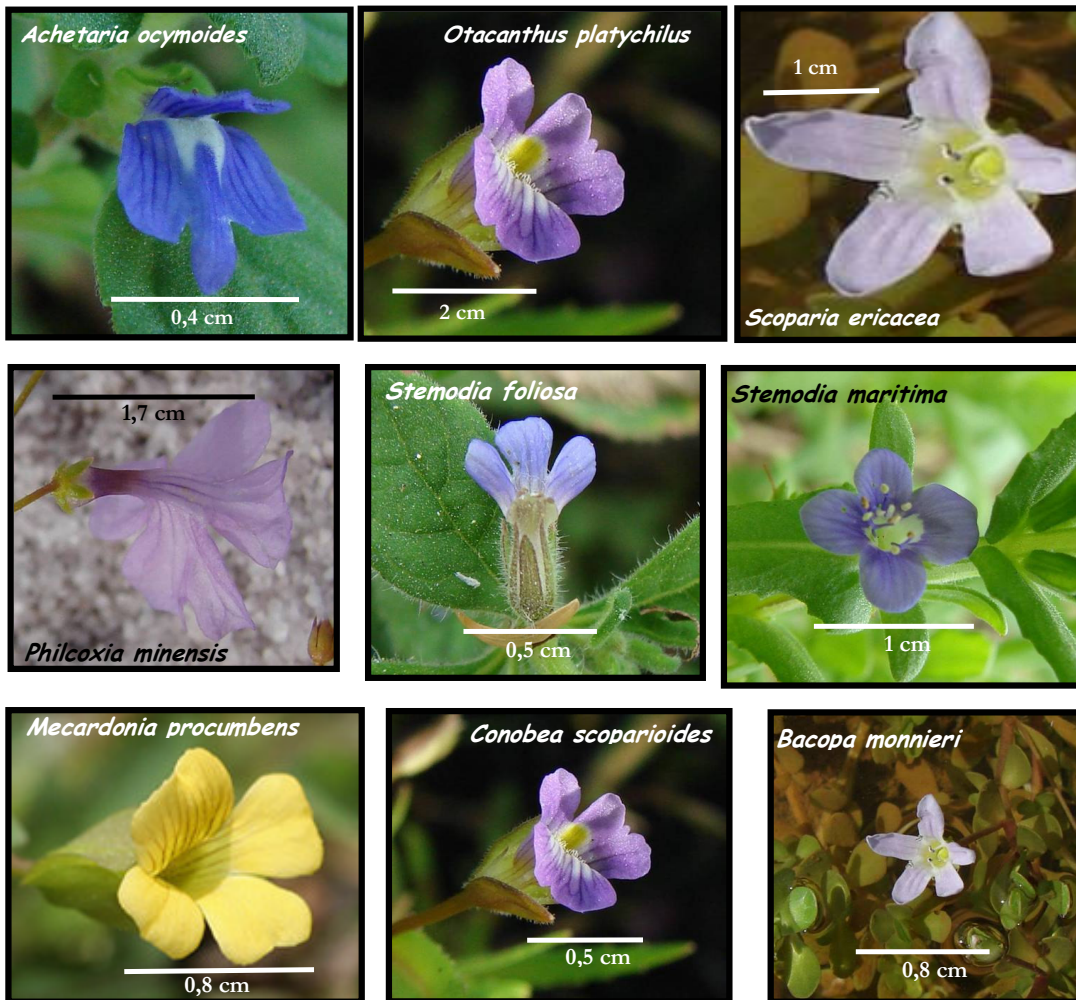


Cristiane Del Nero Rodrigues

Filogenia molecular de Lamiales, com ênfase em espécies nativas de Gratiolaceae



São Paulo

2009

Cristiane Del Nero Rodrigues

Filogenia molecular de Lamiales, com
ênfase em espécies nativas de
Gratiolaceae

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Botânica.

Orientador: Antonio Salatino

São Paulo

2009

Rodrigues, Cristiane Del Nero
Filogenia molecular de Lamiales, com
ênfase em espécies nativas de Gratiolaceae.
84 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Botânica.

1. Gratiolaceae 2. Filogenia molecular
3. Lamiales 4. Scrophulariaceae I.
Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof Dr. Antonio Salatino
Orientador

ÍNDICE

I. Introdução.....	01
1. Sistemática Molecular.....	01
1.1 Métodos filogenéticos em sistemática molecular.....	02
2. Scrophulariaceae	06
2.1 Scrophulariaceae no Brasil.....	07
3. Posicionamento de <i>Gratiolaceae</i> em <i>Scrophulariaceae s.l.</i>	07
3.1 Sistemática molecular, taxonomia e quimiotaxonomia de <i>Gratiolaceae</i>	09
II. Material e Métodos.....	13
1. Material.....	13
2. Métodos.....	19
2.1 Sequenciamento de DNA.....	19
III. Resultados e Discussão.....	23
1. Comentários sobre <i>Gratiolaceae</i> e sua posição na filogenia de Lamiales.....	23
2. Comentários sobre os gêneros de <i>Gratiolaceae</i> e sua posição na filogenia da família.....	44
3. Comentários sobre o grau de polimorfismo molecular entre os indivíduos da mesma espécie.....	51
IV. Conclusões.....	54
V. Resumo.....	55
VI. Abstract.....	57
VII. Anexos.....	59
Anexo 1 - Edição de sequências através do Bioedit.....	59
Anexo 2 - Análise de parcimônia pelo Paup em "Windows"	62
Anexo 3 - Teste de congruência (ILD).....	67
Anexo 4 - Análise bayesiana em "Windows".....	70
Anexo 5 - Edição das árvores pelo Tree Graph.....	75
VIII. Referências Bibliográficas.....	79

I. INTRODUÇÃO

1. Sistemática Molecular

Em passado relativamente recente, sistemas de classificação de angiospermas foram criados, procurando incorporar caracteres de todas as fontes até então disponíveis, como morfologia, anatomia, ultra-estrutura, fisiologia, bioquímica, citologia, palinologia e química (Judd *et al.* 1999). Exemplos de tais sistemas "enciclopédicos" são os de Cronquist (1981), Dahlgren *et al.* (1985) e Takhtajan (1991). Na atualidade, os resultados de todo esse esforço têm apenas interesse histórico (com exceção de alguma contribuição nomenclatural), devido ao enorme impacto imposto pelo uso combinado de evidências moleculares e métodos da sistemática filogenética. A obtenção de informações sobre evidências moleculares foi viabilizada pela introdução de tecnologia que tornou possível o sequenciamento de segmentos de DNA. Os métodos de análise filogenética foram introduzidos em época que antecedeu as conquistas da biologia molecular aplicadas à taxonomia; mas a sua aplicação na análise de evidências moleculares foi decisiva para que se chegasse à metodologia atualmente empregada em sistemática molecular. A análise do enorme volume de informações moleculares, segundo os critérios da sistemática filogenética, tornou-se exequível graças aos contínuos avanços na tecnologia de computação, com a conquista de sistemas que abreviam cada vez mais o tempo de análise de grandes volumes de dados. O que se conseguiu com a combinação desse conjunto de tecnologias foi a criação de um novo critério para o estabelecimento de filogenias de organismos, assumido como o que de melhor se conseguiu até agora dos pontos de vista de objetividade, adequação metodológica e amplitude de base de dados. Com isso, assume-se que temos atualmente a possibilidade de conseguir robustez em nossas análises. A aplicação desses métodos em filogenia e classificação constitui o que comumente se denomina sistemática molecular.

O acúmulo de dados moleculares culminou na criação do sistema APG (Angiosperm Phylogeny Group). A versão impressa mais recente é o APG II (APG 2003), baseado na combinação de sequências de regiões de DNA nuclear e do cloroplasto. Entretanto, o site <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/> periodicamente faz atualizações do sistema APG.

O uso de caracteres moleculares viabilizou reconstruções filogenéticas antes impensáveis, como a comparação entre organismos de reinos distintos. O melhor exemplo é a

ambiciosa construção da "árvore da vida", baseada em sequências de RNA ribossômico (Doolittle 1999, Lecointre & Le Guyader 2006). Caracteres fenotípicos são escassos para comparações em níveis acima de família. Por essa razão, antes do advento da filogenia molecular, era muito difícil o estabelecimento de afinidades entre ordens, por exemplo, o que representava uma fonte de infinitas controvérsias entre os propositores de sistemas gerais de classificação de angiospermas. Os caracteres moleculares possibilitam o estabelecimento de relacionamentos consistentes entre grupos em qualquer nível de hierarquia. Os grupos terminais no sistema de classificação APG (APG 1998, 2003) têm nível de ordem, o que propicia a construção de um cladograma de todas as angiospermas com um número de terminais facilmente apreensível numa rápida análise.

Nas angiospermas, é possível a utilização de sequências de regiões do DNA de três genomas: mitocondrial, nuclear e plastídeos (Judd *et al.* 1999). O genoma mais amplamente utilizado em filogenia de angiospermas é o do cloroplasto. Exemplos de regiões transcritas que vem sendo amplamente utilizadas são *rbcL* (Chase *et al.* 1993, Olmstead & Reeves 1995, Asmussen & Chase 2001), *atpB* (Hahn 2002), *ndhF* (Olmstead & Reeves 1995) e *matK* (Gravendeel *et al.* 2001). Regiões não-transcritas, como íntrons e espaçadores, também são comumente usadas em filogenia, como *trnL-F* (que corresponde ao íntron *trnL* e o espaçador *trnL-F*) (Wallander & Albert 2000, Salatino *et al.* 2001, Ronsted *et al.* 2002, Albach *et al.* 2005), *atpB-rbcL* (Gonçalves *et al.* 2007), *trnD-T* e *trnQ-rps16* (ambas regiões analisadas por Hahn 2002) e *rps16* (Albach & Chase 2004). Marcadores do genoma mitocondrial são mais utilizados nos trabalhos de filogenia animal, mas também são utilizados para as filogenias de plantas como: NAD (Dumolin-Lapéque *et al.* 1998) e outros.

1.1 Métodos Filogenéticos em Sistemática Molecular

Para o estabelecimento de relações entre táxons em qualquer nível hierárquico, desde espécies até ordens, é possível o emprego de métodos filogenéticos, distintos entre si devido ao critério em que se baseiam. Quatro métodos vem sendo empregados em sistemática molecular: métodos de distância (UPGMA - "Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean" e NJ - "Neighbor joining"), máxima parcimônia, máxima verossimilhança ("maximum likelihood", ou ML) e análise bayesiana.

Os métodos de distância (ou agrupamento) UPGMA e NJ são métodos algorítmicos, isto é, métodos que usam cálculos específicos para o estabelecimento de relações entre as unidades taxonômicas operacionais (UTO, ou seja, os táxons ou organismos sob análise). O cálculo envolve a manipulação da matriz obtida pelo alinhamento múltiplo das sequências de bases do DNA. Com base nesse alinhamento, ambos os programas calculam para cada par de UTOs um valor de distância (de 0 a 1) entre duas sequências (Hall 2001). O método UPGMA assume que a árvore é ultramétrica, ou seja, que todas as UTOs tenham a mesma distância em relação à raiz da árvore. O método NJ é semelhante ao UPGMA na manipulação da matriz para o cálculo de distâncias entre as UTOs, iniciando com a formação de grupos com a menor distância. Esse método difere do UPGMA, entre outras razões, por não assumir que todos os terminais apresentem a mesma distância da raiz (Hall 2001). Os métodos de distância são raramente empregados em sistemática molecular baseada em sequências de DNA.

Os métodos de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e bayesiana partem também de uma matriz obtida com o alinhamento múltiplo de sequências, comparando os estados de caracteres em cada coluna da matriz. Cada sítio no alinhamento é um caráter e cada caráter pode apresentar diferentes estados (A, C, G e T, no caso de sequências de DNA) em táxons diferentes. Esses métodos são amplamente empregados em sistemática molecular. A máxima parcimônia baseia-se na hipótese de que a melhor árvore é aquela que requer o menor número de passos para explicar os estados de caracteres observados no alinhamento. A premissa básica da máxima parcimônia é que táxons compartilham estados de caracteres em comum (sinapomorfias), porque eles herdam essas características de ancestrais comuns. Havendo conflitos nessa premissa (as homoplasias), admite-se que elas derivam de reversões (ocorreu uma mudança na característica, mas ela reverte para o estado ancestral), convergências (táxons oriundos de distintos ancestrais acabam compartilhando o mesmo estado de um caráter) ou paralelismos (táxons não relacionados podem ter uma predisposição ao desenvolvimento de certas características, independentemente, portanto de herança de um ancestral comum).

Nem todos os caracteres são úteis na construção da árvore mais parcimoniosa. Caracteres invariáveis são aqueles que apresentam o mesmo estado em todos os táxons, sendo ignorados pelo método. Os caracteres que apresentam variação de estado em apenas um táxon são caracteres variáveis, mas não informativos e, portanto, inúteis filogeneticamente. Desse modo, somente caracteres variáveis e informativos são úteis em máxima parcimônia.

A máxima parcimônia seleciona a árvore ou árvores que minimizam o número de passos evolutivos, incluindo as homoplasias. Para a obtenção dessas árvores podem-se utilizar três tipos

de buscas: exaustiva, "branch-and-bound" e heurística. Na busca exaustiva todas as árvores são analisadas; entretanto, essa busca só é possível com matrizes contendo até dez terminais. A busca "branch-and-bound" permite encontrar a(s) melhor(es) árvore(s), sem necessidade de pesquisar todas as árvores possíveis. Nessa busca, adicionam-se terminais (UTOs) segundo diversas combinações; quando uma nova combinação necessita de mais passos que a anterior, descarta-se o último caminho e prossegue-se a partir da combinação anterior. Apesar de ser alternativa útil de busca, o algoritmo "branch-and-bound" é também limitado pelo número de terminais. Quando se tem uma grande quantidade de terminais a única busca exequível é a heurística, que utiliza um algoritmo "morro acima", no qual uma árvore inicial é selecionada e rearranjos são feitos nela árvore. Essa busca não garante encontrar-se a melhor árvore. Para obterem-se inferências filogenéticas baseadas no método da máxima parcimônia, emprega-se o programa PAUP (Swofford 2002).

O método ML, também implementado no programa PAUP, tenta estabelecer a filogenia, ou caminho evolutivo, que maximiza a probabilidade de se chegar à matriz construída com o alinhamento múltiplo. Com os estados de caracteres observados na matriz de seqüências de DNA, o método calcula as probabilidades de acordo com um determinado modelo evolutivo, que deve ser previamente estabelecido. Os modelos evolutivos são obtidos por meio de programas que analisam a frequência dos nucleotídeos (estados de caracteres) na matriz e diz qual o modelo mais condizente com o alinhamento obtido. O programa mais utilizado é o MrModeltest (Nylander 2004). São utilizados basicamente seis modelos para seqüências de DNA: JC (Jukes Cantor), F81 (Felsenstein), K80 (Kimura), HKY85, SYM e GTR ("General Time-Reversible"). Alguns modelos fazem distinção entre transições e reversões, outros não. Nesses modelos ainda podemos encontrar mais duas variáveis: I e G. I indica que existe uma proporção substancial de bases invariáveis e G indica que está sendo utilizada uma distribuição gama para considerar a variação da razão entre as bases. Como há seis modelos (JC, F81, K80, HKY, SYM e GTR) que podem não ter variáveis I e G, ou ter uma delas (I ou G) ou ambas (I + G), segue-se que o total de modelos evolutivos possíveis é 24 (Posada 2003).

A ML sempre produz uma única árvore. De modo semelhante à máxima parcimônia, em ML também há busca heurística para obtenção da melhor árvore. Também como em máxima parcimônia, a árvore obtida em ML pode não corresponder à que apresenta a máxima verossimilhança. Uma desvantagem da ML é que sua análise é mais lenta que a da máxima parcimônia, requerendo tempo computacional muito maior.

O emprego da estatística bayesiana em filogenia é o método mais recente em sistemática molecular. Trata-se de uma variante do método ML. A análise bayesiana é similar ML porque ela requer o estabelecimento de um modelo evolutivo e o programa procura as melhores árvores que são consistentes com o modelo e com a matriz de sequências. Os modelos evolutivos são os mesmos utilizados em ML. O método bayesiano é baseado na idéia de probabilidades posteriores, isto é, a probabilidade é estimada, baseando-se em algum modelo (probabilidade *a priori*) depois de ter incorporado alguma coisa sobre os seus dados (probabilidade posterior).

As inferências filogenéticas baseadas em análise bayesiana são realizadas com o programa MrBayes (Hall 2001), que utiliza o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MMC). O método realiza buscas independentes, que ocasionalmente trocam informações. Essa busca permite que ocasionalmente salte um vale, um evento que não ocorre no método da máxima parcimônia nem em ML. O produto final na análise bayesiana é um grupo de árvores que o programa visitou repetidamente, aumentando a probabilidade de se chegar às árvores ótimas (que estão no "topo da montanha"). Assim, em vez de construir uma árvore com a máxima probabilidade, a análise bayesiana produz um grupo de árvores que apresentam aproximadamente a mesma probabilidade. Na busca, as árvores com menor probabilidade são eliminadas. Após eliminar essas árvores, faz-se um consenso de maioria das demais árvores. A análise bayesiana é mais fácil de ser interpretada, pois a frequência com que um determinado clado aparece no grupo de árvores é assumida como a sua probabilidade (o suporte do clado na filogenia).

Os métodos que vêm sendo mais empregados recentemente em sistemática molecular são a máxima parcimônia e a análise bayesiana. Apesar de serem métodos baseados em critérios muito distintos, resultados com alta congruência têm sido obtidos com uma mesma matriz de dados (Prado *et al.* 2007, Feldberg *et al.* 2009, Feng *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2009). Isso é uma evidência da robustez dos métodos usados em sistemática molecular.

A sistemática molecular parece ser isenta de fragilidades, como subjetividade na seleção de caracteres e no julgamento de suas mudanças de estado e carência de metodologias suficientemente poderosas. Há que se levar em conta, porém, que, após a obtenção das sequências de DNA dos organismos sob análise, elas precisam ser alinhadas. Com grande frequência, principalmente quando se utilizam regiões não-codificantes, um grande número de inserções e deleções que se acumularam no curso da evolução dificultam sobremaneira a tarefa de obtenção do alinhamento múltiplo. Pode-se dizer que essa fase é o "calcanhar de Aquiles" na metodologia da sistemática molecular. Dado um conjunto de seqüências de DNA, é possível que duas pessoas cheguem a distintos alinhamentos múltiplos (a distintas matrizes). Dependendo do grau de

distinção entre essas matrizes, pode-se chegar a filogenias mais ou menos distintas. Os alinhamentos podem ser realizados a mão ou com auxílio de programas de computador; após a obtenção do alinhamento por computador, pode-se fazer uma otimização manual. No alinhamento local, subseqüências das seqüências são alinhadas sem se preocupar com o padrão global das seqüências (Morgenstern 2009). Um programa que foi amplamente utilizado no começo foi o programa ClustalW, um programa de alinhamento global (Morgenstern 2009). O alinhamento global assume que a totalidade das seqüências é seqüencialmente homóloga e tenta alinhar todas as bases; isto é, o alinhamento está relacionado ao comprimento total da seqüência, tendendo a inserir menos inserções ("gaps") que os programas de alinhamento local. As inserções são colocadas para que todas as seqüências apresentem um mesmo comprimento. Buscas heurísticas podem ser usadas para calcular o ótimo de alinhamentos múltiplos (Morgenstern 2009).

2. Scrophulariaceae

O histórico da classificação das Scrophulariaceae inclui grande diversidade de tratamentos que diferem entre si na delimitação da família (Olmstead & Reeves 1995). Várias classificações contemporâneas derivam diretamente do tratamento proposto por Bentham (1846, 1876), que reconheceu três subfamílias: Pseudosolaneae, Antirrhinoideae (Scrophularioideae) e Rhinanthoideae. Após os trabalhos de Bentham (1846, 1876), diversas alterações foram propostas, mas geralmente com pequena receptividade, como a inclusão de Orobanchaceae, Globulariaceae, Selaginaceae, Plantaginaceae e Lentibulariaceae em Scrophulariaceae (Hallier 1903, Melchior 1964, Barringer 1993, Olmstead *et al.* 2001).

Entre as famílias reconhecidas em Lamiales (*sensu* APG 2003), Scrophulariaceae encontra-se entre os grupos que certamente incorporam as alterações mais significativas propostas em trabalhos recentes sobre filogenia (Bremer *et al.* 2002, Albach *et al.* 2005, Oxelman *et al.* 2005, Rahmzadeh *et al.* 2005, Tank *et al.* 2006, Souza (comunicação pessoal)).

Uma das primeiras filogenias moleculares de Scrophulariaceae *s.l.* (Olmstead e Reeves 1995) baseou-se em duas regiões do cloroplasto (*rbcL* e *ndhF*), resultando em dois clados para Scrophulariaceae, indicando que a família é polifilética. O primeiro clado, denominado "scroph I", contém *Buddleja*, *Celsia*, *Nicodemia*, *Scrophularia*, *Selago* e *Verbascum* e vem sendo tratado como Scrophulariaceae *s.s.* (Judd *et al.* 1999). O segundo clado, "scroph II", inclui *Antirrhinum*, *Digitalis*, *Veronica* e representantes de Callitrichaceae, Hippuridaceae e Plantaginaceae, e vem sendo chamado de Plantaginaceae (Judd *et al.* 1999, Oxelman *et al.* 2005; Albach *et al.* 2005).

Trabalhos posteriores (Olmstead *et al.* 2001, Albach *et al.* 2005, Oxelman *et al.* 2005) também evidenciaram grupamentos semelhantes, consolidando uma nova delimitação para Plantaginaceae.

2.1 Scrophulariaceae no Brasil

Os primeiros estudos taxonômicos de Scrophulariaceae no Brasil são os da Flora Brasiliensis (Schmidt 1862), compreendendo os tratamentos taxonômicos pioneiros e completos das espécies brasileiras da família. Posteriormente, Barroso (1952) realizou novo levantamento das espécies nativas e cultivadas de Scrophulariaceae do Brasil. Mais recentemente, Souza (1996) atualizou o levantamento das espécies nativas, propondo o reconhecimento de três novos gêneros, dez novas espécies e dezesseis novas combinações, ressaltando que diversos pontos sobre as Scrophulariaceae deveriam ser investigados em maior profundidade, incluindo aspectos referentes ao parasitismo e às relações entre gêneros próximos.

Embora seja uma família bem representada no Brasil, com cerca de 30 gêneros e 150 espécies (Souza, 1996), apenas os gêneros brasileiros que apresentam distribuição geográfica mais ampla têm sido incluídos em análises filogenéticas, de tal forma que nessas análises não figuram gêneros endêmicos deste país, como *Anamaria*, *Nothochilus*, *Physocalyx*, *Tetraulacium*, ou gêneros importantes por sua representatividade na flora nativa, como *Esterhazyia* e *Mecardonia*.

3. Posicionamento de Gratiolaceae em Scrophulariaceae *s.l.*

Albach *et al.* (2005) analisaram Plantaginaceae, baseando-se em quatro marcadores, sendo um do genoma nuclear (ITS) e três do genoma mitocondrial (íntron *matk-trnK*, íntron *rps16* e *trnL-trnL-F*). Com base na filogenia e comparando com a classificação proposta por Wettstein (1895 *apud* Albach *et al.* 2005), Albach *et al.* propuseram a divisão de Plantaginaceae em diversas tribos: Angelonieae, Antirrhineae, Callitricheae, Cheloneae, Digitalideae, Globularieae, Gratiolaeae, Hemiphragmeae, Plantagineae, Russelieae, Sibthorpia e Veroniceae (Albach *et al.* 2005, Tabela 01).

