Cintia Rocini

Relações na tribo Bocageae Endlicher
baseadas em fitoquímica e sequências de DNA

São Paulo

2009

Cintia Rocini

Relações na tribo Bocageae Endlicher
baseadas em fitoquímica e sequências de DNA

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(a): Profa. Dra. Déborah
Yara Alves Cursino dos Santos
Coorientador(a): Prof. Dr. Renato de
Mello-Silva

São Paulo

2009

Rocini, Cintia
Relações na tribo Bocageae Endlicher
baseadas em fitoquímica e sequências de DNA
90 páginas

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

1. Annonaceae 2. Fitoquímica
3. Sequenciamento 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(a). Dr(a).

Orientador(a)

Para meus pais,

Edson e Célia

Agradecimentos

À Profa. Dra. Déborah Yara Alves Cursino dos Santos, pela orientação e paciência;

Ao Prof. Dr. Renato de Mello-Silva, pelas sugestões, coletas e identificação das plantas;

À CAPES (Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo), pelo apoio financeiro;

A todos os colegas do Laboratório de Fitoquímica e Sistemática Molecular, do Departamento de Botânica e de outras instituições que colaboraram para a realização desse trabalho,

Meus sinceros agradecimentos.

Índice

Capítulo 1. Relações na tribo Bocageae Endlicher baseadas em fitoquímica e sequências de DNA	01
Capítulo 2. Relações na tribo Bocageae Endlicher (Annonaceae) baseadas em sequências de DNA	33
Capítulo 3. Relações químicas na tribo Bocageae Endlicher (Annonaceae)	51
Capítulo 4. Discussão geral e conclusões	76
Resumo	89
<i>Abstract</i>	90

Capítulo 1

Relações na tribo Bocageae Endlicher baseadas em fitoquímica e sequências de DNA

1. Introdução geral

Annonaceae compreende árvores, arbustos, subarbustos e trepadeiras. Abrange cerca de 2220 espécies e 129 gêneros. Suas características são: folhas alternadas, sem estípulas; flores principalmente trímeras; estames numerosos, livres e frequentemente truncados; carpelos livres; sementes com endosperma ruminado (Heywood, 1993).

Apresenta ampla distribuição geográfica com predomínio nas florestas úmidas de baixa altitude das regiões tropicais (Américas, Ásia e África). Há poucas espécies nas regiões temperadas (leste da América do Norte, América do Sul subtropical, sul da África e norte da Austrália) e raras ocorrências em Madagáscar e nas ilhas do Pacífico. Fora dos trópicos, são encontrados apenas *Asimina* e *Deeringothamus*. No Brasil, há 29 gêneros (290 espécies, aproximadamente).

Possui grande importância econômica principalmente como fonte de frutos comestíveis, em particular *Annona cherimola* (cherimoia), *A. muricata* (graviola), *A. squamosa* e *A. reticulata* (ata, fruta do conde). Outras espécies economicamente importantes são: *Cananga odorata* e *Artabotrys odoratissima*, usadas na manufatura de perfumes (óleo ylang-ylang), *Cymbopetalum penduliflorus*, usada na produção de chocolates, espécies de *Monodora* e *Xylopia*, usadas como condimento, *Xylopia aethiopica*, *X. villosa* e *Oxandra lanceolata*, usadas para extração de madeira.

Muitas espécies de Annonaceae são utilizadas na medicina popular e têm sido estudadas quanto às suas atividades farmacológicas como *Guatteria boliviana* contra leishmaniose (Mahiou *et al.*, 2000), *Annona cherimola* contra doenças de pele (Chen *et*

al., 2001), espécies de *Xylopia* contra distúrbios estomacais (Nishiyama *et al.*, 2004) e com atividade antifúngica (Moreira *et al.*, 2003).

Há um consenso quanto à monofilese de Annonaceae e quanto ao seu posicionamento em Magnoliales como grupo irmão de Eupomatiaceae (APG II, 2003). No entanto, as relações dentro da família são controversas.

Existem numerosos sistemas de classificação para Annonaceae. Esses sistemas estão baseados em dados morfológicos e dividem os gêneros em pequenos agrupamentos (tribos e grupos). O sistema elaborado por Fries (1959), baseado em caracteres vegetativos, florais e dos frutos, tem apresentado vários grupos apoiados por novos dados. Um deles é o “Grupo Trigynaea”. Johnson e Murray (1995) formalizaram a circunscrição desse grupo e adotaram o nome mais antigo existente para a categoria: tribo Bocageae Endlicher.

Bocageae Endlicher compreende 61 espécies neotropicais distribuídas em sete gêneros: *Bocagea*, *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Froesiodendron*, *Hornschuchia*, *Porcelia* e *Trigynaea*. As características da tribo são: pólen abrigados em políades de oito grãos (óctades) ou mais e presença de pedicelo internodal, solitário, articulado na base e sem brácteas. Características adicionais são: anteras septadas, exina polínica fortemente columelada, presença de acessórios na semente e número cromossômico básico de $x = 9$.

Na tentativa de estabelecer hipóteses de relações intergenéricas na tribo, Johnson e Murray (1995) fizeram uma análise cladística (Fig. 1, página 19) dos sete gêneros, utilizando caracteres vegetativos, florais, dos frutos e das sementes. Os grupos externos foram *Mkilua* e *Annona*. A análise mostrou que a tribo é apoiada por três sinapomorfias: presença de flores simples (ou seja, não reunidas em inflorescências), pedicelos sem brácteas e grãos de pólen arranjados em óctades.

