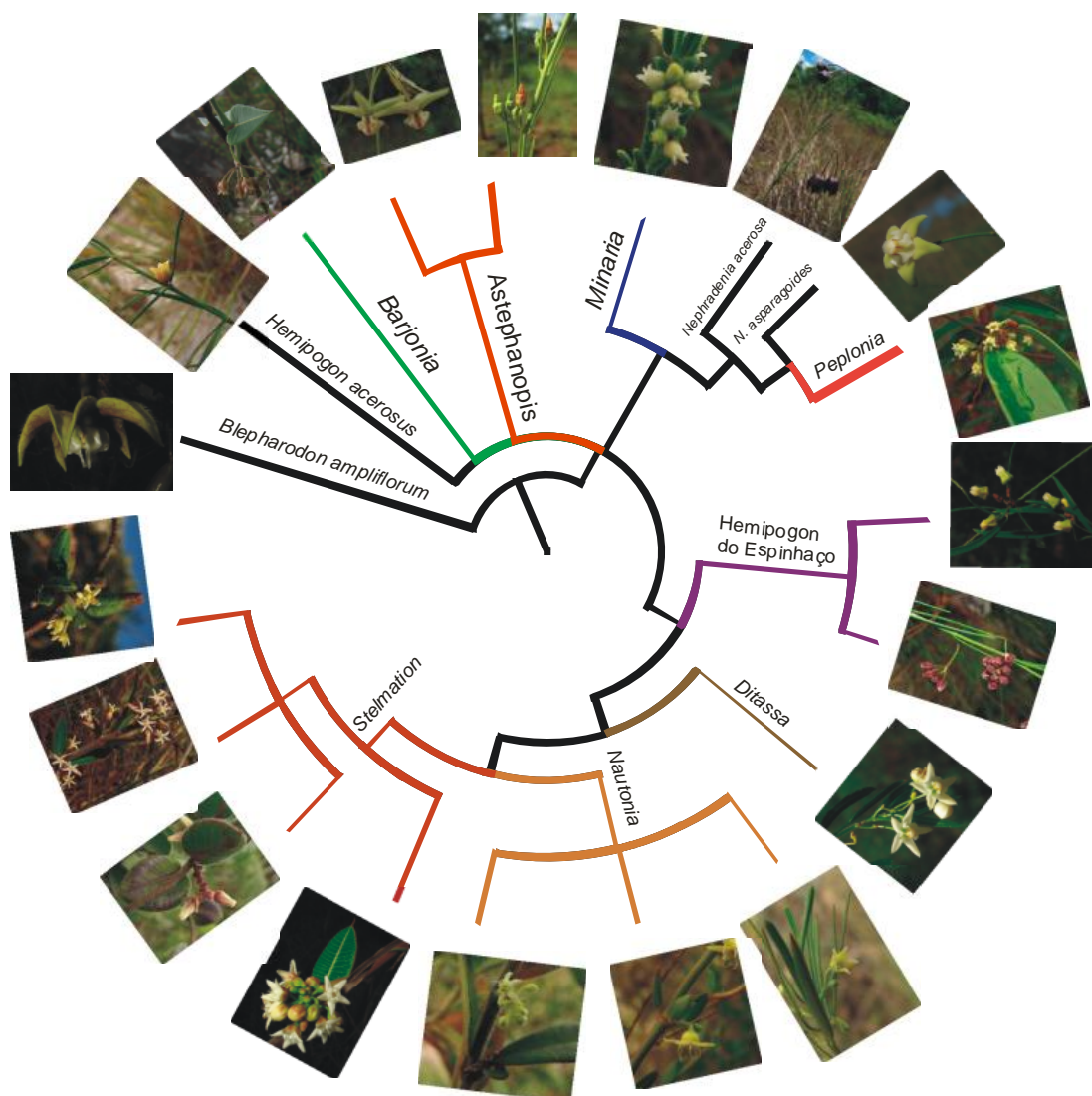


Figura 9. Consenso de maioria (95%) da matriz combinada de plastídio Total (incluindo *trnE-Y*) obtida na análise de Inferência Bayesiana, mostrando a diversidade morfológica de seus clados. Todos os clados possuem probabilidade posterior ≥ 95 ; as cores dos ramos correspondem aos clados marcados nas demais árvores de plastídio.

A utilização de SuperÁrvores foi formalizada em 1986 para reunir informações topológicas de árvores filogenéticas com amostragens apenas parcialmente sobrepostas e, desde então, vários métodos de construção têm sido criados e novas críticas elaboradas (Bininda-Emonds, 2000, 2003, 2004). Apesar da SuperÁrvore de Metastelmatinae recuperar boa parte dos clados obtidos com plastídio, a maioria dos clados foram ambíguos ou conflitantes. Alguns agrupamentos foram gerados pelo próprio método e não estavam presentes em nenhuma das árvores primárias, como *Metastelma myrtifolium*-*Ditassa eximia*, *Barjonia erecta*-*B. glazioui* e os nós mais basais não foram resolvidos. Ainda assim, alguns padrões podem ser observados a partir da fusão das informações de plastídio e de ITS e implicações taxonômicas podem ser propostas a partir deles.

Implicações Taxonômicas

Barjonia – Das sete espécies de *Barjonia*, apenas *B. grazielae* não foi amostrada neste estudo. O gênero se revelou bifilético, com *B. harleyi* aparecendo mais relacionada a *Hemipogon harleyi* e/ou incluído dentre as espécies de *Minaria*, enquanto as demais espécies do gênero formaram um clado altamente sustentado, tanto por dados de plastídio como por dados de ITS. A proximidade de *B. harleyi* e *Minaria* havia sido sugerida com base em morfologia (Konno & al., 2006) e é aqui confirmada com dados moleculares. Enquanto os dados de ITS indicam sua proximidade com *H. harleyi*, os de plastídio indicam sua inclusão em *Minaria*.

Blepharodon – Como indicado em outros estudos filogenéticos (Rapini & al., 2006), *Blepharodon* não é um gênero monofilético. Neste estudo, sua amostragem foi expandida, incluindo além do grupo externo, outras quatro espécies de *Blepharodon*. Com exceção de *B. costae*, *B. ampliflorum* e *B. lineare*, as espécies do gênero parecem formar um clado com *Hemipogon sprucei*. Esta relação é sustentada pelos dados de plastídio e não

é contradita pelos dados de ITS. Entretanto, enquanto os dados de plastídio indicam a inclusão de *Nephradenia filipes* neste clado, posição fortemente contradita pelos dados de ITS, a SuperÁrvore indica a inclusão de *Ditassa hastata* nele, relação ambígua, já que não aparece em nenhuma das árvores primárias, apesar de não ser contradita por nenhuma delas tampouco. Devido ao conflito de informações obtidas pelas duas fontes de informação, parece prematuro estabelecer um novo gênero para incluir as espécies de ‘*Blepharodon*’ e *H. sprucei*.

Ditassa – *Ditassa* não é recuperado em nenhuma das análises. Suas espécies aparecem relacionadas a espécies de *Metastelma* e de *Hemipogon* da Cadeia do Espinhaço formando um clado na Superárvore que também inclui espécies de *Macroditassa* (*M. melantha*) e *Nephradenia* (*N. asparagoides*). Três clados podem ser detectados a partir das análises de plastídio, mas nenhum deles apresenta alto suporte nas análises de IB e MP, nem são recuperados integralmente nas análises de ITS ou na SuperÁrvore. Além disso, a posição de *Ditassa banksii* com dados de plastídio e ITS é altamente conflitante, dificultando um posicionamento seguro para a circunscrição do gênero. Com exceção de alguns poucos casos de pares de espécies proximamente relacionadas, como *Ditassa auriflora* e *D. cordeiroana*, os agrupamentos gerados são conflitantes e nenhum deles de interpretação simples, reunindo espécies bastante discrepantes morfológicamente. O conflito entre os resultados obtidos a partir das duas fontes de dados pode estar diretamente associado à presença recorrente de cópias parálogas polimórficas de ITS característica dos representantes do clado MOG associada à fixação aleatória entre linhagens.