Tabela 1. Lista de gêneros incluídos em três tribos de Plantaginaceae, segundo Albach *et al.* (2005).

Tribo	Tribo
Gênero	Gênero
Gratiolleae	
<i>Achetaria</i>	<i>Limnophila</i>
<i>Adenosma</i>	<i>Limosella</i>
<i>Ambulia</i>	<i>Mecardonia</i>
<i>Amphianthus</i>	<i>Morgania</i>
<i>Artanema</i>	<i>Otacanthus</i>
<i>Bacopa</i>	<i>Scoparia</i>
<i>Bryodes</i>	<i>Stemodia</i>
<i>Bythophyton</i>	Plantagineae
<i>Dyzygostemon</i>	<i>Aragoa</i>
<i>Dodartia</i>	<i>Plantago</i> (incluindo <i>Littorella</i>)
<i>Dopatrium</i>	
<i>Encopella</i>	Angelonieae
<i>Geochorda</i>	<i>Angelonia</i>
<i>Gratiola</i>	<i>Basistemom</i>
<i>Hydrathelium</i>	<i>Melosperma</i>
<i>Hydrotriche</i>	<i>Monttea</i>
<i>Ildefonsia</i>	<i>Monopera</i>
<i>Tetraulacium</i>	<i>Ourisia</i>

Estudando diversos grupos de Scrophulariaceae *s.l.*, Rahmanzadeh *et al.* (2005) sequenciaram duas regiões do cloroplasto, o íntron *trnK* e o gene *matK*. Com o objetivo de verificar o posicionamento de *Lindernia* e gêneros próximos, esses autores incluíram três espécies da tribo Gratiolleae. Verificaram tratar-se de duas linhagens isoladas e, assim, sugeriram o tratamento desses dois cladogramas como duas famílias independentes: Linderniaceae e Gratiolaceae. O tratamento dado a Gratiolaceae é questionado pelo sistema APG (<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/>), uma vez que a proposta baseou-se em estudo com estreita base amostral.

Um trabalho mais recente envolvendo espécies pertencentes a Gratiolaceae (Estes & Small 2008), verificou o posicionamento de *Amphianthus* (gênero monoespecífico), baseando-se em dois marcadores do genoma mitocondrial: *ndhF* e *trnS-trnG-trnG*. Observou-se que *Amphianthus* se posicionou dentro do clado de *Gratiola*, sendo proposta sua inclusão como sinônimo de *Gratiola*.

A sustentação de Gratiolaceae como família independente foi evidenciada em estudo de Souza *et al.* (comunicação pessoal), com base em sequências de duas regiões do cloroplasto, *rbcL* e *trnL-trnL-trnL-F*.

3.1 Sistemática molecular, taxonomia e quimiotaxonomia de Gratiolaceae

Independentemente do nível hierárquico atribuído a Gratiolaceae (Gratiolaceae) (tribo: Olmstead e Reeves 1995, Olmstead *et al.* 2001, Oxelman *et al.* 2005, Albach *et al.* 2005, Estes e Small 2008; ou família: Rahmzadeh *et al.* 2005 e Souza *et al.* (comunicação pessoal)), o grupo invariavelmente emerge nas filogenias como monofilético. O número de representantes da tribo (família) incluído nessas pesquisas é aparentemente insuficiente para prover segurança quanto ao nível hierárquico a ser atribuído ao grupo. A pesquisa realizada até agora sobre o grupo com amostragem mais ampla foi a de Souza *et al.* (comunicação pessoal, Figura 1), que sugere a adequação de se reconhecê-lo em nível de família, excluindo dele o gênero *Capraria*. Diversas pendências permanecem sem solução, incluindo principalmente o fato de *Stemodia* ser parafilético, diversas de suas espécies agrupando-se com outros gêneros de Gratiolaceae (Souza *et al.* comunicação pessoal, Figura 1). Tudo isso torna as delimitações de gêneros pouco claras, uma circunstância que é agravada pelo fato de que diversas espécies ainda não foram incluídas nas análises. A divisão de *Stemodia* em diversos outros gêneros já havia sido proposta por Minod (1918), baseando-se principalmente na estrutura do gineceu. Esse tópico não foi ainda suficientemente investigado, levando-se em conta os gêneros que agora incluiriam espécies de *Stemodia*.

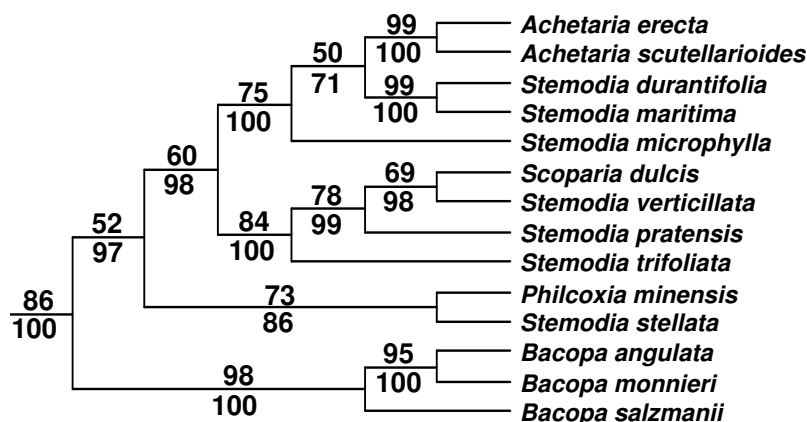


Figura 01 - Árvore parcial da análise baseada em sequências de *rbcL* (Souza *et al.* (comunicação pessoal)) em máxima parcimônia e análise bayesiana, incluindo representantes de Gratiolaceae. Dígitos acima e abaixo dos ramos correspondem a valores de "bootstrap" e probabilidades posteriores, respectivamente.

Baseando-se em caracteres morfológicos, Fischer (2004 *apud* Rahmanzadeh *et al.* 2005) reconhece em Gratiolaceae 32 gêneros, agrupados em três tribos: Gratiolleae, Stemodieae e Limoselleae (Tabela 02). Duas tribos apresentam espécies brasileiras: Gratiolleae, com dezesseis gêneros, seis deles com espécies brasileiras (*Bacopa*, *Capraria*, *Gratiola*, *Mecardonia*, *Philcoxia* e *Scoparia*), e Stemodieae, com quinze gêneros, seis deles com espécies brasileiras (*Achetaria*, *Conobea*, *Dizygostemon*, *Otacanthus*, *Stemodia* e *Tetraulacium*).

Tabela 2 - Classificação de Gratiolaceae segundo Rahmanzadeh *et al.* (2005), baseada na classificação de Fisher.

Tribo	Tribo
Gênero	Gênero
Gratiolleae	Stemodieae
<i>Amphianthus</i>	<i>Achetaria</i>
<i>Bacopa</i>	<i>Adenosma</i>
<i>Benjaminia</i>	<i>Cheilophyllum</i>
<i>Boelckea</i>	<i>Conobea</i>
<i>Braunblanquetia</i>	<i>Darcya</i>
<i>Capraria</i>	<i>Dizygostemon</i>
<i>Deinostema</i>	<i>Leucospora</i>
<i>Dopatrium</i>	<i>Lindenbergia</i>
<i>Gratiola</i>	<i>Morgania</i>
<i>Hydrotriche</i>	<i>Otacanthus</i>
<i>Limnophila</i>	<i>Schistophragma</i>
<i>Maeviella</i>	<i>Schizosepala</i>
<i>Mecardonia</i>	<i>Stemodia</i>
<i>Philcoxia</i>	<i>Stemodiopsis</i>
<i>Scoparia</i>	<i>Tetraulacium</i>
<i>Sophronanthe</i>	Limoselleae
	<i>Limosella</i>

Diversos trabalhos baseados em dados macromoleculares mostraram que *Capraria* não é membro de Gratiolaceae (Oxelman *et al.* 2005, Tank *et al.* 2006, Souza comunicação pessoal). A distribuição de espécies dessa família no Brasil é bem ampla, abrangendo todos os estados. Em geral, os indivíduos são ervas de locais úmidos, como beira de riachos, sombras de rochas ou solo arenoso (Souza 1996).

Considerando apenas os gêneros que ocorrem no Brasil, tem-se a seguinte lista (número de espécies entre parênteses): *Achetaria* (4), *Bacopa* (26), *Conobea* (4), *Dizygostemon* (1), *Gratiola* (1), *Mecardonia* (4), *Otacanthus* (4), *Philcoxia* (3), *Scoparia* (6), *Stemodia* (14), *Tetraulacium* (1). Dentre os onze gêneros com ocorrência no Brasil, três são restritos ao território brasileiro: *Dizygostemon* e *Tetraulacium* (monoespecíficos e restritos ao nordeste do

Brasil) e *Philcoxia* (com ocorrência em três estados: Bahia, Goiás e Minas Gerais). *Stemodia* e *Bacopa* são os gêneros com maior número de espécies (Souza 1996).

Nem todos os gêneros apresentam espécies com nomes vulgares; os que apresentam são listados a seguir: *Bacopa* (*B. sessiliflora* - pataqueira, *B. aquatica* - comida-de-tracajá, bacopá), *Conobea* (*C. aquatica* - pataqueira, vassourinha-d'água, vassourinha-do-brejo; *C. scoparioides* - pataqueira, vassourinha-do-brejo), *Otacanthus* (*O. coeruleus* - incenso), *Scoparia* (*S. dulcis* - vassourinha, vassourinha-de-botão, vassourinha-doce), *Stemodia* (*S. maritima* - meladinha; *S. stricta* - meladinha-ereta; *S. durantifolia* - meladinha-verdadeira, paracari; *S. foliosa* - meladinha; *S. trifoliata* - meladinha-de-três-folhas; *S. verticillata* - meladinha-anã) (Souza 1996).

Baseando-se na morfologia, é difícil definir Gratiolaceae, mas algumas características ajudam a separá-las de outras Scrophulariaceae *s.l.* (Rahmanzadeh *et al.* 2005). Os caracteres mais importantes são do óvulo e da anatomia da semente. As camadas intermediárias do indumento do óvulo são formadas por 1-3 células endoteliais e estão arranjadas em 6-8 colunas longitudinais, grandes e transversalmente alongadas que se espessam somente em direção ao endosperma. O endosperma da semente madura é liso ou sulcado, as sementes apresentam ranhuras longitudinais, e as células da testa mostram-se como ganchos de paredes espessadas (Rahmanzadeh *et al.* 2005).

Grayer *et al.* (1999) caracterizam quimicamente as Scrophulariaceae *s.l.* pela presença de iridóides, a tendência de produzir flavonas 6- e/ou 8-hidroxiladas, a presença de verbascosídeo e a presença de ácidos caféicos conjugados. Os trabalhos de Ramesh *et al.* (1979), Grayerbarkmeijer & Tomasbarberan (1993) e Proliac *et al.* (1991) analisaram quatro espécies: *Scoparia dulcis*, *Stemodia viscosa*, *Gratiola officinalis* e *Bacopa monnieri*, encontrando principal ou exclusivamente a presença de flavonas, algumas delas 6- e/ou 8-hidroxiladas.

O número de trabalhos abordando Gratiolaceae é escasso. Devido a isso, na revisão de Scrophulariaceae *s.l.* de Tank *et al.* (2006) poucos comentários puderam ser feitos sobre Gratiolaceae, com a menção de que esse é um dos grupos de Scrophulariaceae *s.l.* com menos estudos. Os autores comentam que gêneros anteriormente incluídos em Gratiolaceae são agora posicionados em outras famílias: *Melosperma* e *Monttea* em Plantaginaceae, Angelonieae; *Artanema*, *Craterostigma*, *Crepidiorhopalon*, *Lindernia*, *Micranthemum*, *Picria*, *Stemodiopsis* e *Torenia* em Linderniaceae; *Capraria* e *Limosella* em Scrophulariaceae *s.s.* e *Lindenbergia* em Orobanchaceae. Os únicos gêneros, com poucos ou apenas um terminal, que foram incluídos em filogenias moleculares e mantidos em Gratiolaceae foram: *Amphianthus*, *Bacopa*, *Gratiola*, *Mecardonia*, *Otacanthus*, *Scoparia* e *Stemodia*.

Uma vez que há poucos estudos sobre delimitação de *Gratiolaceae* em nível de família e gênero, e que o número de táxons estudados do ponto de vista filogenético até o momento é muito pequeno, esta tese tem como objetivo realizar uma inferência filogenética envolvendo a família, incluindo o maior número possível de espécies neotropicais. Foram selecionados três marcadores para fins de análise filogenética: as regiões NAD (mitocondrial), *trnL-trnL-trnL-F* e *rps16* (ambas do cloroplasto).

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

Exsicatas do material coletado foram depositadas nos Herbários SPF (Instituto de Biociências, USP) e ESA (ESALQ, USP). Diversos estados do Brasil foram visitados para coleta de material suficiente para cobrir a ampla distribuição de *Gratiolaceae* no Brasil. A Tabela 3 apresenta uma lista de espécies da ordem Lamiales analisadas, incluindo espécies de *Gratiolaceae* e de outras famílias, com vistas ao estabelecimento de relações de *Gratiolaceae* com famílias próximas. Para fins de análise filogenética, foi escolhido como grupo externo *Olea europaea*: *Oleaceae*, *Plocospermataceae* e *Tetrachondraceae* estão na base de Lamiales, segundo o site do APG (www.mobot.org/mobot/research/apweb/welcome.html). Algumas espécies tiveram de ser verificadas pelo site do APG (www.mobot.org/mobot/research/apweb/welcome.html), modificando apenas o grau hierárquico de tribo para família (*Gratiioleae* - *Gratiolaceae*).

Tabela 3 - Lista de espécies de Gratiolaceae utilizadas em inferência filogenética baseada em sequências de bases de DNA. São apresentados os respectivos números de coletores (V.C.Souza - Vinícius Castro e Souza, C.D.N.Rodrigues - Cristiane Del Nero Rodrigues). Sequências do Genbank utilizadas apresentam respectivos números de acesso e referências bibliográficas. (* - No Genbank a sequência foi depositada como *M. flagellaris*, mas neste trabalho é tratada como *M. procumbens* var. *flagellaris*)

Família Espécies	Coletor e o nº. de coleta	No. de acesso do Genbank <i>trnL-trnL-F</i>	No. de acesso do Genbank <i>rps16</i>	Referência
Gratiolaceae				
<i>Achetaria erecta</i> (Spreng.) Wettst.	V.C.Souza 28935			
<i>Achetaria ocymoides</i> (Cham. &Schltdl.) Wettst. (A)	C.D.N.Rodrigues 103			
<i>Achetaria ocymoides</i> (Cham. &Schltdl.) Wettst. (B)	V.C.Souza 32002			
<i>Achetaria scutellarioides</i> (Benth) Wettst. (A)	C.D.N.Rodrigues 73			
<i>Achetaria scutellarioides</i> (Benth) Wettst. (B)	C.D.N.Rodrigues 80			
<i>Achetaria scutellarioides</i> (Benth) Wettst. (C)	V.C.Souza 26028			
<i>Bacopa angulata</i> (Benth.) Edwall	V.C.Souza 28716			
<i>Bacopa aquatica</i> Aubl.	V.C.Souza 28715			
<i>Bacopa eisenii</i> (Kellogg) Pennell		EF467888		Fritsch <i>et al.</i> 2007
<i>Bacopa gratiolooides</i> (Cham.) Edwall (A)	C.D.N.Rodrigues 64			
<i>Bacopa gratiolooides</i> (Cham.) Edwall (B)	V.C.Souza 29900			
<i>Bacopa monnieri</i> (L.) Pennell (A)	V.C.Souza 28954			
<i>Bacopa monnieri</i> (L.) Pennell (B)	V.C.Souza 32001			
<i>Bacopa monnieri</i> (L.) Pennell (C)		AY492170	AY492196	Albach <i>et al.</i> 2005
<i>Bacopa monnierioides</i> (Cham.) Robinson	C.D.N.Rodrigues 90			
<i>Bacopa myriophylloides</i> (Benth.) Wettst.	V.C.Souza 32412			
<i>Bacopa reptans</i> (Benth.) Wettst. ex Edwall (A)	V.C.Souza 32457			
<i>Bacopa repens</i> (Sw.) Wettst. (B)		EF467887		Fritsch <i>et al.</i> 2007
<i>Bacopa salzmanii</i> (Benth.) Wettst. (A)	V.C.Souza 26766			
<i>Bacopa salzmanii</i> (Benth.) Wettst. (B)	V.C.Souza 28771			
<i>Bacopa scabra</i> var. <i>laxiflora</i> (Benth.) V.C.Souza	V.C.Souza 32461			
<i>Bacopa stricta</i> (Schrad.) Wettst.	C.D.N.Rodrigues 111			

Tabela 3 - (Continuação)

Família Espécies	Coletor e o nº. de coleta	No. de acesso do Genbank <i>trnL-trnL-F</i>	No. de acesso do Genbank <i>rps16</i>	Referência
Gratiolaceae				
<i>Conobea multifida</i> Benth.		AJ608597		Oxelman <i>et al.</i> 2005
<i>Conobea scoparioides</i> (Cham. & Schlttdl.)	V.C.Souza 30718			
<i>Dopatrium junceum</i> (Roxb.) Buch.-Ham. ex Benth.		EF467885		Fritsch <i>et al.</i> 2007
<i>Gratiola brevifolia</i> Raf.			AY727441	Shaw <i>et al.</i> 2005
<i>Gratiola neglecta</i> Torr.			AY727433	Shaw <i>et al.</i> 2005
<i>Gratiola pilosa</i> Michx.		AJ608591	AJ609182	Oxelman <i>et al.</i> 2005
<i>Gratiola virginiana</i> L.			AY727445	Shaw <i>et al.</i> 2005
<i>Hydrotriche hottoniiflora</i> Zucc.		EF467886		Fritsch <i>et al.</i> 2007
<i>Limnophila x ludoviciana</i> Thieret		EF467890		Fritsch <i>et al.</i> 2007
<i>Mecardonia procumbens</i> (Mill.) Small var. <i>procumbens</i> (A)	C.D.N.Rodrigues 25			
<i>Mecardonia procumbens</i> (B)	V.C.Souza 32387			
<i>Mecardonia procumbens</i> (Mill.) Small var. <i>procumbens</i> (C)	V.C.Souza 32146			
<i>Mecardonia procumbens</i> (Mill.) Small var. <i>procumbens</i> (D)	V.C.Souza 32008			
<i>Mecardonia procumbens</i> (Mill.) Small (E)		AY492184	AY492215	Albach <i>et al.</i> 2005
<i>Mecardonia procumbens</i> var. <i>caespitosa</i> (Cham.) V.C.Souza (A)	C.D.N.Rodrigues 24			
<i>Mecardonia procumbens</i> var. <i>caespitosa</i> (Cham.) V.C.Souza (B)	V.C.Souza 32094			
<i>Mecardonia procumbens</i> var. <i>tenella</i> (Cham. & Schlttdl.) V.C.Souza	C.D.N.Rodrigues 136			
<i>Mecardonia procumbens</i> var. <i>flagellaris</i> * (Cham. & Schlttdl.) V.C.Souza		AJ608627	AJ609166	Oxelman <i>et al.</i> 2005
<i>Otacanthus azureus</i> (Linden) Ronse	C.D.N.Rodrigues 26			
<i>Otacanthus platytilus</i> (Radlk.) Taub. (A)	C.D.N.Rodrigues 108			
<i>Otacanthus platytilus</i> (Radlk.) Taub. (B)	V.C.Souza 29678			
<i>Otacanthus fernandensii</i> Ronse	V.Demuner 2966			
<i>Otacanthus</i> sp2		AY492188	AY492219	Albach <i>et al.</i> 2005
<i>Philcoxia minensis</i> V.C.Souza & Giul. (A)	C.D.N.Rodrigues 117			
<i>Philcoxia minensis</i> V.C.Souza & Giul. (B)	V.C.Souza 25444			
<i>Philcoxia minensis</i> V.C.Souza & Giul. (C)		EF467889		Fritsch <i>et al.</i> 2007

Tabela 3 - (Continuação)

Família Espécies	Coletor e o n°. de coleta	No. de acesso do Genbank <i>trnL-trnL-F</i>	No. de acesso do Genbank <i>rps16</i>	Referência
Gratiolaceae				
<i>Scoparia dulcis</i> L. (A)	C.D.N.Rodrigues 36			
<i>Scoparia dulcis</i> L. (B)	V.C.Souza 25377			
<i>Scoparia dulcis</i> L. (C)	V.C.Souza 32148			
<i>Scoparia dulcis</i> L. (D)		AY492191	AY492223	Albach <i>et al.</i> 2005
<i>Scoparia dulcis</i> L. (E)			AJ609140	Oxelman <i>et al.</i> 2005
<i>Scoparia ericacea</i> Cham & Schltdl. (A)	C.D.N.Rodrigues 99			
<i>Scoparia ericacea</i> Cham & Schltdl. (B)	C.D.N.Rodrigues 102			
<i>Scoparia montevidensis</i> (Spreng.) R.E.Fr. (A)	C.D.N.Rodrigues 101			
<i>Scoparia montevidensis</i> (Spreng.) R.E.Fr. (B)	V.C.Souza 32411			
<i>Scoparia pinnatifida</i> Cham.	C.D.N.Rodrigues 129			
<i>Stemodia durantifolia</i> (L.) Sw. (A)	C.D.N.Rodrigues 51			
<i>Stemodia durantifolia</i> (L.) Sw. (B)	V.C.Souza 28714			
<i>Stemodia durantifolia</i> (L.) Sw. (C)			AY492225	Albach <i>et al.</i> 2005
<i>Stemodia foliosa</i> Benth. (A)	C.D.N.Rodrigues 81			
<i>Stemodia foliosa</i> Benth. (B)	V.C.Souza 25748			
<i>Stemodia foliosa</i> Benth. (C)	V.C.Souza 28938			
<i>Stemodia glabra</i> Spreng.		AJ608566	AJ609138	Oxelman <i>et al.</i> 2005
<i>Stemodia maritima</i> L. (A)	C.D.N.Rodrigues 38			
<i>Stemodia maritima</i> L. (B)	V.C.Souza 28666			
<i>Stemodia maritima</i> L. (C)	V.C.Souza 28673			
<i>Stemodia microphylla</i> J.A.Schmidt. (A)	C.D.N.Rodrigues 8			
<i>Stemodia microphylla</i> J.A.Schmidt. (B)	V.C.Souza 28444			
<i>Stemodia stellata</i> B.L. Turner (A)	C.D.N.Rodrigues 118			
<i>Stemodia stellata</i> B.L. Turner (B)	V.C.Souza 28474			
<i>Stemodia trifoliata</i> (Link) Reichb. (A)	V.C.Souza 27514			
<i>Stemodia trifoliata</i> (Link) Reichb. (B)	V.C.Souza 32147			
<i>Stemodia vandellioides</i> (Benth.) V.C.Souza (A)	V.C.Souza 27504			
<i>Stemodia vandellioides</i> (Benth.) V.C.Souza (B)	V.C.Souza 32151			
<i>Stemodia veronicoides</i> J.A.Schmidt.	C.D.N.Rodrigues 104			

Tabela 3 - (Continuação)