((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)) constituiu um clado (Fig. 1, página 19) apoiado por um conjunto de características florais e dos frutos: sépalas persistentes nos frutos, ápice interno da sépala trigonoso, pequeno diâmetro do tórus, número de estames reduzido (exceto em *Trigynaea*), conectivos da antera alongados, ápice do conectivo da antera não se estende sobre os lóculos, exina do pólen tectado variável e estigmas não articulados.

(((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)) (*Froesiodendron*)), grupo irmão de ((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)) [Fig. 1, página 19], é apoiado por duas características florais: pétalas externas em estivação variando de valvadas até levemente imbricadas e presença de tecido especializado para alimentação de besouros nas margens da pétala.

Por essa análise, *Froesiodendron* ocupa uma posição basal em seu clado e, segundo os autores (Johnson e Murray, 1995), é o gênero menos divergente na tribo, pois ainda está ligado ao “clado *Trigynaea*” por dois atributos florais: (1) ápice do conectivo da antera, que não se estende sobre os lóculos da antera, mas ainda é truncado como em *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia* e, (2) número de estames e carpelos, que é relativamente numeroso em *Trigynaea*, o que aproxima *Froesiodendron* deste gênero. Essas características florais colocam *Froesiodendron* em uma condição intermediária a *Trigynaea* e *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*, o que leva à questão sobre o posicionamento mais adequado para esse gênero em relação aos outros membros da tribo.

De fato, quando só *Annona* é grupo externo, *Froesiodendron* se posiciona no “clado *Trigynaea*“, quando apenas *Miklua*, ou *Annona* e *Miklua* juntos são os grupos externos, *Froesiodendron* se posiciona no clado com *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*. Johnson e Murray (1995) incluíram *Annona* e *Miklua* em sua análise devido

ao grande número de evidências sobre a estreita relação desses gêneros com Bocageae. Os autores relataram que seu estudo apoiou a inclusão de Bocageae e *Miklua* em um grupo de gêneros africanos e americanos (Annonoides), representado por *Annona* (Fig. 1, página 19); no entanto, sua análise não foi conclusiva quanto à inclusão ou não de *Miklua* em Bocageae (Fig. 1, página 19), pois, segundo os autores, há muitos gêneros de Annonoides que ainda precisam ser estudados em monografias.

Sequências de DNA e dados fitoquímicos têm sido muito utilizados para construir ou confrontar hipóteses filogenéticas em vários níveis taxonômicos.

Os dados do DNA têm corroborado a monofilese de várias famílias e ordens e indicado pontos a serem reformulados nos sistemas de classificação vigentes. A análise filogenética molecular de Chase *et al.* (1993) causou grande impacto na sistemática vegetal porque trouxe novas informações sobre a evolução das Angiospermas. Nesse trabalho, foi sequenciado o gene *rbcL* de 499 espécies de espermatófitas. A árvore de consenso estrito das 3900 árvores mais parcimoniosas mostrou uma linhagem monofilética “cicadeana” como grupo irmão de todas as espermatófitas restantes. Os três gêneros de Gnetales, embora morfologicamente distintos, formaram uma linhagem monofilética irmã das Angiospermas. Dentre as Angiospermas, duas linhagens principais na árvore de *rbcL* divergiram: a dos grupos produtores de pólen uniaperturado e a dos grupos produtores de pólen triaperturados, as eudicotiledôneas. Isso mostrou que as tradicionais dicotiledôneas são um grupo parafilético, pois alguns de seus membros, a saber Magnoliales, Laurales e paleoervas, foram removidos do grupo das produtoras de pólen triaperturado para o grupo das produtoras de pólen uniaperturado.

O sequenciamento de regiões de DNA é o método mais utilizado em sistemática macromolecular. No caso das plantas, o genoma do cloroplasto tem sido mais utilizado que os genomas nuclear e mitocondrial.

Grande parte do genoma nuclear é muito pouco conhecida (a exceção é o DNA ribossômico). Cogita-se que uma grande fração seja de famílias de genes com cópias múltiplas, o que dificulta, *a priori*, avaliar a homologia das sequências potencialmente úteis para a reconstrução filogenética. Além disso, é possível que a evolução em concerto (acredita-se que esse processo torne homogêneas as várias repetições, o que facilita a reconstrução filogenética) seja incompleta nessas regiões. Desse modo, postula-se que as regiões marcadoras adequadas para os estudos filogenéticos sejam aquelas de cópia simples ou pelo menos regiões em que as cópias ortólogas dos genes de cópias múltiplas possam ser indubitavelmente identificadas (Oxelman e Bremer, 2000). As cópias ortólogas são sequências homólogas cujas diferenças foram acumuladas após a separação das espécies do seu ancestral comum, e, portanto refletem a história filogenética das espécies (Doyle e Davis, 1998).

A maioria dos genes do cloroplasto é cópia única. O genoma é estruturalmente conservado e evolui consideravelmente devagar no nível de sequência nucleotídica. No entanto, diferentes porções do genoma do cloroplasto evoluem a taxas distintas. Como resultado, o campo de possibilidades para resolver relações é amplo, desde os níveis de espécie e gênero até os níveis de família e até mesmo superiores (Soltis e Soltis, 1998).

A taxa de substituição de nucleotídeos do genoma mitocondrial é muito baixa em relação aos genomas do cloroplasto e nuclear, o que tornaria sua utilização promissora para estudos filogenéticos nos níveis taxonômicos superiores; porém, avaliar o potencial filogenético dos genes mitocondriais é difícil, pois há poucas sequências

disponíveis para a maioria deles e as análises realizadas indicam que podem ser úteis para vários níveis taxonômicos (Soltis e Soltis, 1998).