Apesar da dificuldade em se estabelecer as relações internas em Metastelmatinae a partir de dados de ITS, sua alta taxa de substituição possibilita a identificação no nível de espécies. Neste estudo, isso pode ser verificado através da inclusão de duas amostras do Genbank identificadas como *Ditassa lenheirensis*. Embora seja uma espécie bastante

característica quando sua flor é examinada por um especialista, ela pode ser facilmente confundida com inúmeras espécies de *Ditassa* quando estéril. Nossa análise mostrou que as sequências de *D. lenheirensis* aparecem em clados distantes filogeneticamente e possivelmente representam espécies distintas. Essa constatação, reforça a necessidade de cautela ao se trabalhar com dados depositados no GenBank e que, em alguns grupos, chegam a contar com 20% das identificações incompletas ou incorretas (Nilsson & al., 2006).

Hemipogon – Apesar das análises de plastídio e de ITS não serem conclusivas em relação à posição de *Hemipogon acerosus*, ambas indicam com alto suporte a proximidade entre as espécies eretas e volúveis de *Hemipogon* da Cadeia do Espinhaço (senso Rapini 2002) antes incluídas em *Metastelma* e *Astephanus*. Na SuperÁrvore, no entanto, *H. acerosus* é agrupado com *Nephradenia*, e sua relação com as espécies do Espinhaço é contestada, já que elas aparecem inseridas em um clado predominantemente composto por espécies de *Ditassa* e *Metastelma*.

Macroditassa – As espécies de *Macroditassa* aparecem dispersas em várias partes da árvore, mostrando que o gênero (senso Fontella-Pereira & Ferreira, 2005) é polifilético. A posição de *M. grandiflora* não é resolvida e *M. melantha*, uma espécie endêmica da Cadeia do Espinhaço, aparece mais relacionada às espécies de *Ditassa*. As outras duas espécies, incluindo *M. adnata* (espécie-tipo do gênero), aparecem formando um grupo onde emerge *Peplonia*. Esta relação é evidenciada pelos dados de plastídio, especialmente através de IB, recebendo baixo suporte através de MP. A proximidade de *Macroditassa* e *Peplonia* havia sido aventada por Rapini & al. (2004), mas a ausência de representantes de *Macroditassa* em análises filogenéticas anteriores havia impedido a constatação dessa hipótese. Neste estudo, a proximidade entre espécies de *Macroditassa* e *Peplonia* é confirmada e o conceito do gênero contestado. *Macroditassa* deve ser sinonimizada em

Peplonia, mas *M. grandiflora* e *M. melantha* não devem ser fazer parte do gênero. As inflorescências axilares utilizadas por Malme (1927) para estabelecer a tribo Orthosieae já haviam se mostrado homoplásticas, tendo aparecido de maneira independente pelo menos duas vezes na evolução das Asclepiadoideae neotropicais, uma em Metastelmatinae e outra fora da subtribo, em um clado a parte, Orthosiinae (Rapini & al. 2004). Essa interpretação é ampliada aqui, sugerindo que as inflorescências axilares e opostas teriam surgido mais de uma vez também em Metastelmatinae e, portanto, este carácter deve ser utilizado de maneira bastante cautelosa na definição de afinidades na subfamília.

Minaria – Sem a inclusão de *B. harleyi* e *H. harleyi*, *Minaria* constitui um gênero parafilético. Dessa maneira, o grupo, até então composto predominantemente por espécies endêmicas dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, deve ser ampliado de modo a incluir também as duas espécies endêmicas da Chapada Diamantina. A inclusão de *H. harleyi* em *Minaria* é especialmente interessante, pois trata-se de uma espécie discrepante em relação às demais espécies do gênero, apresentando hábito volúvel e o ginostégio rostrado, razão pela qual foi originalmente descrita em *Melinia* (Oxypetalinae) por Fontella-Pereira (1994). *Minaria polygaloides*, praticamente restrita à Serra do Cipó, parece ter sido a primeira linhagem a divergir no gênero, enquanto as demais espécies formam dois clados, um endêmico da Chapada Diamantina e outro composto principalmente por espécies endêmicas da porção mineira do Espinhaço. Este padrão sugere que *Minaria* teria surgido na porção mineira da Cadeia do Espinhaço e se dispersado para a Chapada Diamantina. A posição filogenética de *M. inconspicua*, espécie afim de *M. polygaloides*, porém endêmica do Planalto de Diamantina, poderá testar essa hipótese. Apesar dos clados baianos e mineiros possuírem a mesma idade, o número de espécies na linhagem de Minas Gerais (15) é bem maior que na linhagem da Bahia (2),

sugerindo que fatores particulares na porção mineira da Cadeia sejam mais favoráveis a diversificação do que na Chapada Diamantina.

Metastelma – As espécies de *Metastelma* aparecem em dois clados na análise de plastídio, um incluindo as espécies do norte da América do Sul e da América Central e outro incluindo as espécies designadas a *Metastelma* da Chapada Diamantina (*M. giuliettianum*, *M. harleyi* e *M. myrtifolium*) juntamente com espécies de *Ditassa* e de *Macroditassa melantha*. O primeiro clado não pôde ser avaliado com ITS, pois apenas *M. parviflorum* foi amostrada para aquele marcador. O segundo clado, denominado Stelmation no cladograma de plastídio, não foi recuperado pela análise de ITS. As espécies de *Metastelma* da Chapada Diamantina não formaram um clado com ITS, nem são agrupadas na SuperÁrvore. A amostragem de *Metastelma* em estudos filogenéticos tem sido pequena (ex. Rapini & al., 2003, 2006, 2007, Liede-Schumann & al., 2005) e o alcance deste estudo não é suficiente para propor uma circunscrição para *Metastelma*. Ainda assim, ele sugere fortemente que as espécies da Chapada Diamantina sejam excluídas de *Metastelma*. A transferência para outro gênero, no entanto, não pode ser inferida com base nos nossos resultados, dada a quantidade de conflitos e a fragilidade dos clados no complexo *Ditassa-Metastelma*. A relação entre esses gêneros, geralmente diferenciados com base na morfologia da coroa, dupla em *Ditassa* e simples em *Metastelma*, é motivo de constante discussão entre os estudiosos da subfamília. Assim, análises mais abrangentes, incluindo cerca de 30 espécies de *Metastelma* para investigar o limite entre esses gêneros estão em andamento (Liede-Schumann & al., em prep.).

Nautonia – A posição de *Nautonia* entre as espécies de *Ditassa* é sinalizada nas análises de plastídio, porém ela não é sustentada na IB (PP<95) e não aparece no consenso estrito da MP. Infelizmente, *N. nummularia* não foi amostrada nas análises de ITS, de modo que conclusões acerca das relações de suas relações devem aguardar mais dados.

Nephradenia – Três espécies de *Nephradenia* bastante distintas morfológicamente foram amostradas neste estudo. Os resultados para a relação entre elas foram bastante conflitantes entre os dados de plastídio e os de ITS. A IB de Plastídio Geral não definiu a posição de *N. acerosa*, mas incluiu *N. filipes* em um clado derivado de *Astephanopsis*, como grupo-irmão de *H. sprucei*. Apesar das flores dessas duas espécies serem distintas, elas compartilham hábito ereto ou pendente e folhas lineares, ocorrendo simpatricamente na Chapada dos Guimarães. Com dados de ITS, a relação entre *N. acerosa* e *N. filipes* é altamente sustentada, mas *N. asparagoides* aparece em um clado derivado, em meio ao complexo *Ditassa-Metastelma*. A IB de Plastídio Total, por outro lado, indica a relação de *N. acerosa* e *N. asparagoides*, com alta sustentação, formando um grado em relação a *Peplonia*. A SuperÁrvore recupera a relação estabelecida pelo ITS, colocando *H. acerosus* próximo do clado *N. acerosa-N. filipes*, evidenciando a afinidade entre essas espécies eretas e de folhas lineares e acerosas.

Petalostelma – Apenas a espécie-tipo de *Petalostelma*, *P. martianum*, foi amostrada em nossas análises. A posição dela não foi resolvida entre os principais clados de Metastelmatinae em nenhuma das análises. Análises primárias utilizando menos marcadores plastidiais, mas incluindo sequências de *P. sarcostemma* e *P. robertii*, no entanto, indicaram que o gênero é monofilético.

Tratamento taxonômico

Esta dissertação não constitui publicação efetiva no sentido do artigo 29 do ICBN e, portanto, quaisquer atos nomenclaturais nela contidos tornam-se sem efeito para os princípios de prioridade e homonímia.