Família Espécies	Coletor e o nº. de coleta	No. de acesso do Genbank <i>trnL-trnL-F</i>	No. de acesso do Genbank <i>rps16</i>	Referência
Gratiolaceae				
<i>Stemodia verticillata</i> (Mill.) Hassl. (A)	C.D.N.Rodrigues 30			
<i>Stemodia verticillata</i> (Mill.) Hassl. (B)	V.C.Souza 30067			
<i>Stemodia verticillata</i> (Mill.) Hassl. (C)	V.C.Souza 32149			
<i>Stemodia</i> sp	C.D.N.Rodrigues 121			
<i>Tetraulacium veroniciforme</i> Turcz. (A)	C.D.N.Rodrigues 94			
<i>Tetraulacium veroniciforme</i> Turcz. (B)	V.C.Souza 28919			
Plantaginaceae				
Tribo Plantagineae				
<i>Plantago australis</i> Lam.		AJ101929		Ronsted <i>et al.</i> 2002
<i>Plantago coronopus</i> L.		AF486419		Albach <i>et al.</i> 2004
<i>Plantago lanceolata</i> L. (A)	C.D.N.Rodrigues 28			
<i>Plantago lanceolata</i> L. (B)		AY101952		Ronsted <i>et al.</i> 2002
<i>Plantago major</i> L. (A)	C.D.N.Rodrigues 27			
<i>Plantago major</i> L. (B)		AY101917		Ronsted <i>et al.</i> 2002
Tribo Angelonieae				
<i>Angelonia arguta</i>	V.C.Souza 26371			
<i>Angelonia biflora</i> (A)	C.D.N.Rodrigues 23			
<i>Angelonia biflora</i> (B)	V.C.Souza 28688			
<i>Angelonia cornigera</i>	V.C.Souza 26233			
<i>Angelonia crassifolia</i>	V.C.Souza 25385			
<i>Angelonia procumbens</i>	V.C.Souza 30684			
<i>Angelonia pubescens</i> (A)	C.D.N.Rodrigues 84			
<i>Angelonia pubescens</i> (B)	V.C.Souza 28936			
<i>Angelonia salicariifolia</i>	V.C.Souza 29679			
Acanthaceae				
Acanthaceae sp1	C.D.N.Rodrigues 71			
Acanthaceae sp2	C.D.N.Rodrigues 76			
Acanthaceae sp3	C.D.N.Rodrigues 87			
Bignoniaceae				
<i>Arrabidaea sceptrum</i> (Cham.) Sandwith	C.D.N.Rodrigues 20			
<i>Jacaranda caroba</i> (Vell.) A.DC.	C.D.N.Rodrigues 16			
<i>Jacaranda racemosa</i> Cham.	C.D.N.Rodrigues 7			
Calceolariaceae				
<i>Calceolaria tripartita</i> Ruiz & Pav.	V.C.Souza 28017			

Tabela 3 - (Continuação)

Família Tribo Espécies	Coletor e o nº. de coleta	No. de acesso do Genbank <i>trnL-trnL-F</i>	No. de acesso do Genbank <i>rps16</i>	Referência
Gesneriaceae				
<i>Cubitanthus alatus</i> (Cham. & Schltl.) Barringer	V.C.Souza 30746			
Lamiaceae				
<i>Hypenia</i> sp.	C.D.N.Rodrigues 17			
Linderniaceae				
<i>Lindernia crustacea</i> (L.) F. Muell. (A)	C.D.N.Rodrigues 31			
<i>Lindernia crustacea</i> (L.) F. Muell. (B)	C.D.N.Rodrigues 48			
<i>Micranthemum umbrosum</i> S.F. Blake	V.C.Souza 30001			
<i>Stemodiopsis buchananii</i> Skan		AJ608565	AJ609137	Oxelman <i>et al.</i> 2005
<i>Torenia thouarsii</i> (Cham. & Schltl.) Kuntze	C.D.N.Rodrigues 109			
Oleaceae				
<i>Olea europaea</i> L. (A)		FJ490798		Ferri <i>et al.</i> 2009
<i>Olea europaea</i> L. (A)			AJ431047	Bremer <i>et al.</i> 2002
<i>Olea europaea</i> L. (B)			AF225275	Wallander & Albert 2000
Orobanchaceae				
<i>Lindenbergia philippensis</i> (Cham. & Schltl.) Benth.		AJ608586	AJ609169	Oxelman <i>et al.</i> 2005
<i>Lindenbergia</i> sp.		AJ430924	AJ431049	Bremer <i>et al.</i> 2002
Schlegeliaceae				
<i>Schlegelia</i> sp.	V.C.Souza 29684			
Scrophulariaceae				
<i>Capraria biflora</i> L. (A)	C.D.N.Rodrigues 22			
<i>Capraria biflora</i> L. (B)	V.C.Souza 28689			
<i>Capraria biflora</i> L. (C)		AJ608608	AJ609198	Oxelman <i>et al.</i> 2005
<i>Limosella aquatica</i> L.		AJ608587		Oxelman <i>et al.</i> 2005
<i>Limosella grandiflora</i> Benth.			AJ609170	Oxelman <i>et al.</i> 2005
<i>Scrophularia aquatica</i> L. (A)	V.C.Souza 33119			
<i>Scrophularia aquatica</i> L. (B)	cultivado			
Verbenaceae				
<i>Lippia</i> sp.	C.D.N.Rodrigues 15			
<i>Phyla</i> sp.	C.D.N.Rodrigues 75			

2. Métodos

2.1. Sequenciamento de DNA

O DNA total foi extraído de folhas armazenadas em gel de sílica com indicador de umidade, segundo Ferreira & Grattapaglia (1996). A qualidade do DNA obtido e sua quantidade relativa foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. A visualização foi feita com auxílio de brometo de etídeo, em transiluminador de luz UV.

O protocolo para amplificação em termociclador compreendeu o uso de diversos reagentes como: iniciadores (Tabela 4) a 10 μ M, dNTPs a 2 mM cada, Taq DNA polimerase, tampão 5X, betaína 5 M, TMACl e 2 μ L de extrato de DNA genômico total. As quantidades utilizadas de cada reagente para cada marcador, assim como sua programação em termociclador, encontram-se na Tabela 6. Todas as reações foram feitas com volume final de 50 μ L.

Para a reação de amplificação foram testadas diversas regiões dos três genomas como apresentado na Tabela 4 e 5. Os dois marcadores do genoma nuclear testados (*rpb2* e *ncp6S*) tiveram problemas. Para a região *rpb2* obteve-se o amplificado, entretanto seu amplificado apresentou poucas bases (cerca de 200 pb), apresentando pouca variação entre as poucas sequências testadas. Para a região *ncp6S*, obtiveram-se alguns amplificados, entretanto ocorreram problemas com o sequenciamento, descartando-se esse marcador. Todas as amplificações obtidas de NAD (genoma mitocondrial) apresentaram um produto secundário de +/- 200 pb. Para eliminar esse contaminante, todo o volume da reação de amplificação foi analisado em gel de agarose 2% e a banda de interesse (com maior número de pares de bases) foi eluída do gel. A purificação do material amplificado satisfatoriamente, tanto na forma líquida quanto eluída do gel, foi feita com o Kit "Concert Rapid PCR Purification System - Gibco BRL", de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante.

A reação de amplificação para sequenciamento foi feita com 2 μ L de BigDye Terminator (ABI Systems) versão 3.0, 0,25 μ L de iniciador a 10 nM e de 3-9 μ L do produto amplificado e purificado. Foi usado o seguinte programa para o termociclador: 40 ciclos, 96°C, 10 seg; 49-51°C, 20 seg; 60°C, 4 min; 15°C por tempo indeterminado.

Tabela 4 - Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento das regiões *rpb2* (Oxelman & Bremer 2000 ¹), *trnL-trnL-F* (Taberlet *et al.* 1991 ²), *rps16* (Oxelman *et al.* 1997 ³), *ncp6S* (Emshwiller & Doyle 1999⁴) e NAD (Dumolin-Lapègue *et al.* 1997 ⁵) em análise filogenética de Gratiolaceae. Iniciadores assinalados com asterisco foram utilizados exclusivamente para fins de sequenciamento. O iniciador nad 400 foi desenhado no laboratório ⁶.

Marcador	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Sentido
<i>rpb2</i>	6935F ¹	TCTGGTGAGGATGTTATCATTGGGAA	direto
<i>rpb2</i>	8032R ¹	GCTCCTGGAARAGCARTTTGCADGCATA	reverso
<i>trnL-trnL-F</i>	tab c ²	CGAAATCGGTAGACGCTACG	direto
<i>trnL-trnL-F</i>	tab f ²	ATTTGAACTGGTGACACGAG	reverso
<i>trnL-trnL-F</i>	tab d ^{2*}	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	reverso
<i>trnL-trnL-F</i>	tab e ^{2*}	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	direto
<i>rps16</i>	rpsf ³	GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT	direto
<i>rps16</i>	rpsr2 ³	TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC	reverso
<i>ncp6S</i>	GScp 687f ⁴	GATGCTCACTACAAGGCTTG	direto
<i>ncp6S</i>	GScp 994r ⁴	AATGTGCTCTTTGTGGCGAAG	reverso
NAD 7/2 e 7/3	nad 7/2 ⁵	GCTTTACCTTATTCTGATCG	direto
NAD 7/2 e 7/3	nad 7/3 ⁵	TGTTCTTGGGCCATCATAGA	reverso
NAD 7/2 e 7/3	nad 400 ^{6*}	TAGGAGCATTGGTGGAACCGGTGAA	direto

Tabela 5 - Quantidade de reagentes e programação do termociclador usados para cada região de DNA em análise filogenética de Gratiolaceae.

Marcadores	<i>rpb2</i>	<i>trnL-trnL-F</i> e <i>rps16</i>	<i>ncp6S</i>	NAD
Reagentes				
Tampão 5X	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Iniciadores (10 µM)	1 µL	0,5 µL	1 µL	1,5 µL
dNTPs (2 mM cada)	4 µL	3 µL	4 µL	4 µL
Taq DNA Polimerase	0,25 µL	0,25 µL	0,25 µL	0,5 µL
TMACl	20 µL	-	20 µL	20 µL
Água MiliQ	11,75 µL	33,75 µL	11,75 µL	10,5 µL
Programação do termociclador				
1 ciclo	96°C - 4 min	94°C - 3 min	96°C - 4 min	94°C - 2 min
40 ciclos	96°C - 1 min 54-56°C - 1 min e 45 s 72°C - 3 min	94°C - 1 min 50-53°C - 1 min e 30 s 72°C - 2 min	96°C - 1 min 56°C - 1 min e 45 s 72°C - 3 min	94°C - 1 min 55-60°C - 1 min e 45 s 72°C - 3 min
1 ciclo	72°C - 10 min; 15°C - indefin.	72°C - 7 min 15°C - indefin.	72°C - 10 min; 15°C - indefin.	72°C - 10 min 15°C - indefin.

Após a reação de amplificação para sequenciamento, o DNA foi precipitado com 40 µL de isopropanol 75% em cada local da placa de 96 poços por 20 min à temperatura ambiente e centrifugado a 4000 rpm por 40 min. O sobrenadante foi descartado e adicionados 200 µL de etanol 70%, centrifugando-se a 4000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco em "speed vacuum" até *secura total*. A solubilização do resíduo foi feita segundo procedimento adequado ao modelo de sequenciador a ser utilizado. O sequenciamento foi feito em equipamento ABI Prism 3100 ou 3700.

As sequências diretas e reversas de uma mesma amostra foram complementadas e posteriormente alinhadas em computador PC, com o programa BioEdit. (Anexo 1 - Protocolo detalhado oferecido na Oficina de filogenia em jan/2009). Para as inferências filogenéticas, os caracteres foram não ordenados e sem pesagem. Foram construídos cladogramas pelo critério da máxima parcimônia com o programa PAUP 4.0b (Swofford 2002), usando-se busca heurística. Foi feita a avaliação da consistência dos clados pelo método "bootstrap" (BS) com 1000 réplicas (Felsenstein 1985). Valores de "bootstrap" (BS) iguais ou superiores a 85 foram assumidos como indicativos de forte apoio; entre 85 e 70, apoio mediano; abaixo de 70, fraco apoio (Anexo 2 - protocolo detalhado). Para a combinação de matrizes de distintos marcadores foi realizado o teste de congruência ILD. Foi testada a combinação das matrizes de *rps16* e *trnL-trnL-F*. Não se cogitou incluir a matriz de NAD, uma vez que se conseguiram sequências para número muito menor de terminais, quer devido a dificuldades encontradas nas análises moleculares, quer pelo limitado número de sequências no GenBank. A análise filogenética com base em sequências de *rps16 + trnL-trnL-F* será denominada de agora em diante AC (análise combinada). O critério para decisão sobre congruência ou não baseou-se no valor $P=0,05$, assumindo-se como indicativos de congruência valores acima desse nível crítico (Mason-Gamer & Kellog 1996, Barker & Lutzoni 2002) (Anexo 3 - protocolo detalhado).

A fim de ampliar a confiabilidade da inferência filogenética, foram realizadas também análises pelo método bayesiano, usando-se o programa MrBayes (Hall 2001). Determinou-se o melhor modelo evolutivo para cada marcador com o programa MrModeltest v.2.3 (Nylander 2004). A análise bayesiana para cada marcador baseou-se em duas rodadas simultâneas com quatro cadeias (uma quente e três frias) em cada rodada. Foram obtidas 10.000.000 de gerações para cada cadeia, salvando-se uma árvore a cada 1.000 gerações, com exceção da AC, para a qual só foi possível obter 8.322.000 gerações. Foram considerados clados com alta sustentação aqueles que apresentaram valores de probabilidade posterior (PP) iguais ou superiores a 0.95 (Anexo 4 - protocolo detalhado).

A edição das árvores foi feita com o programa *Tree Graph*, associado aos programas *TreeView*, *Crimson Editor* e *Inkscape*. (Anexo 5 - protocolo detalhado).

III. Resultados e Discussão

1. Comentários sobre Gratiolaceae e sua posição na filogenia de Lamiales

Os parâmetros obtidos na análise de máxima parcimônia (número de caracteres, número de terminais, número de passos, CI, RI, RC) e na análise bayesiana (modelo evolutivo e "burn-in") dos três marcadores analisados isoladamente (NAD, *rps16* e *trnL-trnL-F*) e para a AC (*rps16* e *trnL-trnL-F*) estão apresentados na Tabela 6.

O teste de congruência ILD foi realizado duas vezes. Combinaram-se as matrizes de *rps16* e *trnL-trnL-F*, incluindo-se o terminal *Mecardonia procumbens* var. *flagellaris*; obteve-se $P=0.1$, indicando que as topologias baseadas nas matrizes individualmente são incongruentes ($P<0.05$). Outra análise foi realizada excluindo-se o terminal anteriormente citado, obtendo-se então $P=0,65$, indicando, portanto, congruência. Se observarmos a emergência de *M. procumbens* var. *flagellaris* nas análises com os marcadores *rps16* (Figuras 2 e 3) e *trnL-trnL-F* (Figuras 4 e 5), verificamos que na análise de *rps16* o terminal inclui-se no clado de *Mecardonia*, enquanto na análise de *trnL-trnL-F* ele emerge junto com *Scrophularia aquatica*. Daí a incongruência indicada por ILD. Os resultados das análises filogenéticas são discutidos com base na AC, excluindo-se, portanto, *M. procumbens* var. *flagellaris*. Considerações sobre essa variedade são feitas mais adiante, na discussão sobre *Mecardonia*.

Dos onze gêneros de Gratiolaceae com ocorrência no Brasil nove foram incluídos nas análises deste trabalho: *Achetaria*, *Bacopa*, *Conobea*, *Mecardonia*, *Otacanthus*, *Philcoxia*, *Scoparia*, *Stemodia*, *Tetraulacium*. Não tendo sido incluído dois gêneros que no Brasil apresentam uma espécie (*Dizygostemon floribundum* e *Gratiola peruviana*). Cada gênero será discutido a seguir separadamente, com exceção de *Achetaria-Otacanthus* e *Bacopa-Conobea*.

O clado correspondente a Gratiolaceae é fortemente apoiado em todas as análises filogenéticas realizadas, exceto na de máxima parcimônia com base em *rps16* (BS 67, Figura 2). Em AC, o clado recebe forte apoio, tanto por máxima parcimônia (BS 99) quanto na análise bayesiana (PP 1,00) (Figuras 6 e 7, respectivamente). Também nas análises baseadas em sequências de NAD o clado Gratiolaceae é fortemente apoiado: BS 97 e PP 0,96 (Figuras 8 e 9, respectivamente). Nas análises baseadas em NAD, há uma incongruência no confronto das topologias correspondentes à máxima parcimônia (Figura 8) e bayesiana (Figura 9): no primeiro caso, *Philcoxia* emerge fora do clado de Gratiolaceae, junto com *Plantago*, embora com fraca

sustentação (BS 66); no segundo caso, *Philcoxia* é grupo irmão das demais Gratiolaceae, e sua exclusão do clado implica em forte redução do grau de sustentação (de PP 0,96 para 0,68).

Levando-se em conta a delimitação de Rahmzadeh *et al.* (2005) para as Gratiolaceae (Tabela 02), observa-se que quatro gêneros (*Capraria*, *Limosella*, *Lindenbergia* e *Stemodiopsis*) não se encontram no clado de Gratiolaceae nas Figuras 2 - 7. Na revisão de Tank *et al.* (2006), esses quatro gêneros posicionam-se em outras famílias (*Stemodiopsis*: Linderniaceae; *Capraria* e *Limosella*: Scrophulariaceae s.s.; *Lindenbergia*: Orobanchaceae). Analisando-se os relacionamentos dos quatro gêneros com outros grupos nas Figuras 2 - 7, nota-se que *Capraria* e *Limosella* emergem no clado em que se situa *Scrophularia aquatica*, corroborando sua inclusão em Scrophulariaceae s.s. Embora se tenha obtido fraco apoio em algumas análises (*rps16*: BS 67 e *trnL-trnL-F*: PP 0,71), em AC o clado combinando *Capraria* e *Limosella* com *Scrophularia* é fortemente sustentado (BS 90 e PP 1,00, Figuras 6 e 7, respectivamente). A inclusão de *Stemodiopsis* em Linderniaceae (Tank *et al.* 2006) torna essa família parafilética, segundo os resultados observados nas Figuras 2 -7; a monofilia seria alcançada com a fusão entre Linderniaceae e Gesneriaceae, pois *Stemodiopsis* emerge junto com *Cubitanthus* (Gesneriaceae) num clado fortemente sustentado em todas as análises (Figuras 2-7). Os resultados das análises realizadas não ajudam a esclarecer a situação de *Lindenbergia*: As duas amostras analisadas situam-se num grupamento fracamente sustentado, incluindo representantes de várias famílias (Acanthaceae, Bignoniaceae, Gesneriaceae, Lamiaceae, Linderniaceae e Schlegeliaceae, Figuras 2-7). Além disso, nenhum outro gênero de Orobanchaceae foi incluído nas análises. Portanto, para que a delimitação de Gratiolaceae *sensu* Rahmzadeh *et al.* (2005) satisfaça a condição de monofilia, seria necessária a exclusão de *Capraria*, *Limosella*, *Lindenbergia* e *Stemodiopsis*.

Por seu turno, a delimitação de Gratiolaceae proposta por Albach *et al.* (2005) (Tabela 01) também não satisfaz a condição de monofilia, que requeriria, segundo as Figuras 2-7, a exclusão de *Limosella* e inclusão de *Conobea* e *Philcoxia*. Na revisão do grupo realizada por Tank *et al.* (2006), as Gratiolaceae compreendem sete gêneros: *Amphianthus*, *Bacopa*, *Gratiola*, *Mecardonia*, *Otacanthus*, *Scoparia* e *Stemodia*. As análises correspondentes às Figuras 2-6 indicam que outros seis gêneros devem ser incluídos no grupo para torná-lo monofilético: *Achetaria*, *Conobea*, *Dopatrium*, *Hydrotriche*, *Philcoxia* e *Tetraulacium*.

Tabela 6 - Parâmetros obtidos nas análises de parcimônia e bayesiana. Os parâmetros são apresentados para as regiões analisadas separadamente (NAD, *rps16* e *trnL-trnL-F*) e para as regiões combinadas (*rps16* e *trnL-trnL-F*).

Método Parâmetros	NAD	<i>rps16</i>	<i>trnL-trnL-F</i>	<i>rps16 + trnL-trnL-F</i>
Máxima parcimônia				
No. de terminais	82	106	119	98
No. de passos	429	1449	1256	2407
No. de caracteres informativos	218	461	413	806
No. de caracteres constantes	976	511	330	901
No. de caracteres variáveis e não informativos	113	110	90	208
Índice de Consistência (CI)	0.8811	0.5942	0.6067	0.6157
Índice de Consistência Reescalonado (RC)	0.8449	0.4956	0.5232	0.5198
Índice de Retenção (RI)	0.9589	0.8341	0.8624	0.8442
Análise bayesiana				
Modelo Evolutivo	JC+G	GTR+I+G	GTR+I+G	GTR+I+G
"Burn-in"	44	90	110	81

Observando-se as análises de *rps16*, *trnL-trnL-F* e combinada as Figuras 2 - 7 mostram que *Angelonia* é grupo irmão de Gratiolaceae, embora os valores que sustentem essa condição sejam diversos. Na AC, a sustentação é robusta: BS 89 e PP 1.00 (Figuras 6 e 7). Porém, nas análises baseadas em marcadores isolados o apoio não é forte (*rps16* - PP 0,67, *trnL-trnL-F* - BS 53, PP 0,67, Figuras 3, 4 e 5) ou negligenciável (*rps16*, máxima parcimônia, Figura 2). Resultados semelhantes também foram encontrados por Albach *et al.* (2005), em que Angelonieae (*Angelonia*, *Basistemon*, *Melosperma* e *Monttea*) apresentou-se como grupo irmão de Gratiolaceae. No trabalho de Oxelman *et al.* (2005) *Angelonia*, *Basistemon*, *Melosperma*, *Monttea* e *Ourisia* também se caracterizaram como grupo irmão das espécies aqui tratadas em Gratiolaceae.

O DNA mitocondrial (no caso deste trabalho, o gene NAD) indica um outro grupo na condição de irmão de Gratiolaceae: trata-se de um clado relativamente grande, incluindo Linderniaceae, Scrophulariaceae *s.s.*, Bignoniaceae, Plantaginaceae, além de *Angelonia*. O apoio para esse clado, porém, é negligenciável (máxima parcimônia, Figura 8) ou fracamente (PP 0,91, Figura 9).

Em todas as análises, as Plantaginaceae não se apresentam como grupo monofilético, dividindo-se em dois cladogramas, Angelonieae e Plantagineae (Figuras 2-9). Em seu trabalho, Souza (comunicação pessoal) propõe a promoção de Angelonieae (tribo) para família.

Os relacionamentos entre as famílias de Lamiales ainda não estão claros. No sistema mostrado no site do APG, Lamiales apresenta em posição basal Plocospermataceae, Oleaceae, Tetrachondraceae e uma politomia composta por Calceolaria, Gesneriaceae e demais famílias (Acanthaceae, Bignoniaceae, Byblidaceae, Carlemanniaceae, Cyclocheilaceae, Lamiaceae, Lentibulariaceae, Martyniaceae, Myoporaceae, Orobanchaceae, Paulowniaceae, Pedaliaceae, Phrymaceae, Plantaginaceae, Schlegeliaceae, Scrophulariaceae, Stilbaceae e Verbenaceae). Esse grande grupo não é representado num clado, apenas listado. No trabalho de Tank *et al.* (2006), uma grande parte dessas famílias também forma uma politomia.