O critério de seleção da região a ser utilizada é a taxa de evolução. Todavia, as taxas de evolução para um determinado gene ou região do DNA podem variar entre grupos e até mesmo dentro dos grupos. Nesse contexto, Soltis e Soltis (1998) enfatizaram que é difícil formular regras que relacionem a taxa de evolução e o nível taxonômico. Assim, deve-se ter em mente que cada gene possui uma esfera “típica” de aplicação taxonômica, que pode variar consideravelmente de grupo para grupo.

Em Annonaceae, os estudos filogenéticos com dados de DNA utilizaram sequências do cloroplasto.

van Zuilen *et al.* (1996) sequenciaram o espaçador intergênico *trnL-F* para estabelecer as relações entre alguns gêneros. Doyle *et al.* (2000) resolveram várias relações supragenéricas a partir das informações obtidas do sequenciamento do gene *rbcL*. Sauquet *et al.* (2003) utilizaram as sequências do gene *ndhF*, da região *trnK* (incluindo o gene *matK*) e da região *trnL* (incluindo o espaçador intergênico *trnT-L*, o intron *trnL* e o espaçador *trnL-F*) para resolver relações entre vários grupos de gêneros. Mols *et al.* (2004) sequenciaram o *rbcL*, o intron *trnL* e o espaçador intergênico *trnL-F* para resolver as relações entre os gêneros da tribo Miliuseae. Scharaschkin e Doyle (2005) combinaram as sequências das regiões espaçadoras *atpB-rbcL*, *psbA-trnH*, *trnL-F* e do intron *trnL* com caracteres morfológicos para esclarecer as relações em *Anaxagorea* e sua história biogeográfica. Pirie *et al.* (2006) utilizaram *rbcL* e os espaçadores intergênicos *trnL-F* e *psbA-trnH* para verificar a monofilese de alguns gêneros e sequenciaram *matK*, *ndhF* e os espaçadores intergênicos *trnT-L*, *trnS-G* e *atpB-rbcL* para determinar as relações entre os gêneros. Su *et al.* (2008) investigaram as

relações filogenéticas em *Pseuduvaria* com o uso das regiões espaçadoras *atpB-rbcL*, *psbA-trnH*, *trnL-F* e dos genes *matK* e *rbcL*.

Muito antes dos dados macromoleculares, os dados fitoquímicos já eram utilizados na tentativa de esclarecer as relações entre as plantas.

Várias classes de metabólitos mostraram-se úteis como: alcanos (Rodrigues e Salatino, 2006), iridoides, glicosinolatos, antraquinonas, taninos hidrolisáveis, vários tipos de alcaloides, entre outras (Gershenzon e Mabry, 1983). O exemplo mais conhecido entre as Angiospermas é o uso das betalaínas para caracterizar Caryophyllales. Esses pigmentos nitrogenados e as antocianinas são mutuamente exclusivos. As betalaínas são substâncias típicas e exclusivas de Caryophyllales enquanto todos os demais grupos de Angiospermas produzem antocianinas.

Recentemente, o triterpenoide oleanano foi indicado como um caráter de possível interesse filogenético para o grupo das Angiospermas (Stevens, 2008). Esse terpenoide é amplamente distribuído entre as Angiospermas e não foi detectado em quase nenhuma outra Spermatophyta exceto em Bennetitales (Gimnosperma do Período Permiano da Era Paleozoica). Acredita-se que as Angiospermas tenham surgido no Período Cretáceo da Era Mesozoica. Com esse novo dado, postula-se que a linhagem das Angiospermas divergiu muito antes, a partir de outras plantas com sementes de um período paleozoico recente (Taylor *et al.*, 2006).

Alcaloides benzilisoquinolínicos apoiaram reformulações da classificação de Rutaceae. Alguns gêneros produzem várias classes desses alcaloides, entre elas protopinas e benzofenantridinas que apoiaram a migração de algumas espécies do gênero *Euodia* para o gênero *Tetradium*. Além disso, os benzilisoquinolínicos apoiaram a proximidade de *Tetradium* e *Zanthoxylum*, principal produtor de protopinas e benzofenantridinas encontradas em *Tetradium* (Waterman, 1999).

Os trabalhos quimiotaxonômicos apresentam comparações entre a distribuição dos metabólitos e as classificações/ hipóteses filogenéticas baseadas em diversos tipos de dados (Blatt *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 1995; Grayer *et al.*, 1999). Nos casos em que os conjuntos de dados são amplos, utilizam-se técnicas de análise numérica como PCA e UPGMA para determinar as relações de similaridade (Maffei, 1996; Mimura *et al.*, 1998; Santos e Salatino, 1998; Bomfim-Patrício *et al.*, 2001; Wollenweber *et al.*, 2003).

Os dados fitoquímicos também são usados em análises filogenéticas. Em alguns estudos, as substâncias isoladas (Les *et al.*, 1997), classes de substâncias (Richardson, 1983; Nandi *et al.*, 1998) e padrões de substituição (Richardson, 1983) foram codificados como caracteres e analisados por algoritmos de parcimônia. Outras análises envolveram as vias biossintéticas. Seaman e Funk (1983) desenvolveram um método para codificar a presença e a ausência de determinada via metabólica e de cada substância dentro da via. Barkman (2001) propôs a utilização da via biossintética como caráter e das suas conversões enzimáticas como estados de caráter.