Minaria T.U.P.Konno & Rapini, Taxon 55: 425. 2006. Tipo: *M. graziellae* (Fontella)

T.U.P.Konno & Rapini.

Minaria harleyi (Fontella) Rapini & U.C.S.Silva, **comb. inéd.** *Barjonia harleyi* Fontella, Kew Bull. 42: 663; f. 1. 1987. Tipo: Brazil. Bahia, Mucugê, cerca de 5 km na estrada para Andaraí, 41°20'W, 12°58'S, c. 900 m, 25.I.1980, *R.M. Harley et al.* 20657 (holótipo SPF; isótipo K).

Minaria volubilis Rapini & U.C.S.Silva, **comb. & nom. inéd.** *Melinia harleyi* Fontella, Pabstia 5(1): 1; t. 1. 1994 [non *Minaria harleyi* (Fontella) Rapini & U.C.S.Silva]. Tipo: BRASIL. Bahia, Serra do Sincorá, 4 km S. de Mucugê, na estrada para Cascavel pelo rio Cumbuca, *R.M. Harley et al.* 16057 (holótipo CEPEC; Isótipos: K, RB).

Peplonia Decne in A.DC., Prodr. 8: 545. 1844. Tipo: *P. nitida* Decne. [= *P. asteria* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz]

= *Gonionathela* Malme, Ark. Bot. 21A(3): 6. 1927. Tipo: *G. odorata* (Decne.) Malme [= *Gonioanthea axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz Vell.]

= *Macroditassa* Malme, Ark. Bot. 21A(3): 9. 1927. **syn. nov.** Tipo: *M. adnata* (E.Fourn.) Malme

Peplonia adnata (E.Fourn.) U.C.S.Silva & Rapini, **comb. inéd.** *Ditassa adnata* E.Fourn. in Mart. & Eichler, Fl. bras. 6(4): 256; t. 72. 1885. *Macroditassa adnata* (E.Fourn.) Malme, Ark. Bot. 21A(3): 10. 1927. Tipo: Brasil. s.l., s.d., Rio do Frade, *Pohl* 3286 (BM, G, NY, W-2 cibacopy SP).

Peplonia macrophylla (Malme) U.C.S.Silva & Rapini, **comb. inéd.** *Macroditassa macrophylla* Malme, Ark. Bot. 28A(5): 4. 1936. Tipo: Brasil. Minas Gerais, Viçosa, 26("20")/11/1930, *Y. Mexia* 5366 (holótipo: S, cibacopy HUEFS; Isótipos BM, G, US *n.v.*).

Referências Bibliográficas

- BAUM, B.R. 1992. Combining trees as a way of combining data sets for phylogenetic inference, and the desirability for combining gene trees. Taxon, 41: 1-10.
- BININDA-EMONDS, O.R.P. 2000. Factors influencing phylogenetic inference: A case study using the mammalian carnivores. Molecular Phylogenetics and Evolution, 16: 113-126.
- BININDA-EMONDS, O.R.P. 2003. Novel versus unsupported clades: Assessing the qualitative support for clades in MRP Supertrees. Systematic Biology, 62(6): 839-848.
- BININDA-EMONDS, O.R.P. 2004. The evolution of supertrees. Ecology and Evolution, 19(6): 322.
- BORSCH, T.; QUANDT, D.; KOCH, M. 2009. Molecular evolution and phylogenetic utility of non-coding DNA: applications from species to deep level questions. Plant Systematics and Evolution, 282(2-4): 107-108.
- BROWN, R. 1810. On the Asclepiadeae, a natural order of plants separated from the Apocynae of Jussieu. Memoirs of Wern Natural History Society, 1: 12-78.
- BRUYNS, P.V. 1999. Subtribes and genera of Asclepiadeae - a response to Liedtke. Taxon, 48: 23-26.
- CALONJE, M.; MARTÍN-BRAVO, S.; DOBES, 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. Plant Systematics and Evolution, 282(3-4): 257-280.
- CAMIN, J.H.; SOKAL, R.R. 1965. A method for deducing branching sequences in phylogeny. Evolution, 19: 311-326.
- CHASE, M.W.; HILLS, H.H. 1991. Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. Taxon, 40: 215-220.

- CIVEYREL, L.E.; THOMAS, A.; FERGUSON, K.; CHASE, M. 1998. Critical reexamination of palynological characters used to delimit Asclepiadaceae in comparison to the molecular phylogeny obtained from plastid *matK*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 9: 117-127.
- DECAISNE, J., 1844. Asclepiadaceae. In: A. P. CANDOLLE (Ed.): Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis. v. 8. Fortin, Masson & Cie, Paris. p.: 490-665.
- DOLPHIN, K.; BELSHAW, R.; ORMER, C.D.L.; QUICKE, D. 2000. Noise and incongruence: interpreting results of the incongruence length difference test. Molecular Phylogenetics and Evolution, 17: 401-406.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America, 19: 11-15.
- EDGAR, R.C. 2004. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research, 32(5): 1792- 97.
- ENDRESS, M.E.; BRUYNS, P. 2000. A revised classification of the Apocynaceae s.l. The Botanical Review, 66: 1-56.
- ENDRESS, M.; LIEDE-SCHUMANN, S.; MEVE, U. 2007. Advances in Apocynaceae: The Enlightenment, an introduction. Annals of the Missouri Botanical Garden, 94(2): 259-267.
- FAN, J.; QIN, H.; LI, D. ; JIN, X. 2009. Molecular phylogeny and biogeography of *Holcoglossum* (Orchidaceae: Aeridinae) based on nuclear ITS, and chloroplast *trnL-F* and *matK*. Taxon, 58(3): 849-861.
- FARINACCIO, M.A. 2000. Asclepiadoideae (Apocynaceae) do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo. 103 p.

- FARINACCIO, M.A. 2007. Sistemática Molecular de *Oxypetalum* R.Br. (Apocynaceae, Asclepiadoideae). Tese de Doutorado - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo. 153 p.
- FARRIS, J.S.; KALLERSJO, M.; KLUGE, A.G.; BULT, C. 1994. Testing significance of incongruence. Cladistics, 10(3): 315-319.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limit on phylogenies: An approach to using bootstrap. Evolution, 39: 783-791.
- FELSENSTEIN, J. 2004. Inferring Phylogenies. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. 663 p.
- FERREIRA, M.V.; PEREIRA, F.C. 2005. *Blepharodon*. In: M.G.L. WANDERLEY; G.J. SHEPHERD; A.M. GIULIETTI (Org.). Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo. v. 4. Hucitec, São Paul. p.: 101-104.
- FITCH, W.M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. Systematic Zoology, 20: 406-416.
- FONTELLA-PEREIRA, J. 1994. Estudos em Asclepiadaceae, XXIX. Espécies novas da caatinga e novas combinações em *Petalostelma* E. Fourn. Pabstia, 5(1): 4-7.
- FONTELLA-PEREIRA, J.; KONNO, T.U.P. 1999. Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras, XXXI. *Hypolobus* E. Fourn., um gênero extinto? Bradea, 8(25): 39-143.
- FONTELLA-PEREIRA, J.; FERREIRA, M.V. 2005. O gênero *Macroditassa* (Apocynaceae, Asclepiadoideae) no Brasil. Bonplandia, 14(1-2): 7-34.
- FONTELLA-PEREIRA, J.; PEREIRA, F.C. 2005. *Barjonia*. In: M.G.L. WANDERLEY; G.J. SHEPHERD; A.M. GIULIETTI (Org.). Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo. v. 4. Hucitec, São Paulo. p.: 100-101.