A relação de Schlegeliaceae com outras famílias mostrou-se distinta nas análises deste trabalho. *Schlegelia* mostrou-se como grupo irmão de *Lindenbergia* (Orobanchaceae) fracamente sustentada (*trnL-trnL-F* - 0,82 PP, AC - 0,93 PP, Figuras 5 e 7) ou negligenciável (*trnL-trnL-F* máxima parcimônia, Figura 4). Em outras análises, posicionou-se num grande clado fracamente sustentado (*rps16* 0.78 PP, AC 51 BS, Figuras 3 e 6) com Acanthaceae, Bignoniaceae, Lamiaceae, Orobanchaceae, Verbenaceae, ou numa grande politomia com todas as famílias analisadas (*rps16* máxima parcimônia, Figura 2). Na análise baseada em NAD, *Schlegelia* posicionou-se num clado fracamente sustentado (NAD 64 BS, 0,80 PP, Figuras 8 e 9) e sem resolução interna, junto com Bignoniaceae e Verbenaceae. Um posicionamento incerto de *Schlegelia* também foi apresentado em diversos trabalhos. Olmstead *et al.* (2001) encontrou fraco suporte para *Schlegelia* como grupo irmão de Bignoniaceae (44BS); em Bremer *et al.* (2002), o grupo relaciona-se com Acanthaceae, porém com fraco apoio (71% "jackknife") e em Oxelman *et al.* (2005) *Schlegelia* situa-se numa grande politomia com as verdadeiras ("core") Lamiales.

Em algumas análises, as famílias Acanthaceae, Bignoniaceae, Lamiaceae, Orobanchaceae, Schlegeliaceae e Verbenaceae apresentaram-se num clado bem sustentado (*trnL-trnL-F*: 0.99 PP e AC: 1.00 PP - Figuras 5 e 7), fracamente sustentado (*rps16*: 0.78 PP, AC 51 BS, NAD: 64 BS, 0.80 PP - Figuras 3, 6, 8 e 9), apoio negligenciável (máxima parcimônia *trnL-trnL-F* - Figura 4) ou numa grande politomia de Lamiales (máxima parcimônia *rps16* - Figura 2). Afinidades entre essas famílias também foi observada por Oxelman *et al.* (2005). Analisando Lamiales, Oxelman *et al.* (2005) obtiveram dois cladogramas como grupo irmão: um, contendo Acanthaceae-Bignoniaceae-Verbenaceae-Lentibulariaceae-Martyniaceae, e outro, contendo Orobanchaceae-Lamiaceae-Pedaliaceae-Phrymaceae.

Essas famílias mostraram-se monofiléticas nas análises baseadas em seqüências de regiões do cloroplasto, exceção feita a Bignoniaceae, em cujo clado *Hyphenia* (Lamiaceae) aninhou-se. O alinhamento das seqüências correspondentes a essas espécies foi verificado, não se

observando erros. Se observarmos todas as análises, pode-se observar padrão semelhante. A única hipótese de erro levantada foi a possibilidade de troca de material no início do processo. A verificação dessa hipótese poderá ser feita, realizando-se nova extração de DNA de *Hypenia*, novo sequenciamento de um dos marcadores e comparar com a sequência já obtida.

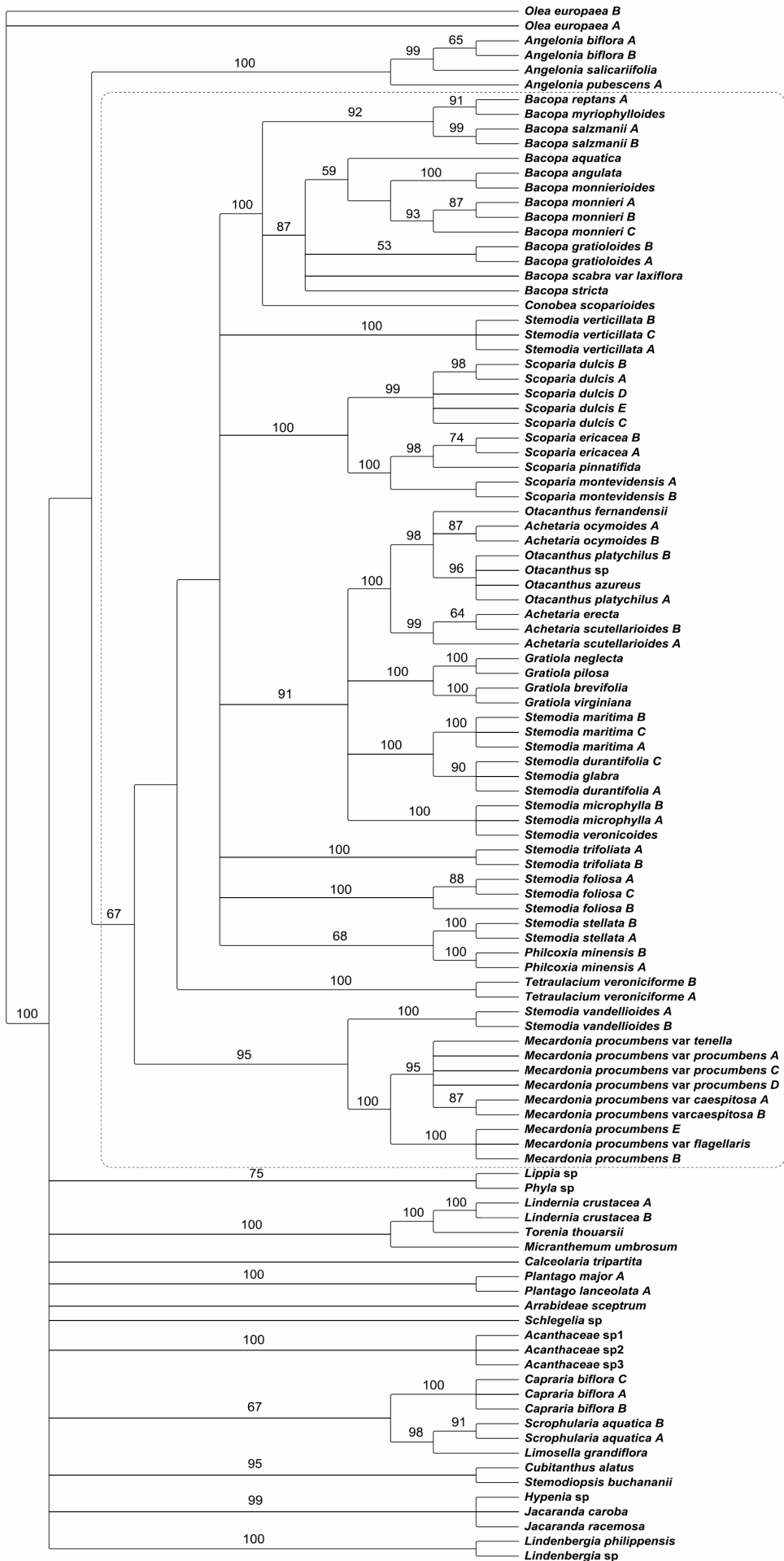


Figura 02 - Árvore de consenso estrito em análise filogenética de Lamiales, baseada em sequências de *rps16* e método da máxima parcimônia. Os dígitos acima dos ramos correspondem a valores de "bootstrap". O contorno tracejado delimita o clado com as espécies de *Gratiolaceae*.

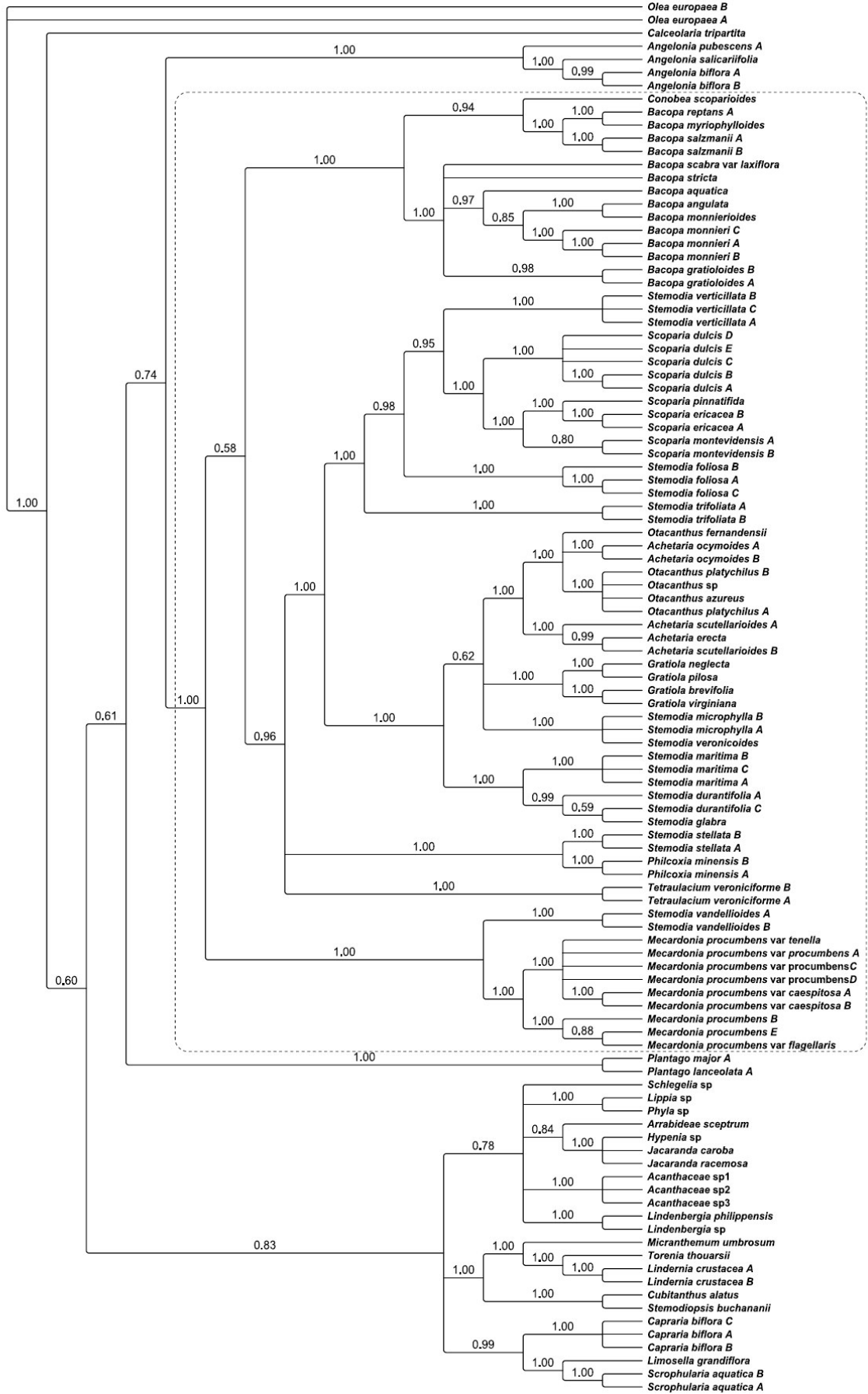


Figura 03 - Árvore de consenso de maioria em análise filogenética de Lamiales, baseada em sequências de *rps16* e análise bayesiana. Os dígitos acima dos ramos correspondem a valores de probabilidades posteriores. O contorno tracejado delimita o clado com as espécies de *Gratiolaceae*.

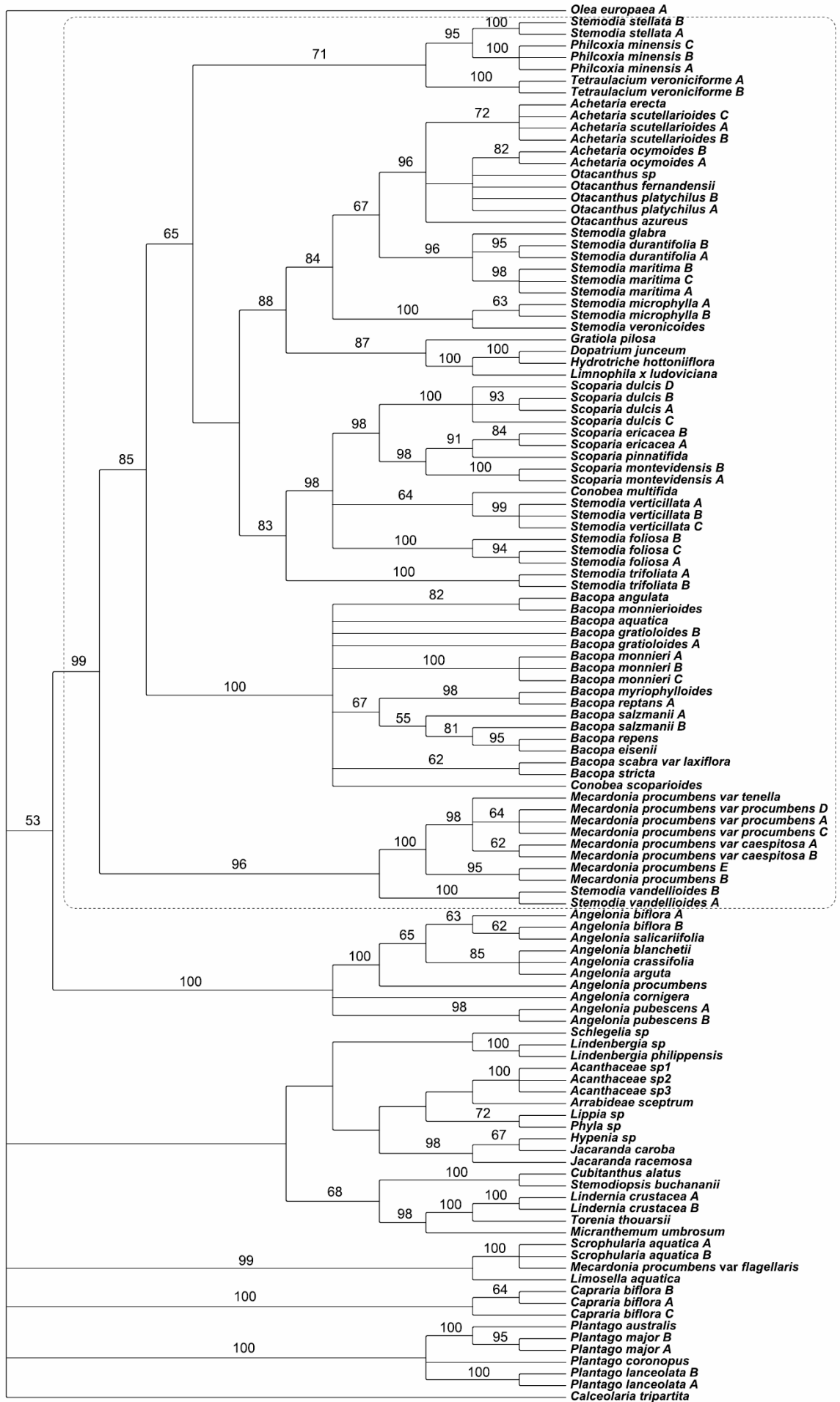


Figura 04 - Árvore de consenso estrito em análise filogenética de Lamiales, baseada em sequências de *trnL-trnL-F* e método da máxima parcimônia. Os dígitos acima dos ramos correspondem a valores de "bootstrap". O contorno tracejado delimita o clado com as espécies de *Gratiolaceae*.

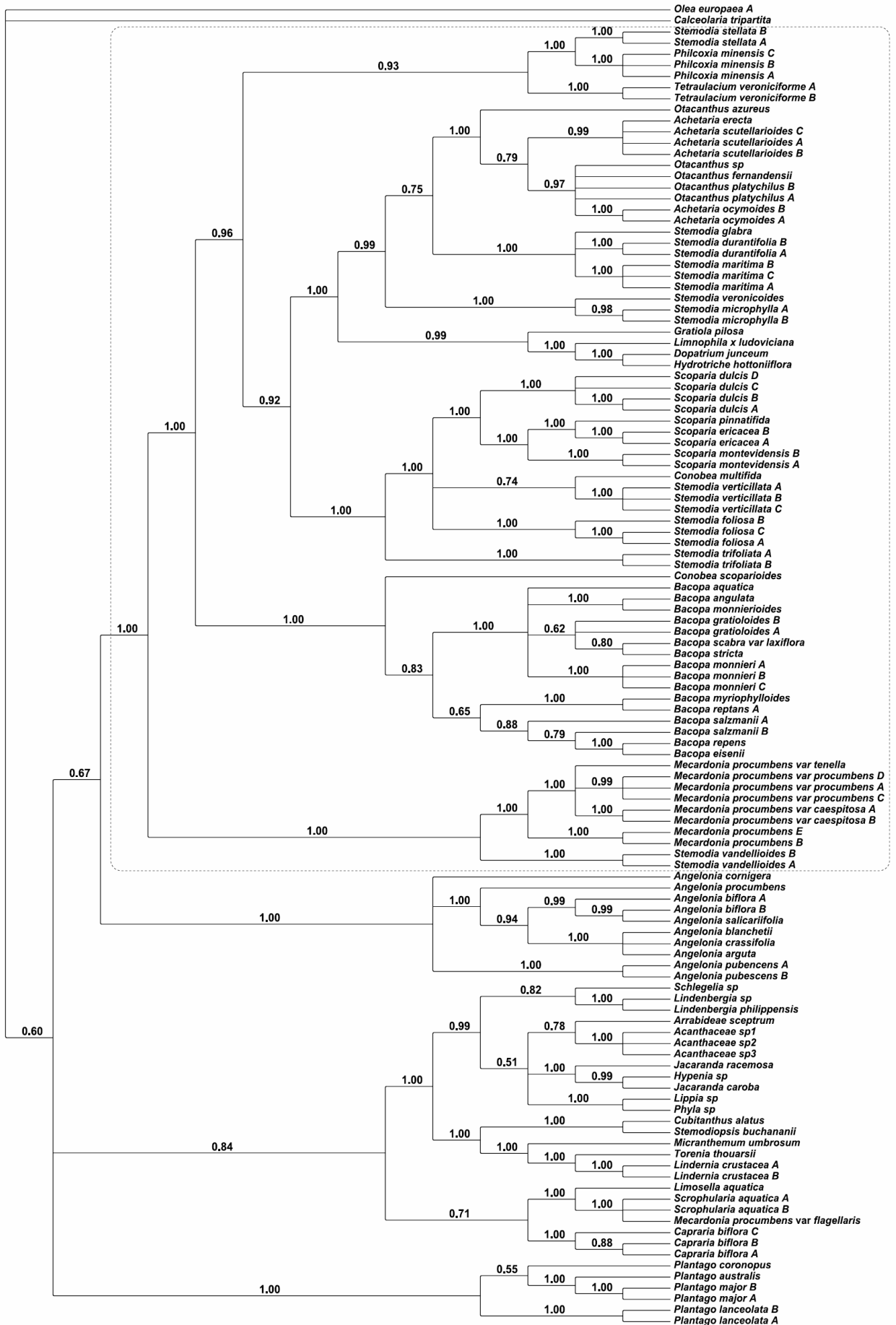


Figura 05 - Árvore de consenso de maioria em análise filogenética de Lamiales, baseada em sequências de *trnL-trnL-F* e análise bayesiana. Os dígitos acima dos ramos correspondem a valores de probabilidades posteriores. O contorno tracejado delimita o clado com as espécies de *Gratiolaceae*.

Figura 06 - Árvore de consenso estrito em análise filogenética de Lamiales, baseada na combinação de sequências de *rps16* e *trnL-trnL-F* e método da máxima parcimônia. Os dígitos acima dos ramos correspondem a valores de "bootstrap". O contorno tracejado delimita o clado com as espécies de *Gratiolaceae*.

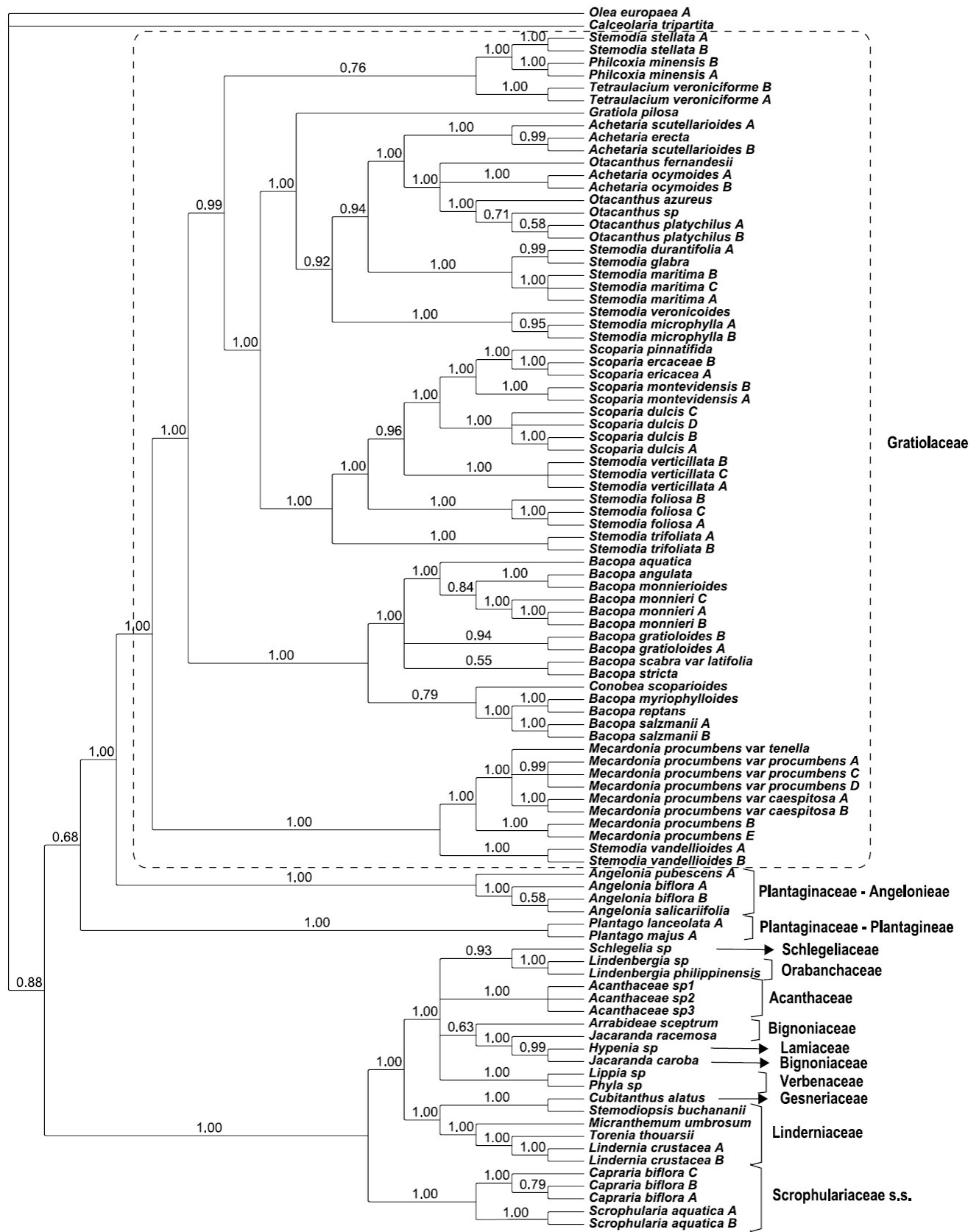


Figura 07 - Árvore de consenso de maioria em análise filogenética de Lamiales, baseada na combinação de sequências de *rps16* e *trnL-trnL-F* e análise bayesiana. Os dígitos acima dos ramos correspondem a valores de probabilidades posteriores. O contorno tracejado delimita o clado com as espécies de *Gratiolaceae*.