Estabelecer a homologia dos dados fitoquímicos nas unidades taxonômicas depende do estudo das relações biossintéticas das substâncias. Padrões de distribuição de metabólitos aparentemente confusos podem ser explicados pela homologia ou pela ausência dela (paralelismos e convergências). No caso dos dados fitoquímicos a homoplasia ocorre porque pode haver mais de uma rota metabólica para sintetizar a mesma substância como ocorre, por exemplo, com certos alcaloides (van Wyk, 2003) e alguns flavonoides (Stafford, 1990). Logo, conhecer as vias biossintéticas é imprescindível para fazer inferências filogenéticas a partir dos dados fitoquímicos. A importância da via biossintética nos estudos filogenéticos diz respeito à definição de caracteres, que devem ser independentes entre si. Como as substâncias de uma dada via estão relacionadas e dependem umas das outras durante o processo de biossíntese, elas

não podem ser definidas como caracteres. É mais adequado que sejam consideradas estados de um caráter, nesse caso a própria via em que são produzidas (Barkman, 2001).

O conjunto de trabalhos químicos em Annonaceae é muito extenso. A revisão de Leboeuf *et al.* (1982) ainda é uma fonte básica de informação sobre as substâncias de interesse quimiotaxonômico e farmacológico já isoladas de Annonaceae. Diferentes classes de metabólitos como acetogeninas, alcaloides, amidas, flavonoides, lignoides, terpenoides, óleos voláteis e outras têm sido isoladas. Uma pequena fração desses trabalhos é direcionada para taxonomia; grande parte das pesquisas é voltada à prospecção de componentes bioativos. Entre os metabólitos de interesse taxonômico estão os flavonoides, os componentes das ceras cuticulares e os alcaloides.

Os flavonoides são substâncias constituídas por quinze átomos de carbono. Sua estrutura básica consiste de dois anéis aromáticos ligados por três átomos de carbono (Fig. 2, página 19). Ocorrem nas plantas terrestres e nas algas (Iwashina, 2000). Podem ser encontrados em todos os órgãos vegetais, solubilizados nos vacúolos das células. Suas principais funções nas plantas estão relacionadas à proteção contra herbivoria, patógenos e polinização/dispersão (McClure, 1975). A biossíntese dos flavonoides resulta da combinação entre as vias do acetato-malonato e do ácido chiquímico (Fig. 3, página 20). Dentre todas as classes, flavonas e flavonóis (Fig. 2, página 19) são as mais variáveis e abundantes (Stafford, 1990). Devido a essas características, além de relativamente fáceis de serem isoladas e identificadas, há muitos anos flavonas e flavonóis têm sido utilizadas em estudos quimiotaxonômicos (Harborne e Turner, 1982).

Santos e Salatino (2000) isolaram um total de 76 flavonas e flavonóis, a maioria glicosídeos, de 31 espécies de Annonaceae. A análise incluiu onze espécies da tribo

Bocageae que se destacaram das outras por acumular flavonas e flavonóis 6-oxigenados além de flavonóis-7-*O*-metilados.

A cera cuticular apresenta duas porções, uma externa à cutícula, conhecida como cera epicuticular, e outra interna, chamada cera intracuticular [Fig. 4 A, página 21] (Gülz, 1994). É encontrada nas plantas vasculares e na maioria das briófitas. Atua na defesa do vegetal contra a perda de água, herbivoria e radiação UV (Juniper e Jeffree, 1983). As ceras são uma mistura de substâncias hidrofóbicas constituída principalmente por aldeídos, álcoois primários e secundários, alcanos, cetonas e ésteres, sintetizadas nas vias da redução acil e da descarboxilação (Fig. 4 B, página 21) a partir de ácidos graxos de cadeias longas e saturadas (Shepherd e Griffiths, 2006). Além desses componentes, substâncias provenientes de outras vias biossintéticas, como terpenoides, flavonoides e esteróis, podem ser encontradas nas ceras vegetais, sobretudo nas Angiospermas (Juniper e Jeffree, 1983; Kunst e Samuels, 2003).

Salatino e Salatino (1983) detectaram parafinas, cetonas e álcoois nas ceras cuticulares de 24 espécies de Annonaceae. Com base na composição das ceras, os autores propuseram duas linhas de avanço relativo na família: uma com especialização na oxigenação progressiva e outra com especialização no número de átomos de carbono. Entre as espécies estudadas, *Porcelia macrocarpa* (tribo Bocageae) apresentou perfil com predomínio de parafinas sobre álcoois e cetonas. Segundo os autores, *P. macrocarpa* não apresentou nenhuma das duas especializações propostas.

Alcaloides são substâncias nitrogenadas e fisiologicamente ativas. Ocorrem nos vegetais superiores, principalmente nas Angiospermas, nos micro-organismos (como o fungo do ergotismo *Claviceps purpurea*) e em animais marinhos (esponja *Dercitus*, por exemplo). Podem ser detectados em todos os órgãos vegetais. Suas funções nas plantas são proteção contra herbivoria e patógenos (Goodwin e Mercer, 1983). Dentre as

diversas classes, os alcaloides isoquinolínicos (Figura 5, página 22) foram isolados da maioria das espécies de Annonaceae. As isoquinolinas encontradas na família são: berberinas, oxoaporfinas, fenantrenos, cularinas, morfinanedienonas, isoquinolonas, dimetilaminoetilbenzilas, bisbenzilisquinolinas, benzilisquinolinas e principalmente aporfinas (Figura 5, página 22). Com raras exceções, as isoquinolinas são derivadas de alcaloides com estrutura 1-benzil-tetra-hidroisoquinolina (também chamada benzilisquinolina, (Figura 5, página 22). Em Annonaceae, as isoquinolinas são derivadas das benzilisquinolinas (Leboeuf *et al.*, 1982; Cavé, 1985). A estrutura 1-benzil-tetra-hidroisoquinolina é formada a partir de duas moléculas do aminoácido tirosina: uma delas é utilizada na via dopamina e a outra é utilizada nas vias 4-hidroxifenilacetaldeído ou 3, 4-hidroxifenilacetaldeído [Fig. 6, página 23] (Herbert, 1985; Liscombe *et al.*, 2005).