- FONTELLA-PEREIRA, J.; VALENTE, M.C.; HARLEY, R.M.; MARQUETE, N.F.S. 1989. Contribuição aos Estudos das Asclepiadaceae Brasileiras-24. *Checklist preliminar do Estado da Bahia. Rodriguésia*, 67(41): 81-115.
- FONTELLA-PEREIRA, J.; FERREIRA, M.V.; SANTOS, L.B.; KONNO, T.U.P.; GOES, M.B.; MEZABARBA, V. P. 2004. Asclepiadaceae. In: T.B. CAVALCANTI; A.E. RAMOS. (Org.). Flora do Distrito Federal, Brasil. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 3: 65-123.
- GOYDER, D.J. 2009. *Blepharodon crabronum* (Apocynaceae: Asclepiadoideae), a new species from the pre-Cambrian serranias of eastern Bolivia. Kew Bulletin, 64: 179–181.
- HAMILTON, M.B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. Molecular Ecology, 8: 513-525.
- HEUERTZ, M.; CARNEVALE, S.; FINESCHI, S.; SEBASTIANI, F.; HAUSMAN, J.F.; PAULE, L.; VENDRAMIN, G.G. 2006. Chloroplast DNA phylogeography of Europe ashes, *Fraxinus* sp., (Oleaceae): Roles of hybridization and life history traits. Molecular Ecology, 15: 2131-2140.
- JOHNSON, L.A. ; SOLTIS, D.E. 1995. Phylogenetic inference in Saxifragaceae sensu stricto and *Gilia* (Polemoniaceae) using *matK* DNA . Annals of the Missouri Botanical Garden, 82: 149-185.
- JOHNSON, L.A.; SOLTIS, D.E. 1994. *matK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s. str. Systematic Botany, 19: 143-156.
- KELCHNER, S.A. 2000. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. Annals of the Missouri Botanical Garden, 87: 482-498.
- KONNO, T.U.P. 2005. Ditassa R.Br. no Brasil (Asclepiadoideae-Apocynaceae) e Revisão Taxonômica de *Minaria* T.U.P.Konno & Rapini. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo. 238p.

- KONNO, T.U.P.; FONTELLA-PEREIRA, J. 2004. Some nomenclatural and taxonomic notes on Brazilian *Ditassa* (Apocynaceae, Asclepiadoideae). Kew Bulletin, 59(2): 297-300.
- KONNO, T.U.P.; PEREIRA, F.C. 2005. *Ditassa*. In: M.G.L. WANDERLEY; G.J. SHEPHERD; A.M. GIULIETTI (Org.). Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo. v. 4. Hucitec, São Paulo. p.: 107-111.
- KONNO, T.U.P.; RAPINI, A.; GOYDER, D.J.; CHASE, M.W. 2006. The new genus *Minaria*. Taxon, 55(2): 421-430.
- KRINGS, A.; THOMAS, D.T.; XIANG Q.-Y. 2008. On the generic circumscription of *Gonolobus* (Apocynaceae, Asclepiadoideae): Evidence from molecules and morphology. Systematic Botany, 33: 402-415.
- LIEDE, S. 1994. Myth and reality of the subtribe Astephaninae (Decne.) Schumann (Asclepiadaceae). Botanical Journal of the Linnean Society, 114: 81-98.
- LIEDE, S. 1997. Subtribes and Genera of the tribe Asclepiade (Apocynaceae, Asclepiadoideae) – a synopsis. Taxon, 46: 233-247.
- LIEDE, S. 2001. Molecular considerations on the subtribe Astephaninae Endl. ex Meisn. (Apocynaceae - Asclepiadoideae). Annals of the Missouri Botanical Garden, 88: 657-668.
- LIEDE, S.; ALBERS, F. 1994. Tribal disposition of Asclepiadaceae genera. Taxon, 43(2): 201-231.
- LIEDE, S.; TÄUBER, A. 2000. *Sarcostemma* R.Br. (Apocynaceae-Asclepiadoideae). A controversial generic circumscription reconsidered: Evidence from *trnL-trnF* spacers. Plant Systematics and Evolution, 225: 133-140.

- LIEDE, S.; KUNZE, H. 2002. *Cynanchum* and the Cynanchinae (Apocynaceae - Asclepiadoideae) - a molecular, anatomical and latex triterpenoid study. Organisms, Diversity & Evolution, 2: 239-269.
- LIEDE, S.; MEVE, U. 2004. Revision of *Metastelma* (Apocynaceae, Asclepiadoideae) in southwestern North America and Central America. Annals of the Missouri Botanical Garden, 91: 31-86.
- LIEDE, S.; TÄUBER, A. 2002. Circumscription of the genus *Cynanchum* (Apocynaceae-Asclepiadoideae). Systematic Botany, 27: 789-801.
- LIEDE, S.; MEVE, U.; TÄUBER, A. 2002. What is the subtribe Glossonematinae (Apocynaceae - Asclepiadoideae)? - A phylogenetic study based on cpDNA spacer., Botanical Journal Linnean Society, 139: 145-158.
- 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. Systematic Botany, 30(1): 184-195.
- MADDISON, W.P.; KNOWLES, L. 2006. Inferring phylogeny despite incomplete lineage Sorting. Systematic Biology, 55: 21-30.
- MADDISON, W.P.; MADDISON, D.R. 2007. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.0 <http://mesquiteproject.org>.
- MALME, G.O.A. 1927. Asclepiadaceae dusenianae in Paraná collectae. Ark.Bot., 12A(3): 1-48.
- MARQUETE, N.F.S. 1979. Revisão taxonômica do gênero *Barjonia* Decne. (Asclepiadaceae). Rodriguésia, 31(51): 7-71.
- MEVE, U. 2002. Species number and progress in asclepiad taxonomy. Kew Bulletin, 57: 459-464.

- MEVE, U.; LIEDE, S. 2001. Inclusion of *Tenaris* and *Macropetalum* in *Brachystelma* (Apocynaceae-Asclepiadoideae-Ceropegieae) inferred from non-coding nuclear and chloroplast DNA sequences. Plant Systematics and Evolution, 228: 89-105.
- MEVE, U.; LIEDE, S. 2002. A molecular phylogeny and generic rearrangement of the stapelioid Ceropegiae (Apocynaceae-Asclepiadoideae). Plant Systematic and Evolution, 234: 171-209.
- MORILLO, G.N. 1976. A revision of *Blepharodon* (Asclepiadaceae). Unpublished M.Sc. thesis. University of Saint Louis, U. S. A.
- MORILLO, G.N. 1997. Asclepiadaceae. In: J.A. STEYERMARK, P.E.; BERRY, B.K.; HOLST (Eds.). Flora of the Venezuelan Guayana. v. 3. Missouri Botanical Garden. Saint Louis. p.: 129-177.
- NILSSON, R.H.; RYBERG, M.; KRISTIANSOON, E.; ABARENKOV, K.; LARSSON, K.H.; KOLJALG, U. 2006. Taxonomic Reability of DNA sequences in Public Sequence Databases: a Fungal Perspective. PlosOne, 1(1): 59e.
- NYLANDER, J.A. 2008. MrModeltest v.2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- OXELMAN, B.; LIDÉN, M.; BERGLUND, D. 1997. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the subtribe Sileneae (Caryophyllaceae). Plant Systematics and Evolution, 206: 393–410.
- PEREIRA, F.C. 2005. *Nautonia*. In: M.G.L. WANDERLEY; G.J. SHEPHERD; A.M. GIULIETTI (Org.). Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo. v. 4. Hucitec, São Paulo. p.: 128.
- POTGIETER, K.; ALBERT, V.A. 2001. Phylogenetic relationships within Apocynaceae *s.l.* based on *trnL* intron and *trnL-F* spacer sequences and propagule characters. Annals of the Missouri Botanical Garden, 88: 523-549.

- RAPINI, A. 2002. Six new species of *Ditassa* R. Br. from the Espinhaço Range, with notes on generic delimitation in Metastelmatinae (Apocynaceae, Asclepiadoideae). Kew Bulletin, 57: 565-583.
- RAPINI, A., 2009. Revisitando as Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço. Trabalho científico original apresentado à Universidade Estadual de Feira de Santana como um dos como pré-requisitos para promoção na carreira de Titular B para Pleno – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 68p.
- RAPINI, A.; CHASE, M.W.; KONNO, T.U.P. 2006. Phylogenetics of South American Asclepiadeae (Apocynaceae). Taxon, 55(1): 119-124.
- RAPINI, A.; MELLO-SILVA, R.; KAWASAKI, M.L. 2001. Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brasil. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, 19: 55-169.
- 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.; FONTELLA-PEREIRA, J.; LAMARE, E.H.; LIEDE-SCHUMANN, S. 2004. Taxonomy of *Peplonia* (including *Gonioanthela*) and a reinterpretation of Orthosieae (Asclepiadoideae, Apocynaceae). Kew Bulletin, 59: 531-539.
- RAPINI, A.; VAN DEN BERG, C.; LIEDE-SCHUMANN, S. 2007. Diversification of Asclepiadoideae (Apocynaceae) in the New World, Annals of the Missouri Botanical Garden, 94: 407-422.
- ROKAS, A.; CARROLL, S.B. 2006. Bushes in the tree of life. Plosbiology, 4(1): 352e.
- RONQUIST, F.; HUESENBECK, J.P. 2003. MrBayes 3. Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 19: 1572-1574.