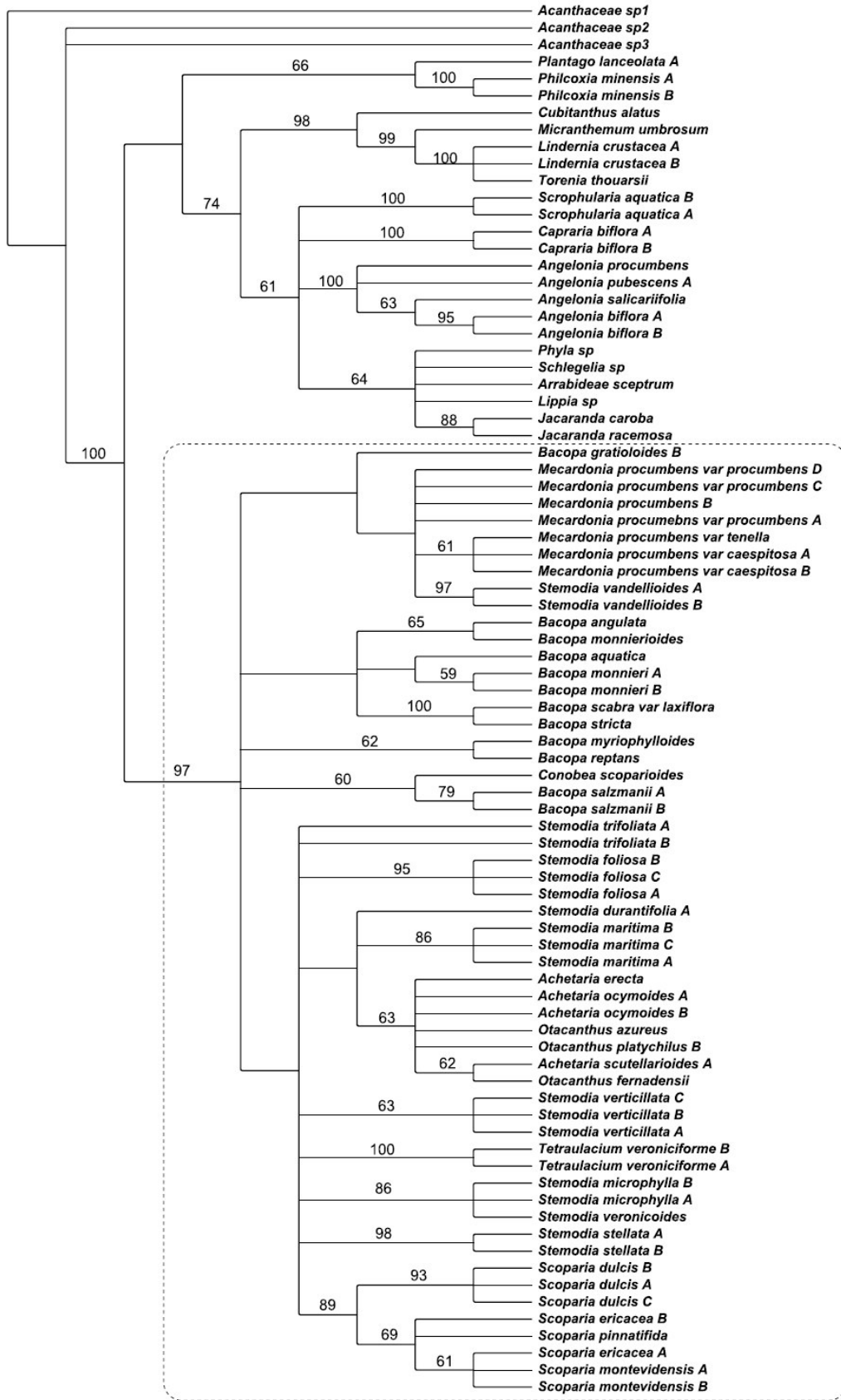


Figura 08 - Árvore de consenso estrito em análise filogenética de Lamiales, baseada em sequências de NAD mitocondrial e método da máxima parcimônia. Os dígitos acima dos ramos correspondem a valores de "bootstrap". O contorno tracejado delimita o clado com as espécies de *Gratiolaceae*.

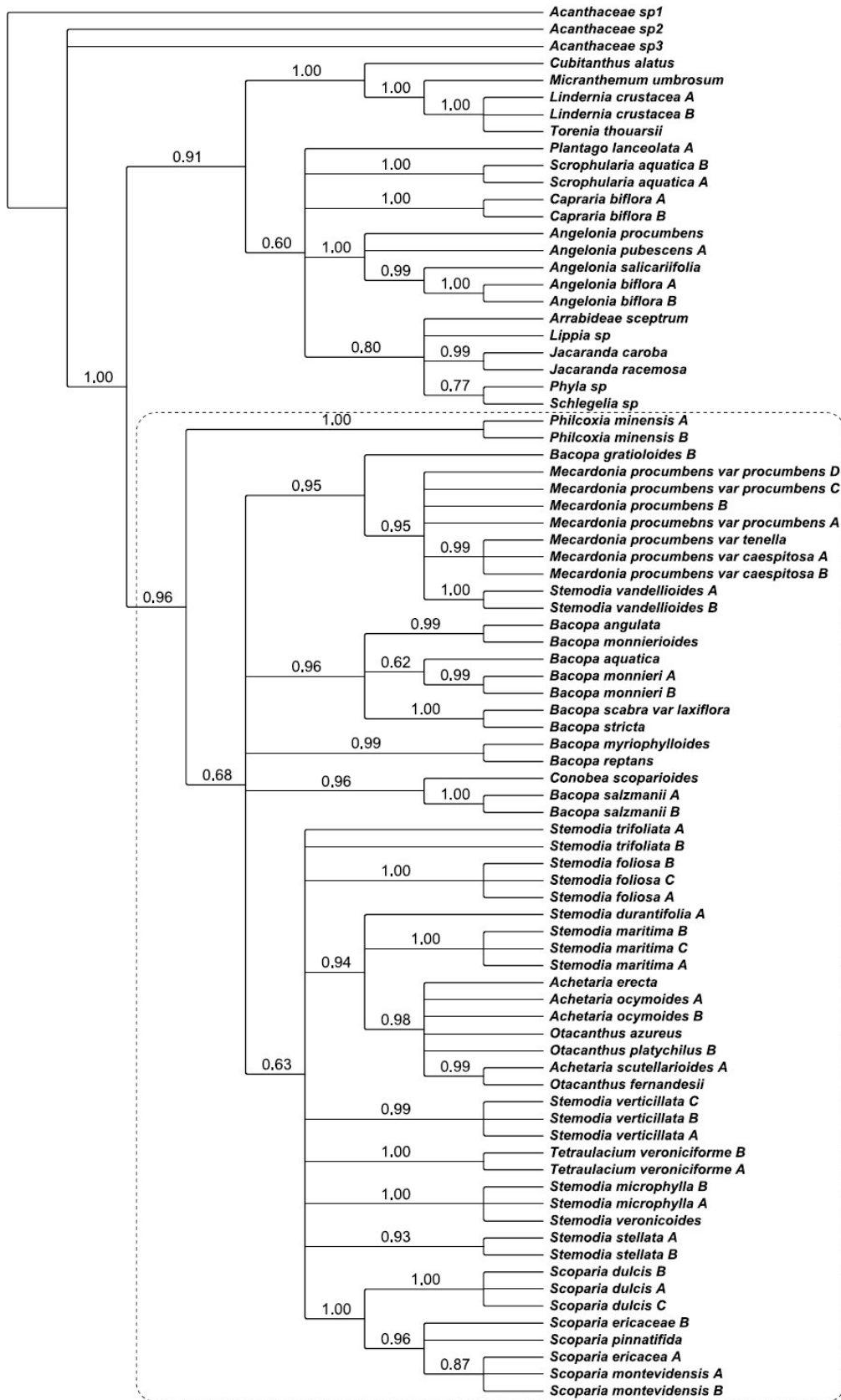


Figura 09 - Árvore de consenso de mairia em análise filogenética de Lamiales, baseada em sequências de NAD mitocondrial e análise bayesiana. Os dígitos acima dos ramos correspondem a valores de probabilidades posteriores. O contorno tracejado delimita o clado com as espécies de Gratiolaceae.

2. Comentários sobre os gêneros de Gratiolaceae e sua posição na filogenia da família

Achetaria e Otacanthus

Achetaria no Brasil é representado por quatro espécies; três delas foram incluídas na presente análise. Há cinco espécies nativas de *Otacanthus* e três delas foram analisadas. Morfologicamente, *Achetaria* e *Otacanthus* podem ser diferenciados pela presença de brácteas em *Achetaria* (embora elas possam ocorrer em *Otacanthus*) e pelo tamanho das flores: *Otacanthus* apresenta flores maiores que *Achetaria*, embora não se possam estabelecer limites absolutos.

Em todas as análises, *Achetaria* e *Otacanthus* encontram-se num mesmo clado, quase sempre com elevados valores de sustentação (*rps16*: BS 100, PP 1,00; *trnL-trnL-F*: BS 96, PP 1,00; AC: BS 100, PP 1,00; NAD: BS 63, PP 0,98, Figuras 2-9). Santos (1997) analisou a morfologia polínica de algumas espécies de *Achetaria* e *Otacanthus*. Observou que *A. erecta* e *A. scutellarioides* apresentam grãos de pólen com forma suboblata. Nos cladogramas da presente análise, baseados em sequências de DNA do cloroplasto, essas espécies formam clados com elevado suporte (Figuras 2-7). No entanto, *Achetaria ocymoides* emerge em um clado juntamente com espécies de *Otacanthus*, numa relação que frequentemente recebe suporte robusto (Figuras 2, 3, 5-7). Existe apoio também na morfologia polínica para esse relacionamento: *A. ocymoides* e *O. platychillus* possuem pólen oblato-esfeoidal (Santos 1997). Nenhuma topologia da presente análise filogenética é consistente com a delimitação atual de *Achetaria* e *Otacanthus* e todas provêm apoio à fusão entre os dois gêneros, como sugerido por Souza (1996).

Scoparia

As espécies brasileiras de *Scoparia* concentram-se na região sul do Brasil, com exceção de *Scoparia dulcis* que apresenta ampla distribuição. *Scoparia* diferencia-se dos demais gêneros de Gratiolaceae por apresentar flores com corola tetrâmera e rotácea. Dentre as seis espécies de *Scoparia* nativas do Brasil, quatro estão representadas na presente análise.

O apoio provido pela morfologia à condição de *Scoparia* como gênero distinto encontra paralelo na evidência molecular. Em todas as análises do presente trabalho, *Scoparia* emerge

como grupo monofilético, com elevados valores de sustentação (*rps16*: BS 100, PP 1,00; *trnL-trnL-F*: 98, PP 1,00; AC: BS 100, PP 1,00; NAD: BS 89, PP 1,00; Figuras 2-9). Todas as análises mostraram *Scoparia dulcis* como grupo irmão das demais espécies do gênero. É interessante notar que *Scoparia dulcis* distingue-se das outras espécies por apresentar quatro sépalas, em vez de cinco como as outras espécies.

Nas análises baseadas em *rps16*, *trnL-trnL-F* e AC (Figuras 2-7) observa-se invariavelmente a topologia: *S. dulcis* (*S. montevidensis* (*S. pinnatifida* (*S. ericacea*))). Em relação à distribuição dessas espécies, há uma tendência de restrição da área geográfica. *S. dulcis* (grupo irmão das demais espécies) apresenta uma ampla distribuição no Brasil. *S. montevidensis* apresenta distribuição um pouco mais restrita que *S. dulcis*, podendo ser encontrada nos estados do sul, mas estendendo-se até o Mato Grosso e parte da Amazônia. Quanto a *S. pinnatifida* e *S. ericacea*, a distribuição de ambas é restrita ao sul do Brasil (Souza 1996).

A filogenia baseada em NAD mostra topologia semelhante, com *S. dulcis* emergindo como grupo irmão de um clado contendo as demais espécies. Uma diferença em relação às análises baseadas em sequências de regiões do cloroplasto é que nas análises baseadas em NAD a sustentação e a resolução do clado *S. montevidensis* / *S. ericacea* / *S. pinnatifida* são substancialmente inferiores (Figura 6 e 7).

Bacopa e Conobea

Bacopa é representada no Brasil por 26 espécies, sendo que dez delas foram incluídas nas presentes análises. *Bacopa* é o gênero com maior número de espécies de Gratiolaceae com ocorrência no Brasil. A distribuição geográfica da maioria das espécies é bastante ampla ao longo da região neotropical, com preferência a habitats de locais de formação aberta com alto teor de umidade no solo, como beira de córregos e lagos. Esse ambiente facilita a dispersão dos diásporos pela água. Algumas espécies, porém, apresentam distribuição mais restrita (Souza 1996).

Conobea também ocorre em áreas abertas e geralmente com alto teor de umidade no solo (Souza 1996). Há quatro espécies no Brasil, mas para este trabalho só foi possível a obtenção de material de *C. scoparioides*.

Bacopa distingue-se de *Conobea* por características das sépalas. *Conobea* apresenta sépalas com tamanho e forma iguais, enquanto que *Bacopa* apresenta sépalas desiguais, sendo a dorsal mais larga que as ventrais, e estas, por sua vez, mais largas que as medianas (Souza 1996).

Entretanto, em algumas espécies de *Bacopa* (*B. myriophylloides* e *B. reptans*) a diferença entre as sépalas não é tão nítida, o que dificulta o estabelecimento de critérios para distinção entre os dois gêneros.

Em todas as análises baseadas em sequências de regiões do cloroplasto (Figuras 2-7) *C. scoparioides* emerge compartilhando um clado com *Bacopa*. Invariavelmente, a sustentação do clado é a maior possível. Nas análises baseadas em DNA mitocondrial (Figuras 8 e 9), as espécies de *Bacopa* e *Conobea* estão em politomias. No entanto, *Conobea* compartilha um clado com *B. salzmanii*, embora com fraca sustentação pelo método da máxima parcimônia (BS 60, Figura 8). A ausência de mais materiais de *Conobea* impossibilita uma avaliação sobre os relacionamentos filogenéticos entre esse gênero e *Bacopa*. Além disso, fica impossível avaliar a adequação ou não de manter-se a individualidade dos dois gêneros, com base na filogenia molecular. A baixa resolução obtida com as análises baseadas em NAD impossibilita fazer-se qualquer comentário a respeito. Contudo, as análises baseadas em *rps16* e *trnL-trnL-F* não deixam dúvidas de que *Bacopa* e *Conobea* constituem um conjunto monofilético com o mais sólido embasamento (Figuras 2-5). Internamente ao clado, no entanto, não há possibilidade de estabelecer-se a individualidade de *Conobea*: Nas análises baseadas em *rps16*, *Conobea* emerge numa politomia (máxima parcimônia, Figura 2) ou num clado fracamente sustentado (0.94 PP análise bayesiana, Figura 3). Nas análises baseadas em *trnL-trnL-F*, *Conobea* novamente é parte de uma politomia (máxima parcimônia, Figura 4) ou emerge como grupo irmão de *Bacopa*, mas com fraca sustentação (PP 0,83, Figura 5). A indefinição quanto à individualidade de *Conobea* no clado compartilhado com *Bacopa* mantém-se na AC, pois o clado *Conobea/B. myriophylloides/B. reptans/B. salzmanii* recebe fraco apoio, tanto em máxima parcimônia (BS 64, Figura 6) quanto em análise bayesiana (PP 0,79, Figura 7). Essas observações deixam claro que falta consistência, no que se refere à evidência molecular, para o reconhecimento de *Bacopa* e *Conobea* como gêneros distintos.

A taxonomia de *Conobea* provavelmente necessita de reavaliação. A inclusão de uma segunda sequência de *trnL-trnL-F* (*Conobea multifida*, obtida do GenBank) acabou revelando um complicador adicional nos relacionamentos de *Conobea* com outras Gratiolaceae. Enquanto *C. scoparioides* consistentemente compartilha um clado com *Bacopa*, *C. multifida* alinha-se, com apoio moderado (BS 83, Figura 4) ou robusto (PP 1,00, Figura 5) com *Stemodia* e *Scoparia*. Tem-se então forte evidência de que a atual circunscrição de *Conobea* confere-lhe uma condição polifilética.

As análises baseadas em NAD (Figuras 8 e 9) não são congruentes com as análises baseadas em regiões de DNA do cloroplasto, também no que se refere a *Bacopa* e seus

relacionamentos com outros táxons de Gratiolaceae. As espécies de *Bacopa* encontram-se numa politomia envolvendo quatro clados: 1) *B. myriophylloides* e *B. reptans*; 2) *B. angulata*, *B. aquatica*, *B. monnieri*, *B. monnierioides*, *B. scabra* e *B. stricta*; 3) *B. salzmanni* e *Conobea scoparioides*; 4) *B. gratiolloides*, *Mecardonia* e *Stemodia vandellioides*. Todas essas relações recebem sustentação baixa ou negligenciável em máxima parcimônia (Figura 8). Em análise bayesiana, os apoios a esses clado são mais robustos (PP 0.95, 0.96 e 0.99, Figura 9). Comparando-se com a evidência obtida com sequências de DNA do cloroplasto, surpreende principalmente o relacionamento de *B. gratiolloides* com *Mecardonia* e *Stemodia vandellioides*. O que parece ser definitivamente consistente é a afinidade entre *Mecardonia* e *S. vandellioides*, pois também nas análises baseadas em *rps16*, *trnL-trnL-F* e *AC* o clado correspondente é fortemente apoiado (BS 95 ou 100, PP 1,00, Figuras 2-7). No entanto, *B. gratiolloides* não é membro do clado *Mecardonia/Stemodia vandellioides* nessas últimas análises. Análises filogenéticas baseadas em sequências de DNA de outras regiões da mitocôndria e regiões nucleares seriam de grande valor para esclarecer os elos filogenéticos de *B. gratiolloides* com táxons de seu próprio gênero ou de outros gêneros.

Em *Bacopa*, os relacionamentos entre algumas espécies parece serem muito fortes. Um exemplo é o par de espécies *B. angulata/B. monnierioides*. Essas espécies constituem um clado que recebe forte apoio em quase todas as análises (Figuras 2-7, 9), exceto na análise baseada em *NAD* e máxima parcimônia (BS 65, Figura 8). Souza (1996) descreveu a proximidade morfológica destas duas espécies com *B. arenaria*, esperando-se que esta espécie posicione-se próxima na filogenia.

Mecardonia

Mecardonia é representada no Brasil por quatro espécies, entre as quais apenas *M. procumbens* foi incluída nas presentes análises. Esta espécie foi dividida por Souza (1996, 1997) em cinco variedades: *procumbens*, *tenella*, *caespitosa*, *flagellaris* e *herniarioides*. Material das três primeiras variedades foi utilizado neste trabalho. Segundo Rossow (1987 *apud* Souza 1996), *Mecardonia procumbens* var *caespitosa* difere das demais por apresentar a fauce da corola pubescente em ambos os lábios, ao passo que as demais variedades apresentam apenas o lábio ventral da corola pubescente (Souza 1996). Além das sequências obtidas neste trabalho, foi conseguida por importação do GenBank uma sequência de *trnL-trnL-F* de *M. flagellaris*, tratada neste trabalho como variedade de *M. procumbens*, coerentemente com a classificação de Souza

(1996). Nas análises baseadas em *rps16*, *trnL-trnL-F* e *AC*, o conjunto das cinco primeiras variedades constitui um grupo monofilético com elevada sustentação (Figuras 2-7). Nas análises baseadas em *NAD*, o grupo forma com *Stemodia vandellioides* uma politomia (Figuras 8 e 9).

Surpreendentemente, a sequência de *trnL-trnL-F* de *M. procumbens* var. *flagellaris* importada do *GenBank* posicionou esse terminal num clado fortemente sustentado, juntamente com *Scrophularia* (Figuras 4 e 5). Nessa situação, a variedade situa-se, portanto, fora dos domínios de *Gratiolaceae*. Diante dessa posição conflitante com o posicionamento das demais variedades, o alinhamento da matriz foi reexaminado, verificando-se que as diferenças de estado nas sequências de bases entre *M. procumbens* var. *flagellaris* e as demais variedades devem-se a substituições e não a problemas de alinhamento. Acredita-se que pode ter ocorrido algum equívoco no laboratório ou durante o processo de submissão da sequência ao *Genbank*. Na incerteza sobre a razão que teria conduzido a esse inesperado resultado, o terminal em pauta não foi levado em consideração nas *AC* (Figuras 6 e 7).

Em todas as análises baseadas em sequências de DNA do cloroplasto, *Stemodia vandellioides* apresentou-se como grupo irmão de *Mecardonia*, invariavelmente com valores elevados de sustentação (BS 95, 96 e 99, Figuras 2, 4 e 6, respectivamente; PP 1,00, Figuras 3, 5 e 7). Em revisão taxonômica, Souza (1996) descreveu afinidades morfológicas de *Mecardonia* com *Stemodia* e com *Bacopa*. As análises filogenéticas deste trabalho não indicam afinidades entre esses gêneros, com exceção do relacionamento acima comentado entre *Mecardonia* e *S. vandellioides*. Com base em evidências morfológicas, tem-se sugerido a transferência dessa espécie para diversos gêneros, como *Conobea* e *Lindernia*. Os resultados do presente trabalho não apóiam essas propostas.

Philcoxia

Philcoxia é um gênero formalmente incluído em *Plantaginaceae* e endêmico do Brasil, composto por três espécies e distribuído em três estados: *BA*, *MG* e *GO*. Os epítetos específicos originam-se da distribuição geográfica: *P. bahiensis*, *P. goiasensis* e *P. minensis*. *Philcoxia* apresenta caracteres morfológicos raros em gêneros brasileiros de *Scrophulariaceae s.l.* O caule é reduzido e frequentemente subterrâneo, as folhas são peltadas e rosuladas, as flores desprovidas de estaminódio e em cimeiras helicoidais, com androceu formado por dois estames, dotados de anteras monotecas. Em *Scrophulariaceae s.l.*, a presença de folhas peltadas é

exclusiva de *Philcoxia* (Taylor *et al.* 2000). No presente trabalho, apenas uma espécie foi incluída nas análises: *P. minensis*.

Nas análises baseadas em *rps16*, *trnL-trnL-F* e *AC*, *Philcoxia* associa-se a *Stemodia stellata*. O apoio a essa associação na análise baseada em *rps16* é baixo em máxima parcimônia (BS 68, Figura 2), mas alto em análise bayesiana (PP 1,00, Figura 5). Nas análises baseadas em *trnL-trnL-F* e *AC*, o apoio às afinidades entre *Philcoxia* e *Stemodia* é sempre alto (BS 95 e 99, Figuras 4 e 6; PP 1,00, Figuras 5 e 7). Essa relação já havia sido observada no trabalho de Souza *et al.* (comunicação pessoal - Figura 1). As análises baseadas em NAD novamente são incongruentes relativamente aos resultados com sequências de DNA do cloroplasto. Naquelas análises, *Philcoxia* é o grupo irmão de todas as demais *Gratiolaceae* (PP 0,96, Figura 9) ou grupo irmão de *Plantago lanceolata*, mas com fraco apoio (BS 66, Figura 8). Os resultados deste trabalho não apoiam a inclusão de *Philcoxia* em *Plantaginaceae*, mas indicam que ele é membro de *Gratiolaceae*. Portanto, as evidências moleculares não dão suporte à proposta de Fischer (2004 *apud* Rahmanzadeh *et al.* 2005), de relacionamento de *Philcoxia* com gêneros de plantas aquáticas (*Dopatrium*, *Hydrotriche* e *Limnophila*). Observações de Fritsch *et al.* (2007) também são contrárias às observações de Fischer (2004 *apud* Rahmanzadeh *et al.* 2005).