Os alcaloides derivados da 1-benzil-tetra-hidroisoquinolina (1-btiq) são amplamente conhecidos como “metabólitos típicos de Annoniflorae”, superordem de Thorne (1968) que inclui Annonaceae (Waterman, 1999). No entanto, a revisão da distribuição dos derivados 1-btiq em Angiosperma contesta essa posição (APG, 2003). Esses alcaloides foram isolados de famílias que não fazem parte e são filogeneticamente distantes de Annoniflorae. Esse padrão de distribuição foi explicado pelos processos de evolução paralela e convergente do esqueleto dos alcaloides (Waterman, 1999). Liscombe *et al.* (2005) e Wink (2003) oferecem outra explicação para esse padrão de distribuição.

Liscombe *et al.* (2005) combinaram os métodos bioquímico e molecular para realizar uma investigação empírica da evolução da biossíntese das benzilisquinolinas nas plantas. A atividade da norcoclaurina sintase (NCS) foi ensaiada em 90 espécies de plantas (incluindo representantes basais das Angiospermas). Essa enzima foi tratada

como marcador bioquímico-chave devido às evidências de que seja o primeiro passo no metabolismo dos alcaloides benzilisoquinolínicos. A ocorrência da atividade NCS foi comparada com a distribuição das benzilisoquinolinas mapeada em uma filogenia molecular que incluiu as espécies submetidas ao ensaio da NCS. A filogenia molecular foi baseada na combinação das sequências das regiões 5,8S; 18S; 26S; *atpB*; *ndhF*; *phyA*; *phyC* e *rbcL*.

Seis proteínas que apresentaram alta identidade com a sequência de aminoácidos da NCS, foram ensaiadas para a atividade NCS. Os autores obtiveram evidências de que a NCS é a única enzima responsável pela biossíntese de norcoclaurina nas Angiospermas. Uma análise filogenética molecular das enzimas da biossíntese das benzilisoquinolinas foi realizada para obter informações adicionais sobre a evolução da via. Segundo Liscombe *et al.* (2005), a ampla distribuição das benzilisoquinolinas nos representantes basais das Angiospermas e alguns casos de distribuição esporádica entre as eudicotiledôneas concomitantemente à ocorrência da atividade NCS apoiam um modelo para a evolução monofilética da via biossintética das benzilisoquinolinas.

Wink (2003) argumenta que esse padrão de distribuição resulta de expressão gênica diferenciada e que a capacidade biossintética para produzir certo metabólito é desligada ao invés de perdida. A evolução do equipamento genético para a biossíntese das benzilisoquinolinas parece ter sido monofilética, mas mutações nos genes biossintéticos, nos genes reguladores ou nos genes que codificam para proteínas transportadoras levaram à inativação da via em vários grupos taxonômicos.

Tais mudanças funcionais podem ter surgido como resultado de padrões de expressão gênica alterados ou de mudança das interações entre as proteínas. As funções ecofisiológicas específicas dos alcaloides benzilisoquinolínicos, geradas por pressões seletivas ambientais, e/ou o surgimento de mecanismos fisiológicos especializados

podem ter contribuído para a manutenção ou reativação da via em certos membros de Angiosperma (Liscombe *et al.*, 2005).

Os dados morfológicos ofereceram uma hipótese sobre as relações na tribo Bocageae. Agora, a confiabilidade dessas relações precisa ser verificada. Por isso é importante explorar outros caracteres. Nos últimos anos, o sequenciamento tem produzido evidências que são apoiadas por diversos tipos de caracteres, inclusive os químicos. No caso dos caracteres químicos, o conhecimento da via biossintética tem se mostrado indispensável para interpretar a distribuição dos metabólitos.

2. Objetivo

O objetivo desse trabalho é verificar a confiabilidade das relações intergenéricas na tribo Bocageae Endlicher por comparação com os dados fitoquímicos e de sequências do DNA.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

Espécies de *Annona* e da tribo Bocageae Endlicher foram utilizadas para obtenção das sequências de DNA e dos dados fitoquímicos. As listas das espécies analisadas estão nos Capítulos 2 e 3.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção das sequências de DNA

As regiões sequenciadas pertencem aos três genomas da célula vegetal: gene *matK* e intron *trnK*, intron *trnL* e espaçador intergênico *trnL-trnF* do cloroplasto; gene *coxI* da mitocôndria e gene *RPB2* do núcleo.

O gene *matK* codifica uma maturase que retira introns do RNA transcrito (Soltis e Soltis, 1998). Os introns são sequências não codificadoras que intercalam sequências codificadoras, denominadas exons (Oliveira e Menck, 2001). O gene *matK* está inserido no intron *trnK* que por sua vez se posiciona entre os exons 5' e 3' do gene *trnK*, responsável pela transcrição do RNA transportador da lisina (Soltis e Soltis, 1998). O intron *trnL* está inserido entre os exons 5' e 3' do gene *trnL* que transcreve o RNA transportador da leucina. O espaçador intergênico *trnL-trnF* é a sequência não codificadora inserida entre o exon 3' *trnL* e o gene *trnF* que transcreve o RNA transportador da fenilalanina (Taberlet *et al.*, 1991).