- SALAMIN, N.; HODKINSTON, T.R.; SALOVAINEN, V. 2002. Building supertrees: an empirical assessment using the grass family (Poaceae). Systematic Biology, 51(1): 136-150.
- SANG, T.; CRAWFORD, D.J.; STUESSY, T.F. 1997. Chloroplast DNA Phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). American Journal of Botany, 84: 1120-1136.
- SCHUMANN, K., 1895. Apocynaceae & Asclepiadaceae. In: H.G.A. ENGLER; K.A.E. PRANTL (Eds.): Die natürlichen Pflanzenfamilien. v. 4, pt 2. Wilhelm Engelmann, Leipzig. p.: 109-306.
- SENBLAD, B.; BREMER, B. 1996. The familial and subfamilial relationships of Apocynaceae and Asclepiadaceae evaluated with *rbcL* data. Plant Systematics and Evolution, 202: 153-175.
- SENBLAD, B.; BREMER, B. 2000. Is there a justification for differential a priori weighting in coding sequences? A case study from *rbcL* and Apocynaceae s.l. Systematic Biology, 49(1): 101–113.
- SHAW, J.; LICKY, E.B.; SCHILLING, E.E.; SMALL R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetics studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. American Journal of Botany, 94(3): 275-288.
- SILVA, U.C.S. 2008. Sistemática molecular de Metastelmatinae (Asclepiadoideae, Apocynaceae) com ênfase em espécies endêmicas da Chapada Diamantina, BA. Monografia. Universidade Estadual de Feira de Santana. Departamento de Ciências Biológicas. Feira de Santana, BA. 50p.
- SPALIK, K.; DOWNIE, S.R.; WATSON, M.F. 2009. Generic delimitations within the *Sium* alliance (Apiaceae tribe Oenantheae) inferred from cpDNA *rps16-5'trnK*^(UUU) and nrDNA ITS sequences. Taxon, 58(3): 735-748.

- STADEN, R.; BEAL K.F.; BONFIEL, J.K. 1999. The Staden Package. Methods in Molecular Biology, 132: 115-30.
- STRUWE, L.; ALBERT, V.A.; BREMER, B. 1994. Cladistic and family level classification of the Gentianales. Cladistics, 10: 175-206.
- 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. Theoretical and Applied Genetics, 89: 26-32.
- SWOFFORD, D.L.; OLSEN, G.J.; WADDELL, P.J.; HILLIS, D.M. 1996. Phylogenetic inference. In: D.M. HILLIS; C MORITZ; B.K. MABLE (Eds.). Molecular Systematics. 2nd Ed. Sinauer, Sunderland. p.: 407-514.
- SWOFFORD, D.L. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis using Parsimony (and other methods), v. 4 beta 10. Sunderland: Sinauer Associates.
- TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G.; BOUVET, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology, 17: 1105-1109.
- TOPIK, H.; YUKAWA, T.; ITO, M. 2005. Molecular phylogenetics of subtribe Aeridinae (Orchidaceae): insights from plastid *matK* and nuclear ribosomal ITS sequences. Journal of Plant Research, 118: 271-284.

ANEXO

Artigo publicado na revista **Curtis's Botanical Magazine**

667. HEMIPOGON ABIETOIDES

Apocynaceae-Asclepiadoideae

Alessandro Rapini, Patrícia Luz Ribeiro & Uiara Catharina Soares e Silva

Summary. An illustration and a complete description of *Hemipogon abietoides* E. Fourn. is provided. The species was known only by the type, collected in 1825 by Riedel, during the first part of the legendary expedition of Langsdorff. Rediscovered after more than 180 years, *Hemipogon abietoides* is a beautiful example of how a combination of micro-endemism and uneven collecting effort may distort our perception of the distribution of species, their conservation status and the importance of conserving particular areas.

The *Apocynaceae* is among the ten largest families of angiosperms. The species of the family all possess a milky juice, and have regular, pentamerous flowers, except for the gynoecium, which has two carpels, usually free at the ovary level, but fused to the apex, where a stylar-head is formed. Within the family different levels of fusion are found between different floral organs, reaching a maximum in *Asclepiadoideae*. In this subfamily, the androecium is fused to the gynoecium and to the corolla, forming the gynostegium and usually a corona, respectively, and the pollen is grouped in five pollinaria per flower, each unit composed of a translator secreted by the stylar-head and two pollinia of adjacent stamens.

Corona morphology has largely been used as an important character to define genera, especially in *Metastelmatinae*, often leading to artificial classifications (Rapini 2002). The absence of corona, for instance, was used as a single criterion to place some Brazilian species in *Astephanus* (e.g., Fontella-Pereira 1987). That genus, however, must be restricted to the African species (Liede 1994, 2001); it diverged close to the base of

Asclepiadoideae and is not closely related to any American group (Rapini et al. 2003). Based on overall similarity and informal hypotheses of phylogenetic relationships, the Brazilian species of *Astephanus* were transferred either to *Ditassa* or *Hemipogon* (Rapini et al. 2001; formalised in Rapini 2003), the former traditionally defined by flowers with double-segmented corona lobes and the latter by flowers lacking corona.

The systematics of the New World *Asclepiadoideae* received a greatly impulse from molecular phylogenetics (e.g. Liede & Taüber 2002; Rapini et al. 2003, 2005, 2006; Liede-Schumann et al. 2005) and four American lineages were recognised: the American *Marsdenia*, the *Asclepias*, the *Cynanchum* subg. *Mellichampia* and the MOG clade. The latter one is the most diverse of them and the first to reach the New World (Rapini et al. 2007). It includes two small genera (*Pentacyphus* and *Diplolepis*) forming a basal grade with *Orthosiinae* and the core group, which is composed of three larger subtribes: *Metastelmatinae*, *Oxypetalinae* and *Gonolobinae*. Internal relationships in MOG are still poorly resolved, but important insights started to appear. Several American species previously assigned to *Cynanchum* was shown to be more closely related to the exclusive American clade MOG and a well-supported clade composed of subshrubs previously assigned to *Ditassa* emerged close to the base of *Metastelmatinae*, being assigned to a new genus, *Minaria*. The 19 species of *Minaria* occur in the State of Minas Gerais, fourteen of them in the Espinhaço Range, including several microendemics, five of them only described recently (Konno et al. 2006).

The Espinhaço Range is an “S”-shaped strip of mountains up to 2,000 m, c. 1,000 km long and wideness from 50 to 100 km, in the States of Minas Gerais and Bahia. Above 900 m, it is dominated by the *campos rupestres*, a mosaic of open vegetation on quartzite rocks and sand soils (for details of the Espinhaço, see Giulietti et al. 1997). Because of mineral extraction, particularly of old and diamonds, it was the richest region during the

colonial Brazil and route of several naturalists since Martius and Spix's expedition, in 1817. The remarkable diversity and uniqueness of plants from *campos rupestres* of the Espinhaço Range has impressed since then. It encloses nearly 10% of Brazilian flora and the highest levels of endemics in Brazil; around 30% of its flora is endemic and of the almost 2,300 rare species (confined to areas smaller than 10,000 km²) reported in Brazil (Giulietti et al. 2009), about 30% are endemic to the Espinhaço Range.

The broad knowledge of its flora and multidisciplinary studies envisioned to understand the evolution and dynamic of rare species, their origin and maintenance, may help the conservation of Espinhaço biodiversity (Rapini et al. 2009), but data in this direction are few. Molecular estimations of the age of *Minaria* showed that the lineage diverged from the other *Asclepiadoideae* at around 12 million years ago (mya), but diversified only c. 4 mya (Rapini et al. 2007). A similar pattern has also been found in unrelated groups of plants with high levels of microendemics in the Espinhaço Range, suggesting that environmental factor during the Pleistocene influenced their irradiation in these mountain range (Queiroz et al. 2009). Aiming at better understanding the evolution of endemism in the Espinhaço range as well as the relationships among Brazilian *Asclepiadoideae*, we started a set of studies with the basal grade of *Metastelmatinae*, with particular attention to *Minaria* and *Hemipogon*.