Stemodia

Stemodia é outro gênero incluído correntemente assumido como membro de *Plantaginaceae*. É representado no Brasil por 14 espécies, a maioria ocorrendo em áreas abertas, geralmente com alto teor de umidade no solo. Nove espécies foram incluídas nas presentes análises.

Como já comentado anteriormente, *Stemodia* apresenta-se polifilético nas análises deste trabalho, pois: 1) *S. stellata* é fortemente relacionada com *Philcoxia*; 2) *S. vandellioides*, com *Mecardonia*; 3) *S. foliosa*, *S. trifoliata* e *S. verticillata*, com *Scoparia*; 4) *S. durantifolia*, *S. glabra*, *S. maritima*, *S. microphylla* e *S. veronicoides*, com *Achetaria*, *Gratiola* e *Otacanthus* (Figuras 2-7). Outros trabalhos também mostraram *Stemodia* como um grupo não-monofilético (Souza comunicação pessoal - Figura 1). Em análise filogenética de Fritsch *et al.* (2007) cinco espécies de *Stemodia* posicionaram-se em dois clados, um deles compreendendo também *Achetaria* e *Otacanthus*, e outro, *Scoparia*. Entre as espécies de *Stemodia* que emergiram junto a

Achetaria-Otacanthus estão *S. durantifolia*, e *S. glabra* e *S. schottii*, em concordância com resultados do presente trabalho (Figuras 2-7).

Algumas associações entre espécies de *Stemodia* parecem ser consistentes. Uma delas é *S. glabra/S. durantifolia/S. maritima*, um dos cladogramas internos no clado maior envolvendo *Achetaria*, *Otacanthus* e algumas espécies de *Stemodia*. O suporte para a associação entre aquelas espécies de *Stemodia* é elevado em todas as análises baseadas em *rps16* e *trnL-trnL-F* (Figuras 2-7). Outra forte associação é *S. microphylla/S. veronicoides* (Figuras 2-7). Morfologicamente, essas duas espécies são muito afins, distinguindo-se pelo comprimento do pedicelo e distribuição geográfica (*S. microphylla*: Minas Gerais; *S. veronicoides*: Espírito Santo e Rio de Janeiro, Souza 1996). Em revisão taxômica, Minod (1918), dividiu *Stemodia* em dois grupos: axilares e "spiciflorae". Dentro do grupo axilares, ele fez uma subdivisão em bracteolatae (com brácteas) e ebracteolatae (sem brácteas). Dentro das espécies axilares com brácteas, Minod (1918) reconheceu afinidades entre *S. microphylla* e *S. veronicoides*, por apresentarem folhas orbiculares e sépalas largas. Nesse trabalho, Minod (1918), sugeriu a exclusão de algumas espécies de *Stemodia* e sua transferência para outros gêneros. Entre esses gêneros, estão *Valeria* e *Lendneria*. Desse modo, resultaram as novas combinações nomenclaturais *Valeria trifoliata* (sin. *Stemodia trifoliata*) e *Lendneria verticillata* (sin. *Stemodia verticillata*). Os resultados deste trabalho revelam que a associação entre *Stemodia trifoliata*, *Stemodia verticillata* e *Scoparia* é forte e consistente (Figuras 3-7). Portanto, a proposta de Minod (1918) de posicionamento dessas duas espécies de *Stemodia* em outro gênero encontra respaldo na evidência molecular.

No trabalho de Fritsch *et al.* (2007), *Stemodia* posicionou-se em dois cladogramas: 1) juntamente com *Achetaria* e *Otacanthus*, 2) juntamente com *Scoparia*. Esses resultados são coerentes com as topologias mostradas no presente trabalho (Figuras 2-7).

Tetraulacium

Tetraulacium é um gênero monoespecífico, com ocorrência restrita ao nordeste do Brasil. O gênero se caracteriza por apresentar uma das sépalas diferente das demais e quatro estames férteis, mas com uma das tecas estéril (Souza 1996).

Nas análises do presente trabalho, incluiu-se uma espécie do gênero - *T. veronicaeforme*. Por essas análises, não foi possível obter-se um posicionamento confiável para *Tetraulacium*, a

não ser a constatação de que gênero deve incluir-se entre as Gratiolaceae. Nas análises baseada em NAD, *Tetraulacium* é um integrante de uma grande politomia (Figuras 8 e 9). As análises baseadas em *rps16* também são inconclusivas quanto ao relacionamento de *Tetraulacium* com outros táxons. A sua inserção num clado em que se situam *Philcoxia* e *Stemodia stellata*, como sugerido nas análises baseadas em *trnL-trnL-F* e AC é fracamente apoiada: *trnL-trnL-F* - BS 71, PP 0,93; AC - BS 60, PP 0,76. Análises incluindo mais regiões de DNA possivelmente poderão fornecer bases para o estabelecimento confiável de *Tetraulacium* em Gratiolaceae.

Gratiola

As espécies de *Gratiola* incluídas nas análises foram todas obtidas do GenBank. Há disponibilidade de sequências de *rps16* e *trnL-trnL-F* apenas de *G. pilosa*. De algumas outras espécies (*G. brevifolia*, *G. neglecta* e *G. virginica*) há sequências apenas de *rps16*. Nas análises baseadas nessa região do cloroplasto, *Gratiola* aparece como grupo monofilético com máxima sustentação (BS 100, PP 1,00). O gênero compartilha, com *Achetaria*, *Otacanthus* e várias espécies de *Stemodia*, um clado mediana ou fortemente sustentado nas análises baseadas em *rps16*, *trnL-trnL-F* e AC (*rps16*: BS 91, PP 1,00; *trnL-trnL-F*: BS 83, PP 1,00; AC: 99, PP 1,00, Figuras 2-7).

3. Comentários sobre o grau de polimorfismo molecular entre os indivíduos da mesma espécie

As espécies que foram representadas no presente trabalho com mais de um indivíduo para análises de sequências de *rps16* e *trnL-trnL-F* estão listadas na Tabela 7, na qual são indicadas as diferenças observadas, sejam elas devidas a substituições ou indels.

Relativamente às análises de *rps16*, 23 espécies foram representadas por mais de um indivíduo. Observaram-se em nove espécies sequências idênticas entre os indivíduos, onze mostraram sequências diferindo entre 1 a 20 substituições e três apresentaram indel e/ou substituições (Tabela 7). Nas sequências de *trnL-trnL-F* das 26 espécies, observaram-se nove espécies com sequências idênticas entre os seus representantes, onze com sequências diferindo por causa de substituições, variando em número de 1 a 59, e seis espécies com indivíduos polimórficos em suas sequências por causa de indels e substituições (Tabela 7). De um modo

geral, o número de variações encontradas comparando os dois marcadores do cloroplasto foram semelhantes. Shaw *et al.* (2005) analisaram sequências de Gimnospermas, monocotiledôneas, magnoliídeas, eurosídeas e euasterídeas de 21 regiões do cloroplasto. Comparando essas sequências, calcularam o grau de variabilidade para cada espécie. Uma das espécies analisadas foi *Gratiola*, que apresentou valores elevados de variação (3,11% a 13,14%) quando comparada às outras espécies. Os valores de variabilidade para os marcadores *rps16*, *trnL* e *trnL-trnF*, foram respectivamente 5,39%, 3,49% e 4,83%, condizendo com os valores apresentados na Tabela 7.

Bacopa gratiolloides, *Bacopa salzmanii* e *Mecardonia procumbens* chamam atenção por apresentarem para ambos marcadores um grau elevado de polimorfismo (de 13 a 60). As duas espécies de *Bacopa* tiveram apenas dois indivíduos analisados, apresentando grande variação. O mais alto grau de variação foi encontrado em *Mecardonia procumbens*, que teve nove indivíduos analisados para cada marcador. Observando as filogenias obtidas, na análise baseada em *trnL-trnL-F*, *Mecardonia procumbens* var. *flagellaris* posicionou-se próximo a *Scrophularia* e distante dos demais indivíduos de *Mecardonia* (Figuras 4 e 5). Eliminando-se esse terminal, o número de variações caiu para 14, valor mais próximo do obtido com o marcador *rps16* (20), e chegando a um valor mais próximo do obtido no trabalho de Shaw *et al.* (2005).

Tabela 7 - Números de diferenças (substituições e/ou indels) entre sequências de *rps16* e *trnL-trnL-F* de espécies de Lamiales amostradas com mais de um indivíduo. (- : espécie com um só indivíduo analisado; * : diferenças entre sequências de espécies de *Mecardonia*, um indivíduo de *M. procumbens* var. *flagellaris* que se mostrou afim a *Scrophularia*; **: idem, sem a sequência desse indivíduo).

Espécies	Regiões sequenciadas	
	<i>rps16</i>	<i>trnL-trnL-F</i>
<i>Achetaria ocymoides</i>	idênticas	2 substituições
<i>Achetaria scutellarioides</i>	3 substituições	3 substituições
<i>Angelonia biflora</i>	idênticas	2 substituições
<i>Angelonia pubescens</i>	-	idênticas
<i>Bacopa gratioloides</i>	14 substituições e 1 indel	19 substituições e 1 indel
<i>Bacopa monnieri</i>	5 substituições	4 substituições e 1 indel
<i>Bacopa salzmanii</i>	20 substituições	12 substituições e 1 indel
<i>Capraria biflora</i>	2 substituições	idênticas
<i>Lindernia crustacea</i>	1 substituição	Idênticas
<i>Mecardonia procumbens</i>	20 substituições	59 substituições e 2 indels * 13 substituições e 1 indel **
<i>Otacanthus platyichillus</i>	idênticas	3 substituições
<i>Philcoxia minensis</i>	idênticas	3 substituições
<i>Plantago lanceolata</i>	-	Idênticas
<i>Plantago major</i>	-	1 substituição
<i>Scoparia dulcis</i>	7 substituições	7 substituições
<i>Scoparia ericacea</i>	3 substituições	8 substituições e 1 indel
<i>Scoparia montevidensis</i>	1 substituição	1 substituições
<i>Stemodia durantifolia</i>	3 substituições	1 substituições
<i>Stemodia foliosa</i>	4 substituições e 2 indels	4 substituições e 1 indel
<i>Stemodia maritima</i>	1 substituição	Idênticas
<i>Stemodia microphylla</i>	1 inserção	Idênticas
<i>Stemodia stellata</i>	idênticas	1 substituição
<i>Stemodia trifoliata</i>	idênticas	Idênticas
<i>Stemodia vandellioides</i>	idênticas	Idênticas
<i>Stemodia verticillata</i>	idênticas	5 substituições
<i>Tetraulacium veroniciforme</i>	idênticas	Idênticas

IV. CONCLUSÕES

Gratiolaceae é um grupo monofilético com forte sustentação. Levando-se em conta a sua delimitação em estudos filogenéticos anteriores, os resultados do presente trabalho sugerem que quatro gêneros não pertencem a Gratiolaceae: *Capraria*, *Limosella*, *Lindenbergia* e *Stemodiopsis*. Com as exclusões desses quatro gêneros, Gratiolaceae torna-se monofilética, sendo composta por: *Achetaria*, *Bacopa*, *Conobea*, *Dopatrium*, *Gratiola*, *Hydrotriche*, *Mecardonia*, *Otacanthus*, *Philcoxia*, *Scoparia*, *Stemodia* e *Tetraulacium*.

Lembrando que *Tetraulacium* é monoespecífico, há três outros gêneros monofiléticos nativos do Brasil, robustamente apoiados: *Gratiola*, *Mecardonia* e *Scoparia*.

Achetaria e *Otacanthus*, anteriormente propostos como um único gênero baseado em caracteres morfológicos, são filogeneticamente associados, com forte sustentação.

Entre as espécies de *Scoparia*, há uma correlação entre sua posição na filogenia do gênero e respectiva amplitude de distribuição geográfica: *Scoparia dulcis*, com posição basal no clado, apresenta distribuição ampla no Brasil; segue-se *S. montevidensis*, com distribuição mais restrita nos estados do sul e abrangendo Mato Grosso até parte da Amazônia; *S. pinnatifida* e *S. ericacea*, em posição mais derivada no clado, apresentam distribuição restrita ao sul do Brasil.

A monofilia de *Bacopa* requer a inclusão de *Conobea scoparioides*. *Conobea multifida* é filogeneticamente relacionada a *Scoparia* e a um grupo de espécies de *Stemodia*.

O posicionamento de *Tetraulacium* com outros gêneros é incerto com base nas análises realizadas.

Gratiola é um gênero monofilético e fortemente relacionado a *Achetaria*, *Otacanthus* e a um grupo de espécies de *Stemodia*.

Stemodia é um gênero polifilético: *Stemodia vandellioides* é filogeneticamente próxima de *Mecardonia*; *S. stellata* é próxima de *Philcoxia*; um grupo de espécies de *Stemodia* (*S. durantifolia*, *S. glabra*, *S. maritima*, *S. microphylla* e *S. veronicoides*) é próximo de *Achetaria*-*Otacanthus*; outro grupo de *Stemodia* (*S. foliosa*, *S. trifoliata* e *S. verticillata*) é próximo de *Conobea multifida* e *Scoparia*.

V. RESUMO

O histórico da classificação das Scrophulariaceae inclui muitos tratamentos que diferem na delimitação da família. Algumas propostas incluíram grupos que atualmente correspondem a famílias, como Globulariaceae, Lentibulariaceae, Orobanchaceae, Plantaginaceae e Selaginaceae. A tribo Gratioleae, tradicionalmente incluída em Scrophulariaceae, nos últimos anos vem sendo considerada um grupo de Plantaginaceae. Contudo, em trabalho recente a tribo Gratioleae foi promovida para o nível de família (Gratiolaceae).

Como até o momento o posicionamento dos gêneros em Gratiolaceae tem-se baseado somente em caracteres morfológicos, pretendeu-se neste trabalho estabelecer os relacionamentos de afinidade dentro da família com base em critérios da filogenia molecular. Outro objetivo foi avaliar a monofilia de seus gêneros constituintes.

O estudo compreendeu a obtenção de sequências de DNA mitocondrial (NAD) e do cloroplasto (*rps16* e *trnL-trnL-F*). Inferências filogenéticas foram realizadas com base nas sequências de DNA por meio dos critérios de máxima parcimônia e probabilidades posteriores (análise bayesiana). A congruência das topologias obtidas com análises filogenéticas de parcimônia baseadas em sequências de regiões de DNA individuais foi avaliada por meio do teste ILD.

Os resultados apóiam propostas de estudos filogenéticos anteriores de exclusão de Gratiolaceae de quatro gêneros: *Capraria*, *Limosella*, *Lindenbergia* e *Stemodiopsis*. Com isso, Gratiolaceae assume a condição monofilética, sendo constituída pelos gêneros *Achetaria*, *Bacopa*, *Conobea*, *Dopatrium*, *Gratiola*, *Hydrotriche*, *Mecardonia*, *Otacanthus*, *Philcoxia*, *Scoparia*, *Stemodia* e *Tetraulacium*. Dentre eles, além de *Tetraulacium* (gênero monoespecífico), outros gêneros monofiléticos e bem sustentados são *Gratiola*, *Mecardonia* e *Scoparia*.

Os resultados sugerem a combinação de *Achetaria* e *Otacanthus* num único gênero. Essa proposta foi também sugerida com base em caracteres morfológicos e palinológicos.

No clado de *Scoparia*, observa-se uma correlação entre o posicionamento das espécies e sua distribuição geográfica. A espécie com posição basal no clado (*S. dulcis*) apresenta distribuição mais ampla, seguida de *S. montevidensis* com distribuição mais restrita, abrangendo os estados do sul e chegando ao Mato Grosso e parte da Amazônia. *S. pinnatifida* e *S. ericacea*, em posição mais derivada no clado, apresentam distribuição restrita ao sul do Brasil.

Bacopa é um gênero parafilético, havendo necessidade de inclusão de *Conobea scoparioides* para se conseguir a monofilia. *Conobea multifida* é filogeneticamente relacionada a *Scoparia* e a um grupo de espécies de *Stemodia*.

As análises não permitiram o estabelecimento confiável de relacionamentos entre *Tetraulacium* e os demais gêneros.

Gratiola é um gênero monofilético e fortemente relacionado a *Achetaria*, *Otacanthus* e a um grupo de espécies de *Stemodia*.

Stemodia mostrou-se polifilético nas análises, com as seguintes relações de afinidades filogenéticas: *S. vandellioides* - *Mecardonia*; *S. stellata* - *Philcoxia*; (*S. durantifolia*, *S. glabra*, *S. maritima*, *S. microphylla*, *S. veronicoides*) - (*Achetaria*, *Otacanthus*); (*S. foliosa*, *S. trifoliata* e *S. verticillata*) - (*Scoparia*, *Conobea multifida*). *S. maritima* é a espécie tipo do gênero e somente *S. durantifolia* e *S. glabra* emergiram no mesmo clado que *S. maritima*. *S. microphylla* e *S. veronicoides* formam um clado fortemente sustentado e apoiado também por sinapomorfias morfológicas.

VI. ABSTRACT

The history of Scrophulariaceae has been characterized by different treatments regarding the circumscription of the family. Some proposals have included in the family groups currently recognized as belonging to families such as Globulariaceae, Lentibulariaceae, Orobanchaceae, Plantaginaceae e Selaginaceae. Tribe Gratioleae, traditionally included in Scrophulariaceae, in recent years has been assumed as a member of Plantaginaceae. However, a recent study raised this tribe to family status (Gratiolaceae).

Affinity relationships among Gratiolaceae genera have so far been established on bases of morphological characters. The aim of the present work was to establish affinity relationships inside the family on bases of molecular phylogeny criteria and to test the monophyly of the constituent Gratiolaceae genera.

Sequences of mitochondrial NAD and plastid *rbcl* and *trnL-trnL-F* were obtained. Phylogenetic inferences were obtained based on DNA sequences and maximum parsimony and bayesian analysis. The congruence of topologies based on individual DNA regions were evaluated by means of the ILD test.

The results obtained give support to previous studies which proposed exclusion from Gratiolaceae of four genera: *Capraria*, *Limosella*, *Lindenbergia* e *Stemodiopsis*. In this way, family Gratiolaceae is monophyletic and comprises the genera *Achetaria*, *Bacopa*, *Conobea*, *Dopatrium*, *Gratiola*, *Hydrotriche*, *Mecardonia*, *Otacanthus*, *Philcoxia*, *Scoparia*, *Stemodia* e *Tetraulacium*. Among these, in addition to *Tetraulacium* (a monospecific genus), other monophyleti and strongly supported genera are *Gratiola*, *Mecardonia* e *Scoparia*.

The results suggest merging *Achetaria* and *Otacanthus* into a single genus. The same treatment has been suggested based on morphologic and palynologic characters.

In the *Scoparia* clade a correlation is apparent between the position of species and its geographic distribution. The species with basal position (*S. dulcis*) has wide distribution, followed by *S. montevidensis*, with narrower distribution, covering the southern states and reaching Mato Grosso and part of Amazon. *S. pinnatifida* and *S. ericaceae*, in more derived condition, have distributions restricted to the south of Brazil.

Bacopa is a paraphyletic genus, inclusion of *Conobea scoparioides* being required to reach monophyly. *Conobea multifida* is phylogenetically related to *Scoparia* and a group of *Stemodia*.

The analysis failed to allow a reliable establishment of relationships between *Tetraulacium* and other genera.

Gratiola is monophyletic and strongly linked to *Achetaria*, *Otacanthus* and a group of *Stemodia*.

The latter genus is polyphyletic, the following phylogenic links having been observed: *Stemodia vandellioides* - *Mecardonia*; *S. stellata* - *Philcoxia*; (*S. durantifolia*, *S. glabra*, *S. maritima*, *S. microphylla*, *S. veronicoides*) - (*Achetaria*, *Otacanthus*); (*S. foliosa*, *S. trifoliata* e *S. verticillata*) - (*Scoparia*, *Conobea multifida*). *S. maritima* is the type species in the genus and only *S. durantifolia* and *S. glabra* emerged in the same clade with *S. maritima*. *S. microphylla* and *S. veronicoides* comprise a strongly supported clade, which is further supported by

VII. ANEXOS

Anexo 1

— EDIÇÃO DE SEQUÊNCIAS ATRAVÉS DO BIOEDIT —

Oficina de Filogenia
Antonio Salatino
Cristiane Del Nero Rodrigues
Janeiro/2009

Para esta análise será necessário ter instalado no computador o programa:

- BioEdit

1. Para baixar e instalar o Programa BioEdit

- Acessar a seguinte página: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- Selecionar a sua esquerda o ícone: "**BioEdit.zip (Full install)**"
- Instalar o programa. O BioEdit deve estar obrigatoriamente instalado no C:.

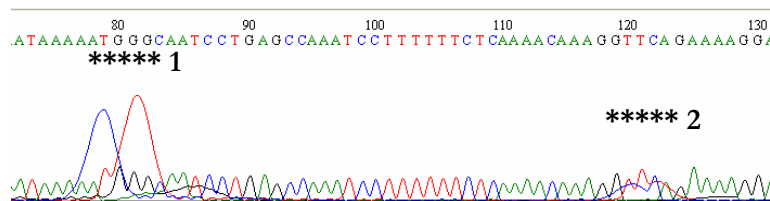
2. Edição da seqüência

1. Para abrir o Programa BioEdit, clicar no menu "Iniciar" → Todos os programas → BioEdit → BioEdit.
2. Para a edição das seqüências é necessário abrir os arquivos dos iniciadores.
3. Com o programa aberto clicar em "File" → "Open" → e selecionar o **iniciador direto**. Ou pode clicar no desenho de uma pasta, logo abaixo de "File", para selecionar a seqüência.
4. Duas janelas serão abertas: "ABI Chromatogram" e "DNA Sequence". Na janela "ABI Chromatogram" pode-se observar a corrida de eletroforese e na janela "DNA Sequence" pode-se observar apenas os nucleotídeos.
5. Nessa última janela ("DNA Sequence"), clicar sobre o nome antes da seqüência de nucleotídeos. Para renomear clicar em sequence → Rename → Edit Title → escrever o nome da espécie e iniciador.
6. Abrir o arquivo do iniciador reverso, clicando em File → Open → clicar sobre o arquivo do iniciador reverso. Repetir o passo no. 5.
7. Para alinhar o iniciador reverso com iniciador direto é necessário fazer o reverso e complemento. Para isso, é necessário que o nome do iniciador reverso esteja iluminado e clicar em "Sequence" → "Nucleic Acid" → "Reverse Complement". Outra opção é iluminar o nome e clicar "Shift+Ctrl+R".
8. Para alinhar é necessário unir as duas seqüências num mesmo arquivo. Para isso, iluminar uma das seqüências e clicar em "Edit" → "Copy sequence". Clicar na outra janela "DNA Sequence" (iniciador direto) e clicar em "Edit" → "Paste sequence", para colar o iniciador reverso.
9. Estando as duas seqüências no mesmo arquivo, pode-se alinhar os dois iniciadores. Iluminar os dois iniciadores, e clicar em "Accessory Application" → "ClustalW Multiple Alignment".