O gene *coxI* expressa a subunidade I da citocromo c oxidase (COX) que reduz o oxigênio à água. Essa reação é acoplada à translocação de prótons através da membrana, o que gera o gradiente eletroquímico usado para a síntese de adenosina trifosfato (ATP) (Laakkonen *et al.*, 2006). O gene *RPB2* codifica a segunda maior subunidade da RNA Polimerase II (Luo *et al.*, 2007).

Os critérios de seleção dos marcadores foram: a existência de trabalhos prévios em Annonaceae, no caso das regiões do cloroplasto (van Zuilen *et al.*, 1996; Sauquet *et al.*, 2003; Mols *et al.*, 2004), facilidade para amplificar e alinhar as sequências, o fato de terem uma única cópia na maioria das plantas. Os iniciadores estão na Tabela 1 (página 23).

O DNA genômico total foi extraído pelo método CTAB (Doyle e Doyle, 1987), com modificações. Detalhes da metodologia estão no Capítulo 2.

3.2.2. Obtenção dos dados fitoquímicos

Os metabólitos investigados foram alcaloides, componentes das ceras cuticulares e flavonoides. As análises dos alcaloides e dos componentes das ceras cuticulares foram

baseadas nas metodologias descritas por Suau *et al.* (2002) e Juniper e Jeffree (1983), respectivamente. No caso dos flavonoides, foram utilizadas as metodologias propostas por Mabry *et al.* (1970), Markham (1982) e Harborne (1998). Os flavonoides identificados por Santos e Salatino (2000) foram utilizados nesse estudo. As descrições detalhadas das metodologias estão no Capítulo 3.

3.2.3. Análise filogenética das sequências de DNA e evolução dos metabólitos

Para cada região do DNA sequenciada foi elaborada uma matriz. As matrizes foram analisadas nos programas PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) e MrBayes 3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2005) de acordo com o método de inferência filogenética utilizado.

As espécies de *Annona* foram utilizadas como grupo externo devido à estreita relação com a tribo Bocageae Endlicher sugerida pela análise cladística baseada em caracteres morfológicos (Johnson e Murray, 1995). As análises filogenéticas foram realizadas com o uso de métodos de parcimônia (Máxima Parcimônia) e de probabilidades (Análise Bayesiana). A confiabilidade dos clados foi avaliada pelo método Bootstrap, na análise por Máxima Parcimônia, e pelas Probabilidade Posteriores, na Análise Bayesiana. Os métodos das análises foram descritos com detalhes no Capítulo 2.

O método da Máxima Parcimônia produz árvores com o menor número de passos evolutivos (Miyaki *et al.*, 2001). As informações referentes à evolução do conjunto dos caracteres das árvores mais parcimoniosas foram avaliadas pelos Índices de Consistência (IC) e de Retenção (IR).

O Índice de Consistência (IC) é uma medida do número de eventos homoplásticos para um determinado cladograma. É expresso pela relação entre o

número mínimo de passos que um conjunto de caracteres pode exibir em um cladograma e o número efetivo de passos presentes no cladograma. Esse índice corresponde a um valor numérico positivo entre 0 e 1. Quando não há homoplasias, o valor é 1; o aumento da frequência de homoplasias aproxima o valor de 0 (Amorim, 1994).

O Índice de Retenção (IR) indica a fração de sinapomorfias aparentes em relação às sinapomorfias verdadeiras. É expresso pela relação entre duas diferenças: a diferença entre o número máximo de passos possíveis e o número efetivo de passos e a diferença entre o número máximo de passos possíveis e o número mínimo de passos. Esse índice corresponde a um valor numérico positivo entre 0 e 1. Esse valor se aproxima de 0 quando há um maior número de autapomorfias e de homoplasias; aproxima-se de 1 quando há um maior número de caracteres sinapomórficos não autapomórficos no cladograma e não sujeitos à homoplasia (Amorim, 1994).

A análise por Máxima Parcimônia foi realizada com o programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002). A estratégia utilizada para amostrar as hipóteses filogenéticas foi a busca Heurística de árvores (Swofford, 2002).

Uma árvore de consenso foi construída a partir das árvores mais parcimoniosas, porém com topologias conflitantes. Foram utilizados o consenso estrito e o consenso de maioria. A árvore de consenso estrito apresenta os grupos monofiléticos coincidentes em todas as árvores mais parcimoniosas. Por sua vez, a árvore de consenso de maioria, mostra os grupos monofiléticos presentes na maioria das árvores mais parcimoniosas, não importando se há conflito entre eles (Amorim, 1994).

Os métodos probabilísticos estimam a probabilidade de um conjunto de dados representar um processo que realmente ocorreu com base em um determinado modelo. Os modelos empregados pelos métodos de probabilidades envolvem a utilização de

parâmetros que podem ser inferidos a partir dos próprios dados (Pereira *et al.*, 2001). A probabilidade de observar os dados sob a perspectiva de um modelo adotado mudará dependendo dos valores do parâmetro do modelo. O método Bayesiano é baseado na probabilidade posterior de um parâmetro. Probabilidade posterior é a probabilidade de observar um dado, condicionada à ocorrência de um determinado evento. As probabilidades posteriores de filogenias são aproximações obtidas por meio da amostragem de árvores a partir da distribuição de suas probabilidades posteriores. A Cadeia Markov-Monte Carlo (MCMC) é usada para amostrar filogenias de acordo com suas probabilidades posteriores; a MCMC é a estratégia de busca de filogenias da Análise Bayesiana.

Quando a distribuição das probabilidades posteriores torna-se estável, pode-se calcular o valor que indica a confiabilidade do clado. Os clados foram considerados confiáveis para valores de probabilidades posteriores iguais ou superiores a 95 (Su *et al.*, 2008).