The survey of *Asclepiadoideae* from Espinhaço Range in Minas Gerais (Rapini et al. 2001) had recognised 97 native species (nowadays, after less than a decade, this numbers is already 10% higher; Rapini, in prep.) and the proportion of its endemics coincided with that estimated to the entire flora (almost 30%; Rapini et al. 2002). With 62 species, the *Metastelmatinae* were the most diverse group and almost half of their species are endemic to the Espinhaço range, including 22 microendemics. At that time, three species were known only by their types: *Hemipogon abietoides* E. Fourn., *Minaria*

bifurcata (Rapini) T.U.P. Konno & Rapini and *M. magisteriana* (Rapini) T.U.P. Konno & Rapini. The first was considered probably extinct in the list of endangered species from State of Minas Gerais (Conselho Estadual de Política Ambiental, 1997; Mendonça & Lins 2000). On the other hand, it was not included in the most recent and controversial list of 472 endangered species of Brazil, published in September of 2008 by the Brazilian Ministry of Environment, which, concerning to the Apocynaceae, should not be seriously considered.

Most plant species in the Espinhaço range are rare because of their low abundance or their small geographical distribution (Conceição et al. 2006), or both. The high β -diversity in the area may explain why new species are still frequent and many are known only by few specimens, despite the region has been visited by botanists for almost two centuries. Therefore, instead of extinctions, an alternative option based on sampling artefact must also be considered to explain species not recollected for many years, sometimes for more than a century: these species might be confined to very small areas, outside the route currently in use by collectors (Rapini et al. 2002). During our exhaustive searching for populations of *Minaria* along the Espinhaço range, this alternative was confirmed. Here, we describe and illustrate *H. abietoides*, a species independently recollected in 2007 and 2008, after more than 180 years without collection.

The genus *Hemipogon*, as recently circumscribed by Rapini et al. (2001; see also Rapini 2002), like *Minaria*, also presents a high concentration (ca. 60%) of endemics in the Espinhaço Range, and *H. abietoides* could probably be considered the rarest species of Brazilian Asclepiadoideae. It was described in *Flora brasiliensis* (Fournier 1885) based on a single collection by Ludwig Riedel, in a graminous stony area of Serra da Lapa, part of Espinhaço Range in the State of Minas Gerais, in January of 1825. The Germany botanist was coming from ‘Tejuco’ (now Diamantina) back to Rio de Janeiro with the baron

Langsdorff's team of naturalists, which at that time also included the French zoologist Edouard Ménétrières, pupil of Cuvier, and the Russian Nester Rubtsov, responsible for collecting data of geography and astronomy; Rugendas, the talented Germany painter responsible to illustrate the Brazilian flora, fauna and people, had left the group in November 1824, after a serious disagreement with Langsdorff. Funded by the czar Alexander I, Langsdorff's legendary expedition was under the service of the Russian empire, and became one of the most famous excursions in Brazil countryside during the century XIX, especially known because of the tragic death of the painter Taunay and the irreversible mental sickness of its leader (for Langsdorff's personal annotations of the first part of this expedition, see Silva 1997).

The work along the Espinhaço Range was extremely productive for Riedel. In Serra da Piedade, for instance, he collected in half day more plants than in any other excursion so far and returned with his papers full of plants, commented Langsdorff in 20th September 1824. They arrived in Serra da Lapa in the middle of November and immediately realized that those mountains, despite dry, rocky and stony, were distinct by the high number of new species and great varieties of forms. In 20th November, Langsdorff called attention to the great diversity of soils and the topography, commenting that the place was one of the most interesting so far visited, "we found new species everywhere; we could not even think in going away" (Silva 1997: p. 245; free translation). Few days later, after Riedel organised his entire collection, which was already over 1,000 specimens, the baron reported Riedel's carefulness and dedication to the science. Coming from Langsdorff, who was seen as a restless person, very exigent with his workers, this compliment would let Riedel very proud. With the sickness of Langsdorff, at the end of the expedition, in 1829, Riedel assumed the responsibility to send the material to the Russian Academy of Science, where it remained lost for a hundred years. Later, he became director of the Botanical

Department of the National Museum in Rio de Janeiro, staying in Brazil until his death, in 1961. Therefore, it is not by chance that nearly 200 names of plants have been honoured to Riedel ('riedelii and riedeliana/um/us'; TROPICOS, '<http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=&commonname=>', accessed in June 2008).

Langsdorff returned to Rio de Janeiro by the same way he crossed one month earlier to reach Diamantina, but only during their returning, in January (*in shed.*) of 1825, Riedel was lucky enough to find *H. abietoides*. The name 'abietoides' properly highlighted its acicular, densely arranged leaves, which look like those found in the conifer genus *abies*, boring to the plant an appearance of a little pine. The species is represented by two herbarium exsiccates, one placed in Paris (P), where Fournier worked, and other in San Petersburg (LE). Fontella-Pereira (1989) described and illustrated its pollinarium and used the material in LE to lectotipify the name, also transferring the species to *Metastelma* based on the single-segmented corona lobes of its flowers. This position was not followed by Rapini et al. (2001). Corona morphology is commonly convergent among unrelated groups and often improper to define genera; on the other hand, vegetative morphology seems to be an important source of evidence for phylogenetic relationships in Asclepiadoideae (Rapini et al. 2002, 2006; Liede-Schumann et al. 2005), possibly associated to a phylogenetic ecological conservatism in the group.

We rediscovered *H. abietoides* twice in 2008: first, in January, while looking for *Minaria hemipogonoides*, a species that was not recollected for a century or so (we did find it during a subsequent expedition to Serra da Lapa, in April); and in May, in the herbarium SPF (it had been independently collected in northern Serra do Cipó by Pirani et al., one year earlier). These findings, therefore, confirmed the punctual distribution of *H. abietoides* and how bias in sampling along the Espinhaço Range can distort our perception of endangered status of microendemics and, therefore, the species richness and priority

areas for conservation. They also allowed us to illustrate the species, particularly its brownish urceolate corolla, somewhat similar to that found in *H. acerosus*. The recent sample allowed extraction of entire DNA, which will be hopefully useful to objectively establish its phylogenetic relationship in the subfamily, providing a stable taxonomic position for the species and helping in generic delimitations in *Metastelmatinae*.

Hemipogon abietoides E. Fourn. in Martius & Eichler, Fl. Bras. 6(4): 196 (1885). *Metastelma abietoides* (E. Fourn.) Fontella, Bradea 5(23): 261; figs A-B (1989). Type: BRASIL. Minas Gerais: 'In locis petrosis graminosis Serra da Lapa, m. janeiro: Riedel 1342 part' (holotypus P!; isotypus: LE n.v., photo F!).

DESCRIPTION. *Herb* erect, 10 to 20 cm high, latex white. *Stem* cylindrical with longitudinal lines sparsely puberulent. *Leaves* green, reddish to the apex, spirally, obliquely erect, imbricate, the most basal deciduous, sessile, acuminate, abaxially sulcate, base attenuate, apex acuminate, 0.6 – 1.5 × 0.05 – 0.07 mm, glabrescent or with sparse hairs. *Cymes* subaxillary, alternate, usually uni- or biflora, rarely triflora, subsessile or peduncle 1 – 2 mm long; pedicel 2 – 3 mm long, glabrous. *Calyx* greenish, becoming orange to reddish to the apex of lobes, glabrous, usually with a pair of finger-like colleters (0.2 – 0.5 × c. 0.1 mm) alternate to the sepals; sepals imbricate, lanceolate, 2 – 2.2 × 0.05 – 0.07 mm, apex acute. *Corolla* urceolate, abaxially wine, clearer to the base, glabrous, adaxially cream, barbelate, with introrse hairs parallel to the margin and a tuft of retrorse hairs at the medium-basal portion of lacinia; lacinia lanceolate 3.8 – 4 mm × 1.4 – 1.5 mm, apex acute, slightly contorted. *Corona* pentalobed, lobes suboblong, apex acute, slightly incurvate, c. 1.5 × 0.3 mm, hyaline, briefly longer than the gynostegium. *Filets* c. 0.4 mm long; wings of anther falcate at base, smaller than the dorsum; apical membrane ovate. *Corpusculum* cuneiform 0.25 – 0.3 × 0.08 – 0.1 mm; caudicles curvate distally, c. 0.08 mm

long; pollinia elliptic to dacryoid, $0.35 - 0.4 \times 0.1 - 0.15$ mm. *Gynostegium* mamillate at apex. *Follicles* immature green with wine spots, erect, ampuliform, curved at apex. (Figs. 1-3)