10. Uma nova janela será aberta, clicar na opção "Output Clustal format sequence generation" e clicar em "Run ClustalW" → OK.
11. Uma nova janela "Untitled" estará aberta, mostrando as duas linhas dos iniciadores e a última linha "Clustal Consensus". Esta linha mostrará uma estrela entre as bases idênticas das duas seqüências.
12. Fechar as duas janelas "DNA Sequence".
13. Para fazer a edição da seqüência é necessário posicionar as três janelas na tela. Uma sugestão é posicionar a janela com os nucleotídeos na parte superior, seguida pela janela "ABI Chromatogram" do iniciador direto e na parte de baixo a janela "ABI Chromatogram" do iniciador reverso. Clicar nessa última janela e clicar em "View" → "Reverse Complement". Como no exemplo abaixo:



14. Conferir toda seqüência observando que no começo e no final da seqüência praticamente não há sobreposição. Nessas extremidades tem de ser feita a conferência manual, observando se ocorre algum tipo de problema, como sobreposições de nucleotídeos (*) ou ausência de picos. Nos casos marcados abaixo pode-se observar uma sobreposição, entretanto há uma correta leitura, não sendo feita a leitura dos picos estourados.
15. A partir do momento que houver sobreposição das seqüências, pode-se guiar pela



presença das estrelas, indicando que aquela posição apresenta nucleotídeos idênticos. Todas as alterações que terão de ser feitas, sugere-se que seja feita na linha superior, uma vez que os dois iniciadores representam a mesma seqüência.

16. Quando toda seqüência estiver conferida e corrigida na linha superior, as duas últimas linhas serão eliminadas. Para isso ilumine as duas últimas linhas, apertando a tecla "shift" e clicando com o mouse sobre elas. Clicar em "Edit" → "Cut sequence".

17. Iluminar o nome da linha que sobrou e clicar em "Sequance" → "Rename" → "Edit Title" e digitar o nome da espécie e do marcador. Ao renomear tome cuidado para não utilizar o "espaço", ao invés deste símbolo utilize o "underline" (_) para separar as palavras. Pois se deixar o espaço os programas não irão reconhecer como uma única coisa.
18. Salvar o arquivo: "File" → "Save as" → sugestão digitar o nome e o marcador (Achetaria-rps16) → "Salvar".
19. Repetir todos os passos para cada seqüência.

3. Iniciando a matriz

1. Para unir as seqüências editadas num mesmo arquivo, abra uma das seqüências editadas: "File" → "Open" → nome do arquivo → "Abrir".
2. Para incluir as demais seqüências clicar em "File" → "Import" → "Sequence alignment file" → abrir a pasta que estão às seqüências → trocar a opção em Arquivos do tipo para pasta files (*.fas, *.fst, *.fsa) → selecionar todas as seqüências de interesse → "Abrir".
3. Com todas as seqüências importadas será feito o alinhamento. Iluminar todas as seqüências e clicar em "Accessory Application" → "ClustalW Multiple Alignment" → "Run ClustalW" → "OK".
4. O alinhamento será feito e uma nova janela se abrirá ("Untitled").
5. Clique em "File" → "Save as" → sugestão salvar com o nome do marcador → "Salvar". Percorra todo o alinhamento observando se existe inserções, deleções ou até mesmo locais com o alinhamento estranho. Lembre que o alinhamento feito pelo computador é apenas para facilitar, não estando o seu alinhamento pronto.
6. Prepare uma matriz para o outro marcador.

Antes da matriz adicione algumas linhas. A matriz tem de seguir o seguinte modelo:

```
#Nexus
Begin data;
Dimensions ntax= xx nchar= xx;
Format datatype= DNA Symbols= "0 1 2 3 4" gap= -;
Options gapmode=missing;
Eliminate xx-xx xx-xx xx-xx xxx-xxx xxx-xxx ..... xxxx-xxxx;

Matrix [Começa sua matriz de dados]
nome1      NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
nome2      NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
nome3      NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
...
nomeN      NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
;
End;
```

Os dados não preenchidos correspondem a:

- **ntax**: número de terminais da sua análise;
- **nchar**: número de caracteres totais da sua análise;
- **symbols**: caso não haja eventos a serem codificados, esta opção não é necessária. Os números colocados neste espaço devem compreender aos números utilizados na matriz.
- **eliminate**: números que correspondem às posições dos indels codificados ou regiões ambíguas excluídas.

Preste atenção: se algum dado ou ponto e vírgula faltar na matriz, ao executá-la no programa PAUP este irá mostrar o erro e não será possível continuar o procedimento.

4. Gerando um bloco de comando

Para a análise de parcimônia podemos utilizar o seguinte bloco de comando digitado no WordPad ou Bloco de notas:

```
Begin PAUP;
set autoclose=yes warnreset=no increase=auto;
set criterio=parsimony;
hsearch nreps=1000 nchuck=20 chuckscore=1 addseq=random;
savetrees brlens=yes file= ____hsearch.tre replace=yes;
contree /strict=yes treefile= ____con.tre percent=50 replace=yes;
log start=yes file= ____log replace=yes;
describetrees;
hsearch nreps=1;
bootstrap nreps=100 treefile= boot.tre / start=stepwise addseq=random nreps=10
randomize=addseq hold=1 swap=tbr multrees=yes;
savetrees from=1 to=1 file= ____boot.tre
savebootP= nodelabels maxdecimals=1 replace=yes;
log stop;

END;
```

Através desse bloco de comando será possível realizar diversas etapas como: busca através do método de parcimônia, salvando as melhores árvores; obter e salvar o consenso estrito; obter a descrição das árvores sobre os caracteres, CI e RI; e obter os valores de "bootstrap" para os ramos.

Neste bloco de comando o critério selecionado foi à parcimônia (linha 3), sendo descrita na linha seguinte os seus parâmetros com: 1000 réplicas, retenção de 20 árvores para cada busca e adição das seqüências de modo aleatório (randômico). A linha 6 mostra o comando para o consenso estrito e o arquivo que será salvo (treefile= _____con.tre). Na posição onde se encontra o "underline" substituí-se pelo nome desejado para o arquivo.

Na linha 7 será criado um arquivo log, onde serão guardadas todas as informações das próximas linhas de comando. Na linha 8 serão descritos os dados sobre a árvore. Nas próximas linhas serão gerados os valores de "bootstrap" e sendo salvo um de suas árvores.

5. Executando a matriz no PAUP

Cole os seus arquivos da matriz e do bloco de comando na raiz do programa. Abra o programa PAUP e execute sua matriz da seguinte forma:

```
execute nomedasuamatriz.txt; <enter>
```

Verifique se o programa aceitou sua matriz mostrando sua descrição. Caso não tenha aceitado corrija o(s) erro(s) apontados pelo programa. Muita paciência nessa hora.

```
Processing of file "nomedoarquivo.txt" begins...
```

```
Data read in DNA format
```

```
Data matrix has xx taxa, xxxx characters
```

```
xxx characters excluded via "Eliminate" command.
```

```
Valid character-state symbols: 012..89ACGT
```

```
Missing data identified by '?'
```

```
Gaps identified by '-'
```

```
"Equate" macros in effect:
```

```
  R,r => {AG}
```

```
  Y,y => {CT}
```

```
  M,m => {AC}
```

```
  K,k => {GT}
```

```
  S,s => {CG}
```

```
  W,w => {AT}
```

```
  H,h => {ACT}
```

```
  B,b => {CGT}
```

```
  V,v => {ACG}
```

```
  D,d => {AGT}
```

```
  N,n => {ACGT}
```

```
Processing of file "nomedoarquivo.txt" completed.
```

A seguir execute o bloco de comando da seguinte forma:

exe nomedoblocodecomando.txt; <enter>

Repetir o mesmo procedimento para o outro marcador.

Ao terminar todos os comandos digitar **quit;** <enter> para sair do programa.

6. Combinando os dois marcadores

1. Para analisar simultaneamente os dados dos dois marcadores abra um dos arquivos das matrizes do bloco de nota(A), considere este arquivo como base. Abra o outro marcador (B) e copie a matriz. Cole a matriz (B) no arquivo da matriz (A), abaixo da matriz (A). Confira se os seus terminais estão exatamente na mesma ordem e com os nomes idênticos.
2. No exemplo abaixo a matriz apresenta três marcadores. Se quiser pode identificar cada matriz, desde que o comentário esteja entre colchetes [rps16]. Qualquer comentário ou informação que seja colocado entre colchetes não é lido pelo programa.
3. Verifique se o número de terminais é o mesmo (**ntax**). Se os dois marcadores apresentam mesmo número de terminais e exatamente os mesmos terminais, é só prosseguir. Entretanto se um dos marcadores não possuir o mesmo número de terminais, este que falta deverá ser eliminado da outra matriz.
4. Os caracteres será a soma dos seus marcadores (**Nchar**). O comando que o programa irá reconhecer que existe mais de uma matriz é o comando "Interleave".

#NEXUS

[atpb - 1o. , rps16 - 2o. e trnlf - 3o.]

BEGIN DATA;

DIMENSIONS NTAX=18 NCHAR= 2947;

FORMAT DATATYPE= DNA Symbols= "0 1 2 3 4" GAP= - INTERLEAVE;

OPTIONS GAPMODE=MISSING;

ELIMINATE 36-40 89-93 98-103 1336-1340 1348-1349 1367-1371 1438 2469-2476 2594-2620 2629-2633;

MATRIX

[atpB-rbcL]

Thalia_geniculata	AAGGTCTACTCGATATGGATTAT-
Maranta_sp3	AAGGTCTACTCGATATAGATTAT-
Monotagma_densiflorum	AAGGTCTACTCGATAGGGATTAG-
Maranta_humilis	AAGGTCTACTCGATATAGATTAT-

[rps16]

Thalia_geniculata	AACACTATTTTCAATTGTCTCAAAAATTGGATTAG
Maranta_sp3	AAAAAACA AAAAGGTATGTTGCTGTCTTTTTGAAA
Monotagma_densiflorum	AACACTATTTTCAATTGTCTCAAAAATTGGATTAG
Maranta_humilis	AAAAAACA AAAAGGTATGTTGCTGTCTTTTTGAAA

[trnl-f]

Thalia_geniculata	AAAAATGGCAATCCTGAGCCAAATCCTTTTTTTTTA
Maranta_sp3	TAGATAGATATAATATCTCTACAAATGAACATATA
Monotagma_densiflorum	AAAAATGGCAATCCTGAGCCAAATCCTTATTTTTA
Maranta_humilis	GAATCCGTCTTTCAAAAATTACAGAAAAGATGTTTCT

;

END;

5. É preciso tomar cuidado com o comando "eliminate" (mostra quais regiões da seqüência tem de ser eliminadas). Caso apenas uma matriz apresente regiões eliminadas é conveniente que esta fique em primeiro, bastando copiar a linha de comando "eliminate" da matriz original e colar. Entretanto se mais de uma matriz apresenta regiões eliminadas, você terá de somar o número de caracteres na matriz anterior.

Por exemplo:

Matriz 1 - 1000 caracteres Eliminate 10-20 76-81
Matriz 2 - 500 caracteres Eliminate 20-30 50-60 80-90 (SOMAR 1000)
Matriz 3 - 700 caracteres Eliminate 100-110 170-190 (SOMAR 1500)

Ao unirmos todos os dados teremos de somar os caracteres das matrizes anteriores é:

Eliminate 10-20 76-81 1020-1030 1050-1060 1080-1090 1600-1610 1670-1690

6. Sendo feita todas as alterações salvar o arquivo da matriz combinada. Sugestão indicar os nomes dos marcadores (rps-trnlf).
7. Com a matriz pronta pode-se criar o bloco de comando e rodar o programa. Para isso repita os passos: **4. Gerando um bloco de comando e 5. Executando a matriz no PAUP.**

Anexo 3

— TESTE DE CONGRUÊNCIA (ILD) —

Oficina de Filogenia
Antonio Salatino
Cristiane Del Nero Rodrigues
Janeiro/2009

Programas necessários:

- PAUP
- Bloco de Notas

O teste de congruência é realizado quando dois ou mais dados são combinados.

1. Criando um bloco de comando

1. Abra o programa de Bloco de Notas e digitar as seguintes linhas de comandos:

```
#nexus  
Begin PAUP;  
log file=ildtest.log;  
hompert partition=[nome] nreps=100 / start=stepwise addseq=random nreps=10 savereps=no  
randomize=addseq rstatus=no hold=1 swap=tbr multrees=yes;  
log stop;  
end ;
```

2. A 3ª. linha (log file=ildtest.log;) mostra o comando que irá salvar no arquivo ildtest.log todas as informações que aparecerem na tela do computador. A seguir inicia-se a linha de comando para fazer o teste de partição. Na posição [nome], mas a frente será explicado o que escrever (2. **Complementando informações na Matriz combinada** - item 5). Os demais comandos já foram no comentados no Anexo anterior (Parcimônia) no tópico 4. **Gerando um bloco de comando**.
3. Salvar o arquivo. Por exemplo: ild.txt.
4. Esta análise será feita no programa PAUP. Para isso recorte o arquivo e cole na mesma pasta do programa PAUP.

2. Complementando informações na Matriz combinada

1. Abrir o arquivo que contém as matrizes combinadas no bloco de notas.
2. Após o final da matriz e ;END; serão adicionados os comandos para o teste (exemplo abaixo).
3. O bloco deve ser iniciado pela linha "Begin sets;". A seguir virá discriminado o bloco de dados "charset dn = xxxx-xxxx;"; seguido da linha que irá comparar os dados "charpartition REGIOES = REGIAO1:d1, REGIAO2:d2,....., REGIAOn:dn;". O bloco deve ser terminado com "END;";

Exemplo:

Matrix

```

[atpB-rbcL]
Thalia_geniculata      AAGGTCTACTCGATATGGATTAT-
Maranta_sp3            AAGGTCTACTCGATATAGATTAT-
Monotagma_densiflorum AAGGTCTACTCGATAGGGATTAG-
Maranta_humilis        AAGGTCTACTCGATATAGATTAT-

[rps16]
Thalia_geniculata      AACACTATTTTCAATTGTCTCAAAAATTGGATTAG
Maranta_sp3            AAAAAAACAAAAGGTATGTTGCTGTCTTTTTGAAA
Monotagma_densiflorum AACACTATTTTCAATTGTCTCAAAAATTGGATTAG
Maranta_humilis        AAAAAAACAAAAGGTATGTTGCTGTCTTTTTGAAA

[trnl-f]
Thalia_geniculata      AAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTTTTTTTTTTA
Maranta_sp3            TAGATAGATATAATATCTCTACAAATGAACATATA
Monotagma_densiflorum AAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTTATTTTTTA
Maranta_humilis        GAATCCGTCTTTCAAATTACAGAAAAGATGTTCCCT
:END;      (Final da matriz)

```

```

BEGIN SETS;
CHARSET dataset1= 1-943;          (1º. bloco de dados)
CHARSET dataset2= 944-1633;      (2º. bloco de dados)
CHARSET dataset3= 1634-2488;     (3º. bloco de dados)
CHARPARTITION dataset1.dataset2.dataset3= dataset1:dataset1, dataset2:dataset2,
dataset3:dataset3;
END;
(Para dois dados)
Begin sets;
  charset d1 = 1-1057;            (1º. bloco de dados)
  charset d2 = 1058-2007;        (2º. bloco de dados)
  charpartition REGIOES = REGIAO1:d1, REGIAO2:d2;
End;

```

```

(Para três dados)
Begin sets;
  charset d1 = 1-1057;            (1º. bloco de dados)
  charset d2 = 1058-2007;        (2º. bloco de dados)
  charset d3 = 2008-.;           (3º. bloco de dados)
  charpartition REGIOES = REGIAO1:d1, REGIAO2:d2, REGIAO3:d3;
End;

```

4. Salvar o arquivo.
5. Certifique-se que o nome dado após "charpartition" seja o mesmo que dentro da matrix e no bloco de comando (hompert charpartition= [nome]).
6. Esta análise será feita no programa PAUP. Para isso recorte o arquivo e cole na mesma pasta do programa PAUP.

3. Executando o comando ILD

1. Abra o programa PAUP. Execute o arquivo da matriz combinada:

execute nomedoarquivo.txt; <enter>

2. Para iniciar a análise de partição executar o bloco de comando:

execute ild.txt; <enter>

3. Quando terminar a análise o programa irá apresentar um valor para P. Como a hipótese nula é que os dados são homogêneos, quando o valor de P for menor ou igual a 0,05 os dados são considerados incongruentes.

Anexo 4

— ANÁLISE BAYESIANA EM "WINDOWS" —

Oficina de Filogenia
Antonio Salatino
Cristiane Del Nero Rodrigues
Janeiro/2009

Para esta análise será necessário ter instalado no computador três programas:

- PAUP
- MrMODELTEST
- MrBAYES.

1. Para baixar e instalar os programas

- O programa PAUP sera usada a versão DOS : (**win-paup4b10-console**).
- Para o programa MrModeltest entrar na seguinte página: <http://www.abc.se/~nylander/>
Observar que encontra-se disponível a versão MrModeltest 2.3. Se clicar em Readme., terá mais informações sobre o programa. E em download selecionar a melhor versão de acordo com o seu computador (WIN, MACOSX ou UNIX).
- Para o programa MrBayes entrar na página: <http://mrbayes.csit.fsu.edu/>
Clicar em Download e baixar a melhor versão para o seu computador.

2. Escolha do modelo evolutivo e montagem da matrix para um marcador

1. Abra o programa PAUP.
2. A matriz deve conter um cabeçalho utilizado para o programa PAUP. Execute sua matriz com os dados molecular. Para isso selecione a opção **FILE → OPEN**. (versão windows) ou digite a seguinte linha de comando (versão DOS): > **execute nomedoarquivo.nex**; . (O arquivo deve estar na mesma pasta que o programa Paup).
3. Copiar o arquivo MrModelblock dentro da pasta do programa MrModeltest2. Colar este arquivo na mesma pasta que o programa Paup. Executar o arquivo Mrmodelblock, digitando a linha de comando: > **execute mrmmodelblock**;
4. Irá aparecer na tela os diversos testes realizados pelo programa (os modelos evolutivos).
5. Serão criados dois arquivos **mrmmodel.scores** e **mrmmodelfit**. Estes arquivos podem ser renomeados se achar necessidade.
6. Procure o lugar onde foi salvo o arquivo **mrmmodel.scores** (na pasta do programa PAUP). Copie o arquivo.
7. Cole o arquivo no diretório C: do Windows. Nesse mesmo local também deve estar localizado o programa MrModeltest2.
8. Abra o **prompt de comando**, para isso clique em **Iniciar → Todos os programas → Acessórios → Prompt de comando**. Irá abrir a tela de DOS dentro do Windows.
9. Para chegar até a raiz (C:), dê o comando **cd** e tecla **enter** para chegar em C:/.
10. Digite a linha de comando **mrmmodeltest2 < mrmmodel.scores > modelos.out** e tecla **enter**. Irá aparecer uma mensagem **Program is done**.
11. Digite **exit <enter>**.
12. Abra o arquivo **modelos.out** no bloco de notas. No documento haverá dois blocos de comandos: um para o PAUP para se fazer análise de Máxima verossimilhança e depois o

bloco para análise bayesiana (**MrBayes**). Ache a análise referente a hLRT (HIERARCHICAL LIKELIHOOD RATIO TESTS). Procure no final do bloco hLRT a linha de comando referente à análise bayesiana (MrBayes). Copiar desde alinha que começa com a chave (! até o comando **END**);).

```
[!  
MrBayes settings for the best-fit model (xxx+x+x) selected by hLRT in MrModeltest 2.2  
]  
BEGIN MRBAYES;  
  Prset statefreqpr=xxxxxxxxxx;  
  Lset nst=x rates=xxxxxx;  
END;
```

13. Abra a matriz rodada no Paup no bloco de notas e cole as linhas de comando no final do arquivo. Salvar a matriz num novo arquivo, por exemplo, matrizbay.txt. Deletar a linha de comando **OPTIONS GAPMODE=MISSING**; . Se houver a linha de comando **Eliminate**, substituir pela palavra **Exclude**. Recortar e colar depois do END; da matriz e antes das linhas de comando para análise bayesiana. Caso haja codificação (0,1,2,...) deve ser alterada a linha para **FORMAT DATATYPE= MIXED(DNA:1-333, STANDARD:334-340)**. O primeiro conjunto de números (1-333), corresponde a sua seqüência de dna e o segundo conjunto de números corresponde as duas codificações (0,1,2,...). Depois da matriz achar a linha de comando **Begin Mrbayes**; . Deve-se adicionar uma linha de comando para cada bloco de dados, dizendo onde começa e onde termina cada um (charset nome do bloco = seu tamanho;). As duas linhas que estão a seguir correspondem para qual desses blocos de comando será utilizado esse modelo evolutivo (no caso apenas para o bloco de dna - charset d1 ou (1)) Ex:

```
BEGIN MRBAYES;  
charset d1 = 1-1107;  
charset d2 = 1108-1144;  
  Prset applyto=(1) statefreqpr=dirichlet(1,1,1,1);  
  Lset applyto=(1) nst=6 rates=invgamma;  
END;
```

Salvar e fechar o bloco de notas.

3. Análise bayesiana e probabilidades posteriores

14. Abra o programa MrBayes.
 15. Copiar o arquivo **matrizbay.txt** para a pasta do programa MrBayes. Para executar a matriz digite **execute matrizbay.txt**; <enter>.
- Irá analisar a matriz mostrando informações a seu respeito.

```
Executing file "matrizbay.txt"  
DOS line termination  
Longest line length = xxxx  
Parsing file  
Expecting NEXUS formatted file  
Reading data block  
  Allocated matrix
```

Matrix has xx taxa and xxxx characters
 Data is DNA
 Gaps coded as -
 Setting default partition (does not divide up characters).
 Taxon 1 → nome1
 Taxon 2 → nome2
 ...
 Taxon N → nomeN
 Setting output file names to "matrizbay.txt.run<i>.<p/t>"
 Successfully read matrix
 Exiting data block
 Excluding character(s)
 Reading MrBayes block
 Setting statefreqpr to xxxxxxxxxxxxxx(x,x,x,x)
 Successfully set prior model parameters
 Setting Nst to x
 Setting rates to xxxxx
 Successfully set likelihood model parameters
 Exiting MrBayes block
 Reached end of file

16. Caso sua matriz não segue até sua leitura final é necessário corrigir o que o programa indica. Muita paciência nessa hora.
17. Para iniciar a análise digita-se uma linha de comando como por exemplo:

mcmc ngen=1000000 nruns=2 nchains=4 printfreq=1000 samplefreq=1000;

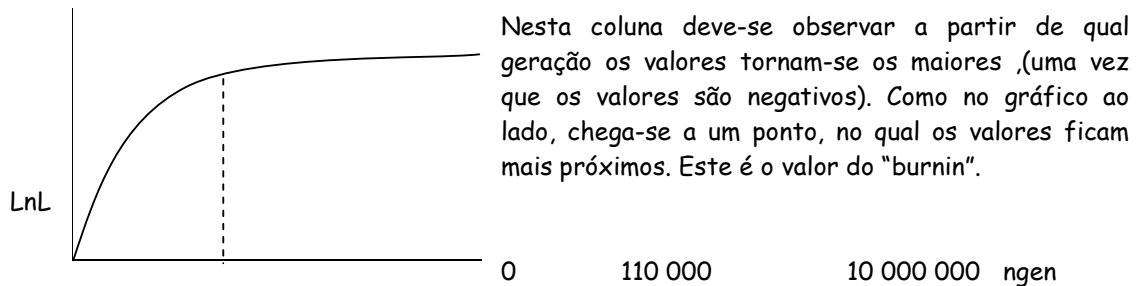
Esta linha de comando significa:

- mcmc: para iniciar a análise
- ngen: o número de busca que será feita em cada cadeia
- nruns: o número de corridas simultâneas, mas independentes
- nchains: o número de cadeias utilizadas para cada corrida
- printfreq: será mostrado na tela a cada 1000 buscas os valores encontrados
- samplefreq: será salvo os valores no arquivo (matrizbay.run.t) a cada 1000 buscas

18. Executando esse comando irá aparecer na tela (a cada 1000 buscas) os menores valores encontrados para as 4 cadeias (os valores entre os 3 (xxx) - cadeias frias e 1 [xxx] - cadeia quente) e para as duas corridas (são separadas pelo *). No final da linha irá ficar o tempo estimado para o término da análise (X:XX:XX):

1000 – (-2847.80) (-2850.15) (-2860.13) [-2750.66] * (-2832.80) (-2855.77) [-2800.13] (-2810.66) – X:XX:XX

19. Terminando o número de réplicas proposto, o programa irá perguntar se quer continuar ou não com a análise. Digitando N a análise é terminada. Minimizar o programa MrBayes.
20. Abrir no WordPad ou bloco de notas os arquivos matrizbay.txt.run1 e matrizbay.txt.run2 (arquivos p).
21. Ao abri-los pode-se observar diversas colunas. Na primeira encontram-se as gerações salvas. Na segunda coluna apresentam-se os "comprimentos" das árvores (LnL).