A análise Bayesiana foi realizada no programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2005). A escolha do modelo de evolução foi realizada no programa ModelTest 3.7.win (Posada e Crandall, 2005).

Bootstrap é uma das medidas de confiabilidade mais utilizadas. Quando aplicado a árvores filogenéticas, o método envolve a geração de numerosas pseudorréplicas da matriz de dados. As pseudorréplicas têm o mesmo tamanho que a matriz original e são obtidas pela reamostragem com substituição das colunas. Reamostragem com substituição é, de fato, uma estratégia de pesagem aleatória em que o peso de alguns caracteres é aumentado e a outros é efetivamente dado o peso zero (Egan, 2006).

As árvores são construídas a partir de cada matriz pseudorréplica assim como a partir da matriz original, com o uso do método de inferência filogenética escolhido; posteriormente, é feita uma varredura das topologias. A proporção de réplicas em que determinado clado aparece é usada como um indicador de confiabilidade da consistência do clado. Essa proporção é expressa como uma porcentagem. Um consenso das árvores é gerado e mostra aqueles clados presentes em mais de 50 por cento das réplicas (Egan, 2006).

Métodos de reamostragem estimam a confiabilidade, baseados na estabilidade da hipótese frente às perturbações dos dados. Reamostragem com substituição (isto é, bootstrap) pode ser descrita como um teste de estabilidade da hipótese a pesagens diferenciais dos caracteres. Em outras palavras, métodos de reamostragem podem oferecer uma ideia geral de que a hipótese é instável à perturbação, levando à conclusão de que mais dados podem ser necessários (Egan, 2006).

Os intervalos de confiabilidade usados foram: 50-74% confiabilidade fraca; 75-84% confiabilidade moderada; 85-100% confiabilidade forte (Pirie *et al.*, 2006).

O teste de Bootstrap foi realizado no programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) com a mesma estratégia de busca de árvores usada na análise de parcimônia (Busca Heurística).

Hipóteses sobre a evolução dos alcaloides, componentes da cera cuticular e flavonoides em Bocageae foram levantadas a partir do mapeamento na filogenia de Johnson e Murray (1995). Essas hipóteses foram formuladas sob a perspectiva das vias biossintéticas.

Fig. 1. Relações intergenéricas na tribo Bocageae Endlicher baseadas em caracteres morfológicos de acordo com o método de Máxima Parcimônia: 1 árvore; 43 passos; I.C. = 0,79; I. R. = 0,78 (Jonhson e Murray, 1995).

Fig. 2. Flavonol e flavona, exemplos de estrutura básica dos flavonoides.

Fig. 3. Biossíntese dos flavonoides: origem dos precursores e vias metabólicas para a síntese das principais classes de flavonoides (ANS, antocianidina sintase; CHI, chalcona isomerase; CHS, chalcona sintase; DFR, di-hidroflavonol-4-redutase; FGT, flavonoide-3-O-glucosiltransferase; FHT, flavanona-3-hidroxilase; FLS, flavonol sintase; FNS, flavona sintase; IFS, isoflavona sintase; LAR, leucoantocianidina redutase). Adaptado de Forkmann e Martens (2001).

Fig. 4. Cera cuticular. (A) Disposição das ceras epicuticular e intracuticular em desenho de corte transversal de folha. Adaptado de Gülz (1994). (B) Vias biossintéticas dos componentes alifáticos das ceras vegetais (FAE, complexo ácido graxo elongase; FAR, acil-CoA graxo redutase; FAS, complexo ácido graxo sintase; VLCFA, ácido graxo de cadeia longa; WS, cera sintase; (?), enzimas não caracterizadas). Adaptado de Kunst e Samuels (2003).

Fig. 5. Alcaloides isoquinolínicos encontrados em Annonaceae e sua estrutura precursora, benzilisoquinolina (1-benzil-tetra-hidroisoquinolina). Adaptado de Cavé (1985).

Fig. 6. Formação da estrutura precursora 1-benzil-tetra-hidroisoquinolina (benzilisoquinolina). Na estrutura benzilisoquinolina, R = H quando o esqueleto é derivado da via 4-hidroxifenilacetaldeído; R = OH quando o esqueleto é derivado da via 3, 4-hidroxifenilacetaldeído. Adaptado de Herbert (1985).

Tabela 1

Marcadores e respectivos iniciadores utilizados nesse trabalho.

Marcador	Iniciadores	Sequência 5' - 3'	Referência
Cloroplasto			
<i>matK</i>	trnK-HSF2	CCTTGTTCTGACTGTATCG	Sauquet <i>et al.</i> (2003)
	trnK-2R	CCCGGAAGTAGTCGGATGG	Sauquet <i>et al.</i> (2003)
<i>trnL-trnL-F</i>	c	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
	f	ATTTGAACCTGGTGACACGAG	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
Mitocôndria			
<i>coxI</i>	445F	GCCATTCTGGAGGAGCAGTTGA	Prince e Kress (2006)
	1951R	CGGTGAAGTAGGCACG(CG)GTATC	Prince e Kress (2006)
Núcleo			
<i>RPB2</i>	f7327	CCATC(CT)CGTATGACAATCGG(CT)CAGCTT	Popp e Oxelman (2001)
	r7586	CCC(AC)GTGTGACCATTGTACATTGTCT	Popp e Oxelman (2001)