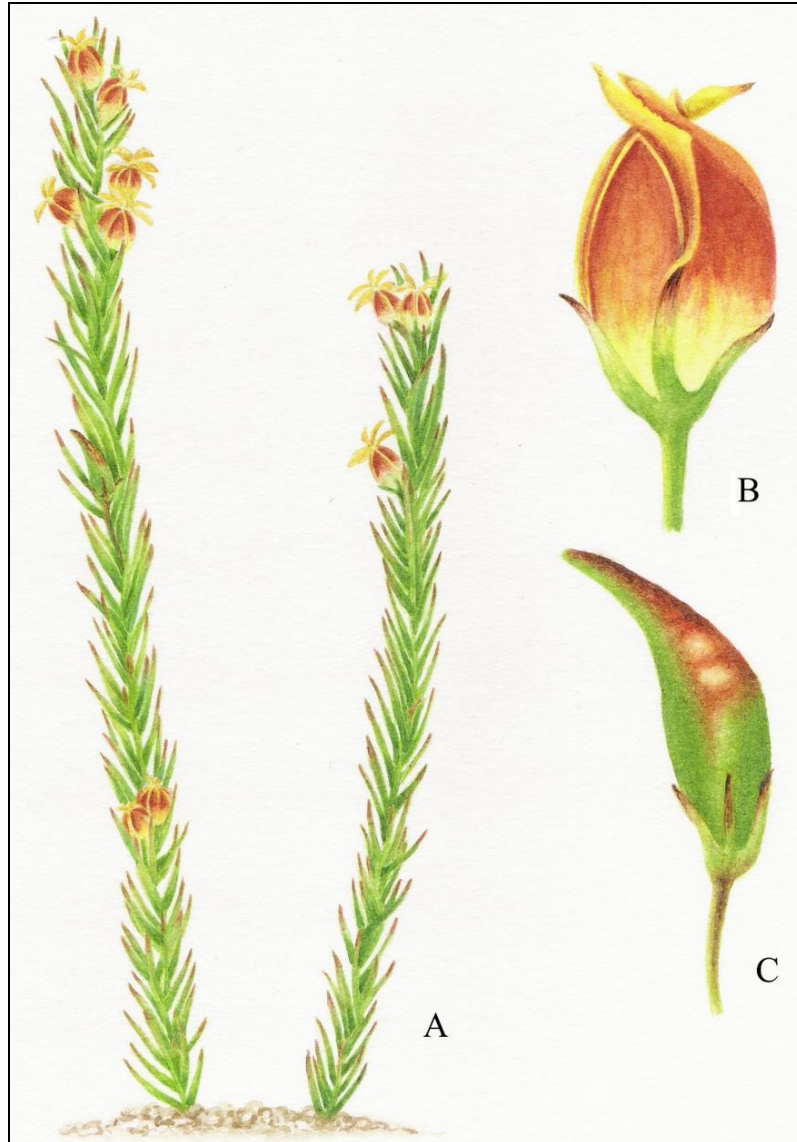


Fig. 1. A. Habit (x 1); B. Flower (x 7); C. Fruit (x 5)

ADDITIONAL MATERIAL EXAMINED: BRAZIL. Minas Gerais: Congonhas do Norte, Serra Talhada, 9 km S of Congonhas, road to Extrema, c. 11 km to Lapinha, $18^{\circ}56'14,8''$ S, $43^{\circ}41'06,1''$ W, 20 Jan. 2007, *Pirani et al.* 5608 (SPF); Santana do Riacho, Serra do Cipó,

road left to Lapinha, way to Rio de Pedras, 19°03'15,8"S, 43°42'49,1"W, 29 Jan. 2008, *Ribeiro et al.* 283 (HUEFS).

DISTRIBUTION AND HABITAT. *Hemipogon abietoides* is restricted to the occidental portion of Serra do Cipó, in the Espinhaço Range of Minas Gerais, along an inactive, ancient road between Santana do Riacho and Congonhas do Norte, which, in the past, was the principal connection between Santa Luzia and Tejuco. Nowadays, most of this area belongs to private properties and includes the Ermo Gerais, a Private Reserve of Nature Patrimony (RPPN). It occurs in 'campos rupestres', on stony soils among graminious vegetation, c. 1250 m, and the two recent collections were found about 15 km distant from each other (Fig. 3A).

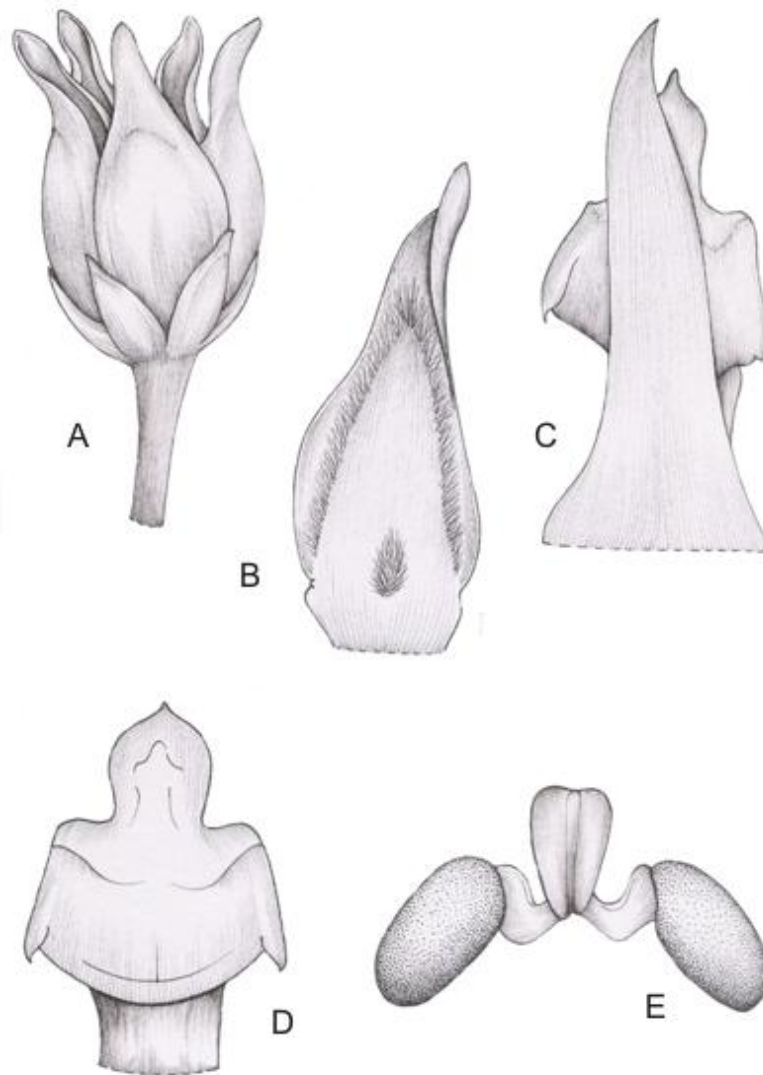


Fig. 2. **A.** Flower (x 7). **B.** Lobe of corolla, adaxially (x 15). **C.** Corona lobe in front of stamen (x 5); stamen (x 30). **D.** Pollinarium (x 60).