O "burnin" é o valor que será utilizado para descartar as árvores antes desse ponto. Por exemplo: Numa análise com 1 milhão de gerações e salvando uma a cada 1000 gerações $[(1\text{milhão}/1000) + 1]$, temos uma total de 100.001 árvores salvas. Observando que o ponto, onde a análise mantém seu valor é de 110.000, o valor do "burnin" é de 110 (110.000/1000 - gerações/samplefreq). (logo as 110 primeiras árvores serão descartadas).

22. Voltar para o programa MrBayes.
23. Abrir um bloco de log. (**log start** ; <enter>)
24. Para obter as probabilidades posteriores e o consenso de maioria, entrar com a seguinte linha de comando:

```
sumt burnin=xxx contype=halfcompat showtreeprobs=no nruns=2;
```

Diversos arquivos serão criados. No arquivo matrizbay.txt.con será salvo uma árvore de consenso de maioria para cada corrida (duas árvores). No arquivo log criado (log.out) estarão as probabilidades posteriores para os ramos.

25. Ao terminar de calcular todas as probabilidades, entrar com a linha de comando para fechar o arquivo log. (**log stop**; <enter>)
26. Repetir todo o procedimento para o outro marcador.
27. Para sair do programa digitar: **quit**; <enter>

4. Combinando os dois marcadores

1. Abra o arquivo com os marcadores combinados no bloco de notas. É a mesma matriz utilizada na análise de parcimônia combinada.
2. Se os dois marcadores apresentam mesmo número de terminais e exatamente os mesmos terminais, será utilizado os modelos evolutivos analisados anteriormente. Entretanto se um dos marcadores não possuir o mesmo número de terminais terá de se calcular novamente o modelo evolutivo para cada marcador sem esses terminais.
3. Salve a matriz com outro nome. Exemplo: rpstrnlfbay.txt
4. No cabeçalho da matriz, deletar a linha de comando **OPTIONS GAPMODE=MISSING;**. Se houver a linha de comando **Eliminate**, substituir pela palavra **Exclude**. Recortar e colar depois do END; da matriz. Editar a linha para **FORMAT DATATYPE=MIXED(DNA:1-1107, STANDARD:1108-1144, DNA:1145-2330, STANDARD:2331-2335)**. O primeiro conjunto de números (1-1107), corresponde à seqüência de dna da 1ª. matriz e o segundo conjunto de números corresponde as codificações da 1ª. matriz (0,1,2,...). O conjunto de números de 1145-2330 corresponde as sequencias da 2ª. matriz, enquanto que o conjunto de números de 2331-2335 corresponde as codificações do 2ª. matriz. Depois do comando EXCLUDED digitar a linha de comando **Begin Mrbayes;**. Adicionar uma linha de comando para cada bloco de dados, dizendo onde

começa e onde termina cada um (charset nome do bloco = seu tamanho;) e adicionar os modelos evolutivos e indicar para qual bloco deve ser utilizado. Terminar com **END;**. Ex:

```
BEGIN MRBAYES;  
charset d1 = 1-1107; } 1º. marcador  
charset d2 = 1108-1144; }  
charset d3 = 1145-2330; } 2º. marcador  
charset d4 = 2331-2335; }  
Prset applyto=(1,3) statefreqpr=dirichlet(1,1,1,1);  
Lset applyto=(1) nst=6 rates=invgamma;  
Lset applyto=(3) nst=2 rates=gamma;  
END;
```

5. Salvar e fechar o bloco de notas.
6. Repetir todos os procedimentos de 3. **Análise bayesiana e probabilidades posteriores.**

Anexo 5

— EDIÇÃO DAS ÁRVORES PELO TREE GRAPH —

Oficina de Filogenia
Antonio Salatino
Cristiane Del Nero Rodrigues
Janeiro/2009

Para esta análise será necessário ter instalado no computador dois programas:

- TreeView
- Tree Graph
- Crimson Editor
- Inkscape

1. Para baixar e instalar os Programas

- Tree Graph entrar na página:

<http://www.math.uni-bonn.de/people/jmueller/extra/treegraph/>

e baixar o programa compatível com o seu computador.

- Crimson Editor entrar na página: <http://www.crimsoneditor.com/>

Clicar em "Download the lastest release - V3.70 release".

- TreeView vendo dentro do pacote do programa BioEdit.

- Inkscape pode ser baixado através da página:

<http://www.baixaki.com.br/download/inkscape.htm>

2. Como fazer uma árvore pelo Tree Graph

1. Para os arquivos de árvore gerados no programa PAUP não é necessário fazer nenhuma alteração, a não ser que sua árvore não esteja enraizada no seu grupo externo. Para a árvore gerada através do programa MrBayes é necessário verificar se está enraizada a árvore e salvar o arquivo na extensão .nex.
2. Para ambos os casos abrir o programa TreeView e abrir o arquivo (**File** → **Open** → escolher o seu arquivo .tre). Para enraizar no grupo externo **Tree** → **Define Outgroup**, escolher na lista de espécie **ingroup** a que será o grupo externo clicando na espécie. Clicar na caixa com o símbolo >> para transferir para a caixa **outgroup**. Clicar **OK**. Selecionar **Tree** → **Root with Outgroup**, sua árvore já estará enraizada no grupo externo.
3. Clicar em **File** → **Save As**, marcar duas opções Root with outgroup e Include internal edge labels. Escolher a terminação como **NEXUS(TREES BLOCK ONLY)** Fechar o programa **File** → **Exit**.
4. Copiar o arquivo da sua árvore no mesmo local que se encontra o programa Tree Graph.
5. Abrir o programa Tree Graph.
6. Tecla "?" para ver as linhas de comando.
7. Linhas de comando:

l loads tree from TGF file

t translates NEXUS to TGF file

```

s saves current tree as tgf file
n saves current tree as NEXUS file
p writes current tree into EPS file
v writes current tree into SVG file
e edit mode
F show settings
f show font path
q quits program

```

8. Transforme seu arquivo nexus em extensão TGF. Digite: t <enter> depois digite o nome do arquivo (.tree ou .tre) e tecla <enter>.
9. Será criado um novo arquivo com o mesmo nome e uma nova extensão TGF.
10. Carregue o novo arquivo criado com extensão TGF. Digite: l <enter> depois o nome do arquivo.TGF.
11. Abra o último arquivo criado no programa Crimson Editor. O arquivo terá uma estrutura parecida com o exemplo abaixo, dividido em duas partes: uma descrevendo os parâmetros da árvore (inicia no **\begindef** e termina no **\enddef**) e a parte seguinte mostrando os terminais da árvore. Os comentários sobre a linha de comando estão escritos em negrito. Alguns parâmetros que estão presentes neste bloco de comando não aparecem quando criado pelo programa como: **paper** e **landscape**. Como cada árvore irá apresentar um tamanho diferente, os valores de largura e altura (**width** e **height**) tem de ser alterado. Outros parâmetros também podem ser alterados como margem da figura (margin), espessura dos traços, o tamanho da letra de textos ou números, assim como em itálico, negrito ou outros.

```

%
%
% NOTE: This tree has been imported from NEXUS.
%   You should use 'save' (command s) to make the
%   tree part more readable.
%

```

\begindef

```

\name{con 50 majrule} % imported from NEXUS file
\version{1.0} % version of treegraph file format

```

```

%
% tree geometry
%
\width{200} % width in mm (largura da árvore, sem considerar os nomes das espécies)
\height{406} % height in mm (altura da árvore, sem considerar os nomes das espécies)
\paper{a4} (tamanho do papel utilizado) se utilizar {a0} não tem tamanho limitando a

```

página

```

\landscape (posicionamento da árvore no papel - retrato ou paisagem)
% \autolength % ignore len{} in nodes
% \variable

```

```

%
% layout

```



```

%
\roundness{0.2} % between 0.0 and 1.0 (varia se os cantos da árvore são redondos - 1 ou
quadrados - 0)
\thickness{0.3} % in mm (espessura das linhas da árvore)
\margin{20}{0}{20}{40} % left top right bottom, in mm (margem da figura, lembrar que a
medida está em mm. Pode colocar 10, 20, 10, 10)
\style{default}{plain}{9.6} (tamanho dos números nos ramos)
\style{r}{plain}{12} (tipo da letra dos nomes das espécies, ideal colocar italic no lugar de
plain)

% \style{u1}{plain}{9.6} (índice de suporte no. 1)
% \style{d1}{italic}{9.6} (índice de suporte no. 2)
% \style{u2}{bold}{8.4} (índice de suporte no. 3)
% \style{br}{plain}{14.4}
% \rulepos{5}{20}
% position of rule
% \separator{:}
% \proof

%
% brackets
%
% \bracket{0}{n1}{n2}{example text} (coloca o nome nos grupos marcados pelo nós -
label{nXX} na horizontal)
% \brace*{1.5}{root}{root}{example text} (coloca o nome nos grupos marcados pelos nós -
label{nXX} na vertical)

\enddef

("Lindernia crustacea B"
,"Torenia thouarsii"
,"Lindernia crustacea A"
,(("Cobitanthus alatus"
,(("Jacaranda racemosa"
,"Schlegelia"
,"Arrabideae sceptrum"
,"Lippia sp"
)"0.86"
,("Capraria biflora A"
,"Capraria biflora B"
)"1.00"
,"Bacopa monnieri B"
)"1.00"
)"1.00"
,"Micranthemum umbrosum"
)"1.00"
)
)

```

12. Salvar o arquivo e carregar novamente no programa TreeGraph, | <enter> e depois digitar o nome do arquivo salvo no Crimson com sua extensão (.tgf).

13. Se as dimensões estiverem pequenas o programa irá comentar quanto falta e se é na largura e/ou no comprimento. Se isto ocorrer abrir novamente no programa Crimson e adequar sua árvore.
14. Quando abrir o arquivo e não apresentar mais problemas de largura ou páginas (l <enter> digitar o nome do arquivo.tgf), o arquivo está pronto para ser salvo na extensão .svg. Digitar v <enter> e depois digitar o nome do arquivo que será salvo a árvore.
15. Abrir o programa Inkscape e abrir o arquivo .svg e será visualizada a árvore gerada.
16. Podem ser feitas diversas alterações nesse programa, como nome das espécies, tamanho e tipo da letra, cores e outros.
17. Para salvar a árvore num arquivo de figura, entrar em **Arquivo** → **Exportar figura**. Abrirá uma nova janela e selecione a opção **Figura** em exportar área. Depois basta clicar em **exportar**. Essa figura pode ser inserida dentro dos programas Word ou Power Point. Outra opção é salvar a árvore no formato pdf. Para isso clique em "Arquivo" → "Salvar cópia" → e trocar a opção "Inkscape SVG(*.svg)" por PDF(*.pdf) → "Salvar".

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albach D.C., Chase M.W. 2004. Incongruence in Veroniceae (Plantaginaceae): evidence from two plastid and a nuclear ribosomal DNA region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32:183-197.
- Albach D.C., Martinez Ortega M.M., Chase M.W. 2004. Veronica: Parallel morphological evolution and phylogeography in the Mediterranean. *Plant Systematics and Evolution* 246: 177-194.
- Albach D.C., Meudt H.M., Oxelman B. 2005. Piecing together the "new" Plantaginaceae. *American Journal of Botany* 92(2): 297-315.
- Asmussen C.B., Chase M.W. 2001. Coding and noncoding plastid DNA in Palm systematics. *American Journal of Botany* 88 (6): 1103-1117.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group) 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of Missouri Botanical Garden* 85: 531-553.
- APG II. 2003. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436.
- Barker F.K., Lutzoni F.M. 2002. The utility of the incongruence length difference test. *Systematic Biology* 51(4): 625-637.
- Barringer K. 1993. Five new tribes in the Scrophulariaceae. *Novon* 3 (1): 15-17.
- Barroso, G.M. 1952. Scrophulariaceae indígenas e exóticas do Brasil. *Rodriguesia*. 15(27): 9-64.
- Bentham G. 1846. Scrophularinae in A De Candolle, *Prodromus Systematics Naturalis Regni Vegetabilis* 10: 186-586.
- Bentham G.M. 1876. Scrophulariaceae in Bentham, G. & Hooker, J.D. 1876. *Genera Plantarum* 2(2):913-980. Londres.
- Bremer B., Bremer K., Heidari N., Erixon P., Olmstead R.G., Anderberg A.A., Kallersjo M., Barkhordarian E. 2002. Phylogenetics of asterids based on 3 coding and 3 non-coding chloroplast DNA markers and the utility of non-coding DNA at higher taxonomic levels. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 24(2): 274-301.
- Chase M.W., Soltis D.E., Olmstead R.G., Morgan D., Les D.H., Mishler B.D., Duvall M.R., Price R.A., Hills H.G., Qiu Y.L., Kron K.A., Rettig J.H., Conti E., Palmer J.D., Manhart J.R., Sytsma K.J.,

- Michaels H.J., Kress W.J., Karol K.G., Clark W.D., Hedren M., Gaut B.S., Jansen R.K., Kim K.J., Wimpee C.F., Smith J.F., Furnier G.R., Strauss S.H., Xiang Q.Y., Plunkett G.M., Soltis P.S., Swensen S.M., Williams S.E., Gadek P.A., Quinn C.J., Eguiarte L.E., Golenberg E., Learn G.H., Graham S.W., Barrett S.C.H., Dayanandan S., Albert V.A. 1993. Phylogenetics of seed plants - An analysis of nucleotide-sequences from the plastid gene *rbcl*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80 (3): 528-580.
- Cronquist A. 1981. The evolution and classification of flowering plants Bronx, N.Y., USA : New York Botanical Garden.
- Dahlgren R, Clifford H.T, Yeo P.F. 1985. The families of the monocotyledons: structure, evolution, and taxonomy. Berlin; New York: Springer-Verlag.
- Doolittle, W.F. 1999. Phylogenetic classification and the universal tree (taxonomies based on molecular sequences). *Science* 284: 2124-2126.
- Dumolin-Lapègue S., Pemonge M.-H., Petit R.J. 1998. Association between chloroplast and mitochondrial lineages in oaks. *Molecular Biology and Evolution* 15(10): 1321-1331.
- Emshwiller E., Doyle J.J.. 1999. Chloroplast-expressed glutamine synthetase (ncpgs): potential utility for phylogenetic studies with an example from *Oxalis* (Oxalidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 310-319.
- Estes D., Small R.L. 2008. Phylogenetic relationships of the monotypic genus *Amphianthus* (Plantaginaceae tribe Gratiolaeae) inferred from chloroplast dna sequences. *Systematic Botany* 33 (1): 176-182.
- Feldberg K., Hentschel J., Bombosch A., Long D.G., Vána J., Heinrichs J. 2009. Transfer of *Gottschelia grollei*, *G. patoniae* and *Scaphophyllum speciosum* to *Solenostoma* based on chloroplast dna *rbcl* sequences. *Plant Systematics and Evolution* 280: 243-250.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies. An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Feng T., Downie S.R., Yu Y., Zhang X., Chen W., He X., Liu S. 2009. Molecular systematics of *Angelica* and allied genera (Apiaceae) from the Hengduan mountains of China based on nrDNA sequences: phylogenetic affinities and biogeographic implications. *Journal of Plant Research* 122: 403-414.
- Ferreira M.E., Grattapaglia D. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.

- Ferri G., Alu M., Corradini B. 2009 Forensic Botany: species identification of botanical trace evidence by using a multigene barcoding approach. *International Journal of Legal Medicine - versão on-line*.
- Fritsch P.W., Almeda F., Martins A.B., Cruz B.C., Estes D. 2007. Rediscovery and phylogenetic placement of *Philcoxia minensis* (Plantaginaceae), with a test of carnivory. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 58(21): 447-467.
- Gonçalves E.G., Mayo S.J., Van Sluys M.A., Salatino A. 2007. Combined genotypic-phenotypic phylogeny of the tribe Spathicarpeae (Araceae) with reference to independent events of invasion to Andean regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43(3): 1023-1039.
- Gravendeel B., Chase M.W., Vogel E.F., Roos M.C., Mês T.H.M., Bachmann R. 2001. Molecular phylogeny of *Coelogyne* (Epidendroideae: Orchidaceae) baseda on plastid RFLPs, *matK*, and nuclear ribosomal ITS sequences: evidence for polyphyly. *American Journal of Botany* 88 (10): 1915-1927.
- Grayer R.J., Chase M.W., Simmonds M.S.J. 1999. A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: an appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen". *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 369-393.
- Grayerbarkmeijer RJ, Tomasbarberan FA. 1993. 8-hydroxylated flavone o-glycosides and other flavonoids in chemotypes of *Gratiola officinalis*. *Phytochemistry* 34 (1): 205-210.
- Hall B.G. 2001. *Phylogenetic trees made easy: a how-to manual for molecular biologists*. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA.
- Hallier H. 1903. Ueber die Abgrenzung und Verwandtschaft der einzelnen Sippen bei den Scrophulariaceen. *Bull. Herb. Boiss.* 2(3): 181-207.
- Hahn W.J. 2002. A phylogenetic analysis of the Arecoïd line of palms based on plastid DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 189-204.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F. 1999. *Plant Systematics - a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA.
- Lecointre G., Le Guyader H. 2006. *The tree of life - a phylogenetic classification*. Editions Belin - Paris.

- Mason-Gamer R.J., Kellogg E.A. 1996. Testing for Phylogenetic Conflict Among Molecular Data Sets in the Tribe Triticeae (Gramineae). *Systematic Biology* 45(4): 524-545.
- Melchior H. 1964. Scrophulariaceae. In Engler, *Syllabus der Pflanzenfamilien* 2: 448-453.
- Minod, M. 1918. Contributions à l'étude du genre *Stemodia* et du groupe des Stemodiees en Amérique. *Bull. Soc. Bot. Genève*, ser. 2. 10: 155-252.
- Morgenstern B. 2009. Local versus global alignments. In Rosenberg M.S. *Sequence Alignment - methods, models, concepts and strategies*. University of California Press.
- Nylander J.A.A. 2004. MrModeltest v2. Programa distribuído pelo autor. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Olmstead R.G., dePamphills C.W., Wolfe A.D., Young N.D., Elisons W.J., Reeves P.A. 2001. Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany* 88(2): 348-361.
- Olmstead R.G., Reeves P.A. 1995. Evidence for the polyphyly of the scrophulariaceae based on chloroplast rbcL and ndhF sequences. *Annals of Missouri Botanical Garden* 82: 176-193.
- Oxelman B., Bremer B. 2000. Discovery of paralogous nuclear gene sequences coding for the second-largest subunit of rna polymerase ii (*rpb2*) and their phylogenetic utility in Gentianales of the Asterids. *Molecular Biology and Evolution* 17(8): 1131-1145.
- Oxelman B., Liden M., Berglund D. 1997 Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution* 206: 393-410
- Oxelman B., Kornhall P., Olmstead R.G., Bremer B. 2005. Further disintegration of Scrophulariaceae. *Taxon* 54(2): 411-425.
- Posada D. 2003. Selecting models of evolution. In. Salemi M., Vandamme A.-M. *The Phylogenetic Handbook - a practical approach to dna and protein phylogeny*. 256-282. Cambridge University Press.
- Prado J., Rodrigues C.D.N., Salatino A., Salatino M.F.L. 2007. Phylogenetic relationships among Pteridaceae, including Brazilian species, inferred from rbcL sequences. *Taxon* 56 (2): 355-368.
- Proliac A, Chaboud A, Raynaud J. 1991. 2 o-glucuronide flavones in stems of *Bacopa monnieri* L (Scrophulariaceae). *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 66 (5-6): 153-154.
- Rahmanzadeh R., Müller K., Fischer E., Bartels D., Borsch T. 2005. The Linderniaceae and Gratiolaceae are further lineages distinct from the Scrophulariaceae (Lamiales). *Plant Biology* 7: 67-78.

- Ramesh P., Nair A.G.R., Subramanian S.S. 1979. Flavonoids of *Scoparia dulcis* and *Stemodia viscosa*. *Current Science* 48(2):67.
- Ronsted N., Chae M.W., Albach D.C., Bello M.A. 2002. Phylogenetics relationships within *Plantago* (Plantaginaceae): evidence from nuclear ribosomal ITS and plastid *trnL-F* sequence data. *Botanical Journal of the Linnean Society* 139: 323-338.
- Salatino A, Salatino M.L.F., Mello-Silva R., Sluys M-A.V., Giannasi D.E., Price R.A. 2001. Phylogenetic inference in Velloziaceae using chloroplast *trnL-F* sequences. *Systematic Botany* 26 (1): 92-103.
- Santos F.A.R. 1997. Scrophulariaceae do Brasil: morfologia polínica e suas implicações taxonômicas. Tese de doutorado. USP. São Paulo.
- Schmidt J. A. 1862. Scrophularinae. *In: C. F. P. von Martius, A. G. Eichler, I. Urban (eds.). Flora Brasiliensis.* 8(1): 230-339.
- Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Schilling E.E., Small R.L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92(1): 142-166.
- Souza V.C. 1996. Levantamento das espécies de Scrophulariaceae nativas do Brasil. Tese de doutorado. USP. São Paulo.
- Souza V.C. 1997. Considerações sobre a delimitação de *Mecardonia procumbens* (Mill.) Small (Scrophulariaceae). *Acta Botânica Brasileira* 11 (2): 181-189.
- Swofford D.L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*other methods), version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 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.
- Takhtajan A. 1991. Evolutionary trends in flowering plants. New York: Columbia Univ Press.
- Tank D.C., Beardsley P.M., Kelchner S.A., Olmstead R.G. 2006. Review of the systematics of Scrophulariaceae s.l. and their current disposition. *Australian Systematics Botany* 19: 289-307.
- Taylor P., Souza V.C., Giuliatti A.M., Harley R.M. 2000. *Philcoxia*: a new genus of Scrophulariaceae with three new species from eastern Brazil. *Kew Bulletin* 55: 155-163.

Wallander E., Albert V.A. 2000. Phylogeny and classification of Oleaceae based on rps16 and trnL-F sequence data. *American Journal of Botany* 87 (12): 1827-1841.

Zhang C., Fan X., Yu H.Q., Zeng J., Zhang H.Q., Wang X.L., Zhou Y.H. 2009. Phylogenetic relationships among the species of *Elymus sensu lato* in triticeae (Poaceae) based on nuclear rDNA ITS sequences. *Russian Journal of Genetics* 45 (6): 696-706.