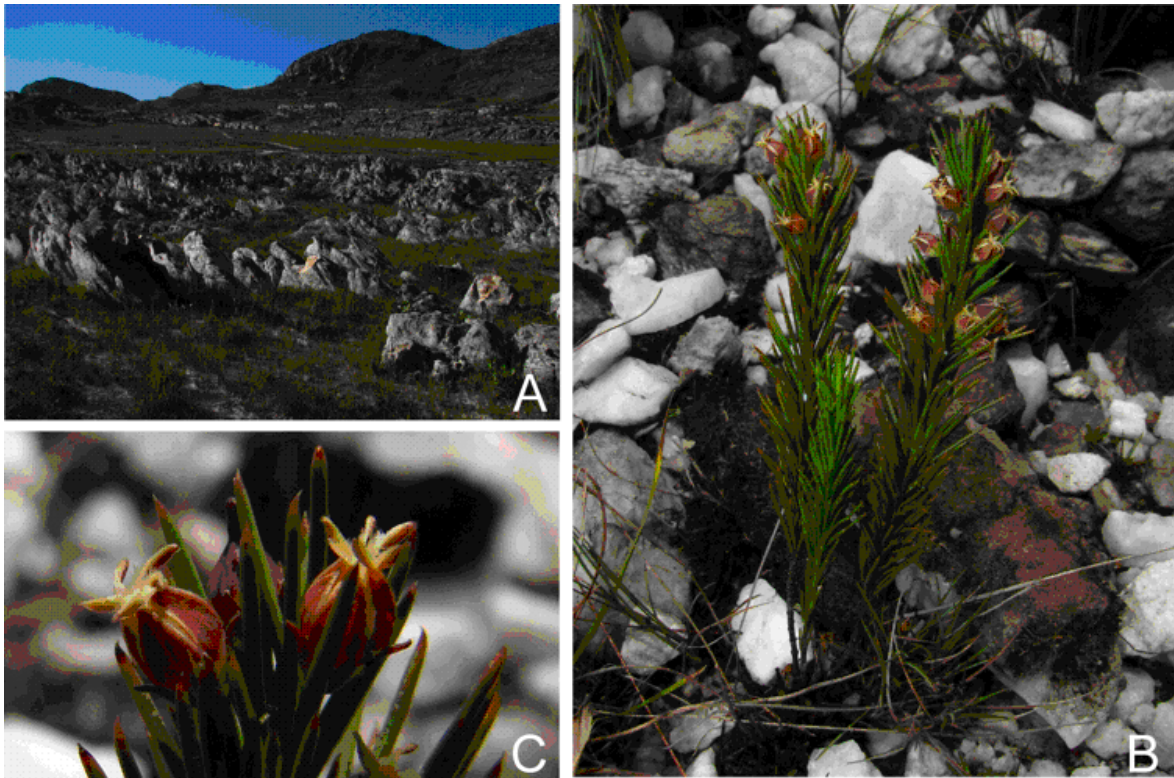


Fig. 3. A. Landscape of Serra da Lapinha; B. Habit; C. Flowers.

NOMENCLATURAL NOTES. Fontella-Pereira (1989) designed the material in LE lectotype of *Hemipogon abietoides*. Aware of the material placed in P, herbarium where the types of names described by Fournier are supposed to be found (Stafleu & Cowan 1976), it should be treated as the holotype and that in LE, its isotype.

ACKNOWLEDGMENTS. This article is part of a project on the *Apocynaceae* diversity, funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). The trip that culminated with the finding of *Hemipogon abietoides* was also supported by Instituto do Milênio do Semi-árido (IMSEAR/CNPq). AR is supported by a Pq2 grant (CNPq), PLR by a Doctoral fellowship (FAPESB) and UCSS by a Master fellowship (CAPES).

REFERENCES

- Conceição, A. A., Rapini, A., Pirani, J. R., Giulietti, 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. & Oliveirs, A. A. (2005). Campos Rupestres. In: F. A. Juncá, L. Funch & W. Rocha (orgs). *Biodiversidade e conservação da Chapada Diamantina*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. pp. 153–180.
- Conselho Estadual de Política Ambiental (1997). Lista das espécies ameaçadas de extinção da flora do Estado de Minas Gerais. *Diário Executivo, Legislativo e Publicações de Terceiros*. Quinta-feira, 30 de Outubro de 1997. Minas Gerais, Caderno 1. pp. 10–12.
- Fontella-Pereira, J. (1987). Estudos em Asclepiadaceae, 22. Considerações sobre a ocorrência do gênero *Astephanus* R. Br. no Brasil. *Bradea* 4(48): 377–383.
- Fontella-Pereira, J. 1989. Estudos em Asclepiadaceae, 26. Novas combinações e novos sinônimos. *Bradea* 5(23): 261–266.
- Fournier, E. P. N. 1885. Asclepiadaceae. In: C. F. P. Martius & A. W. Eichler (eds) *Flora brasiliensis*, Vol. 6, pt. 4, Typographia Regia, Monachii. pp. 189–332; tabs. 50–98.
- Giulietti, A. M., Pirani J. R. & Harley, R. M. (1997). Espinhaço range region. Eastern Brazil. In: S. D. Davis, V. H. Heywood, O. Herrera-MacBryde, J. Villa-Lobos & A. C. Hamilton (eds). *Centres of plant diversity. A guide and strategies for the conservation*, Vol. 3. The Americas. WWF/IUCN, Cambridge. pp. 397–404.
- Giulietti, A. M., Rapini, A., Andrade, M. J. G., Queiroz, L. P. & Silva, J. M. C. (orgs) (2009). *Plantas raras do Brasil*. Conservação Internacional & Universidade Estadual de Feira de Santana, Belo Horizonte.
- Konno, T. U. P., Rapini, A., Goyder, D. J. & Chase, M. W. (2006). The new genus *Minaria* (Asclepiadoideae, Apocynaceae). *Taxon* 55: 421–430.

- Liede, S. (1994). Myth and reality of the subtribe *Astephaninae* (Decne.) Schumann (*Asclepiadaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 114: 81-98.
- Liede, S. (2001). Subtribe *Astephaninae* (Apocynaceae – Asclepiadoideae) reconsidered: new evidence based on cpDNA spacers. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 657–668.
- Liede, S. & Täuber, A. (2002). Circumscription of the genus *Cynanchum* (Apocynaceae – Asclepiadoideae). *Systematic Botany* 27: 789–800.
- 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. *Systematic Botany* 30: 183–194.
- Mendonça, M. P. & Lins, L. V. (2000). *Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais*. Fundação Biodiversitas e Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, Belo Horizonte.
- Queiroz, L. P., Santos, A. K., Carneiro, D. S., Souza, E. R., Conceição, A. S., Simon, M. F., Machado, M. C., Andrade, M. J. G., Giulietti, A. M., Rapini, A., Berg, C., Conceição, A. A. (2009). Por que há tantas espécies raras nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço? – o que as filogenias podem responder. Livro de Resumos do LX Congresso Nacional de Botânica, Feira de Santana, 2009.
- Rapini, A. (2002). Six new species of *Ditassa* R. Br. from the Espinhaço Range, Brazil, with notes on generic delimitation in Metastelmatinae (Apocynaceae – Asclepiadoideae). *Kew Bulletin* 57: 533–546.
- Rapini, A. (2003). Nomenclatural notes in Asclepiadoideae (Apocynaceae) - publication of some previously invalidly published names. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 21: 277-278.

- Rapini, A., Mello-Silva, R. & Kawasaki, M. L. (2001). Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 19: 55–169.
- Rapini, A., Mello-Silva, R. & Kawasaki, M. L. (2002). Richness and endemism in Asclepiadoideae (Apocynaceae) from the Espinhaco Range of Minas Gerais, Brazil – a conservationist view. *Biodiversity and Conservation* 11: 1733–1746.
- 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., Fontella-Pereira, J., de Lamare, E. H. & Liede-Schumann, S. (2005). Taxonomy of *Peplonia* (including *Gonioanthela*) and a reinterpretation of Orthosieae (Asclepiadoideae, Apocynaceae). *Kew Bulletin*: 531–539.
- 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. (2007). Diversification of Asclepiadoideae (Apocynaceae) in the New World. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 94: 407–422.
- Rapini, A., Ribeiro, P. L., Lambert, S. & Pirani, J. R. (2009). A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4: 15–23.
- Silva, D. G. B. (1997). *Os diários de Langsdorff. Volume 1: Rio de Janeiro e Minas Gerais*. Associação Internacional de Estudos Langsdorff e Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Stafleu, F. A. & Cowan, R.S. (1976). *Taxonomic Literature. Volume I: A–G*. 2nd ed. Bohn, Scheltema & Holkema, Utrecht.