Referências bibliográficas

- Amorim, D.S., 1994. Construção de cladogramas. Índices, in: Amorim, D.S. (Ed.), Elementos Básicos de Sistemática Filogenética. Sociedade Brasileira de Entomologia, São Paulo, pp. 106 - 112.
- APG II, 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Bot. J. Linn. Soc. 141, 399-436.
- Barkman, T.J., 2001. Character coding of secondary chemical variation for use in phylogenetic analyses. Biochem. Syst. Ecol. 29, 1 - 20.
- Blatt, C.T.T., Salatino, A., Salatino, M.L.F., Martínez, M.A. Del P., Cavalcanti, T.B., 1994. Flavonoids of *Diplusodon* (Lythraceae). Biochem. Syst. Ecol. 22 (1), 101 - 107.
- Bomfim-Patrício, M.C., Salatino, A., Martins, A.B., Wurdack, J.J., Salatino, M.L.F., 2001. Flavonoids of *Lavoisiera*, *Microlicia* and *Trembleya* (Melastomataceae) and their taxonomic meaning. Biochem. Syst. Ecol. 29, 711 - 726.
- Cavé, A., 1985. Annonaceae alkaloids, in: Phillipson, J.D., Roberts, M.F., Zenk, M.H. (Eds.), The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 79-101.
- Chase, M.W. *et al.* 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. Ann. Missouri Bot. Gard. 80, 528-580.
- Chen, C.Y., Chang, F.R., Pan, W.B., Wu, Y.C., 2001. Four alkaloids from *Annona cherimola*. Phytochemistry 56, 753 - 757.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19, 11 - 15.
- Doyle, J.J., Davis, J.I., 1998. Homology in molecular phylogenetics: a parsimony perspective, in: Soltis D.E., Soltis, P.S. (Eds.), Molecular Systematics of Plants II -

- DNA Sequencing. Kluwer Academic Publishers, Boston/ Dordrecht/ London, pp.101 - 131.
- Doyle, J.A., Bygrave, P., Le Thomas A., 2000. Implications of molecular data for pollen evolution in Annonaceae, in: Harley, M.M., Morton, C.M., Blackmore, S. (Eds.), Pollen and spores: morphology and biology. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 259 - 284.
- Egan, M.G., 2006. Support versus corroboration. J. Biom. Info. 39, 72 - 85.
- Forkmann, G., Martens, S., 2001. Metabolic engineering and applications of flavonoids. Curr. Opin. Biotechnol. 12, 155 - 160.
- Fries, R.E., 1959. Annonaceae. In: Engler A., Prantl, K. (Eds.). Die natürlichen Pflanzenfamilien end. 2nd 17A. Dunckher and Humblot, Berlin.
- Gershenzon, J., Mabry, T.J., 1983. Secondary metabolites and the higher classification of angiosperms. Nord. J. Bot. 3, 5 - 34.
- Goodwin, T.W., Mercer, E.I., 1983. The alkaloids, in: Goodwin, T.W., Mercer, E.I. (Eds.), Introduction to plant biochemistry, second ed. Pergamon Press, Oxford, New York, pp. 480 – 527.
- 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". Biochem. Syst. Ecol. 27, 369 - 393.
- Gülz, P.G., 1994. Epicuticular leaf waxes in the evolution of the plant kingdom. J. Plant Physiol. 143, 453 - 464.
- Harborne, J.B., Turner, B.L., 1984. Plant chemosystematics. Academic Press, London.
- Harborne, J.B., 1998. Phytochemical methods - a guide to modern techniques of plant analysis, third ed. Chapman and Hall, London.

- Heywood, V.H., 1993. Flowering plants of the world. Oxford University Press, New York.
- Herbert, R.B., 1985. The biosynthesis of isoquinoline alkaloids, in: Phillipson, J.D., Roberts, M.F., Zenk, M.H. (Eds.), The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 213 - 228.
- Iwashina, T. 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. J. Plant Res. 113, 287 - 299.
- Johnson, D.M., Murray, N.A., 1995. Synopsis of the tribe Bocageae (Annonaceae), with revisions of *Cardiopetalum*, *Froesiodendron*, *Trigynaea*, *Bocagae* and *Hornschuchia*. Brittonia 47, 248 - 319.
- Juniper, B.E., Jeffree, C.E., 1983. Plant surfaces. Edward Arnold, London.
- Kunst, L., Samuels, A.L., 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. Prog. Lipid Res. 42, 51 - 80.
- Laakkonen, L., Jobson, R.W., Albert, V.A., 2006. A new model for the evolution of carnivory in the bladderwort plant (Utricularia): Adaptive changes in cytochrome c oxidase (COX) provide respiratory power. Plant Biol. 8 (6), 758 - 764.
- Leboeuf, M., Cavé, A., Bhaumik, P.K., Mukherjee, B., Mukherjee, R., 1982. The Phytochemistry of the Annonaceae. Phytochemistry 21 (12), 2783 - 2813.
- Les, D.H., Landolt, E., Crawford, D.J., 1997. Systematics of the Lemnaceae (duckweeds): inferences from micromolecular and morphological data. Pl. Syst. Evol. 204, 161 - 177.
- Liscombe, D.K., MacLeod, B.P., Loukanina, N., Nandi, O.I., Facchini, P.J., 2005. Evidence for the monophyletic evolution of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. Phytochemistry 66, 2500 - 2520.

- Lou, J., Yoshikawa, N., Hodson, M.C., Hall, B.D., 2007. Duplication and paralog sorting of *RPB2* and *RPB1* genes in core eudicots. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 850 - 862.
- Mabry, T.J., Markham, K.P., Thomas, M.B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin.
- Maffei, M., 1996. Chemotaxonomic significance of leaf wax alkanes in the Gramineae. *Biochem. Syst. Ecol.* 24 (1), 53 - 64.
- Mahiou, V., Roblot, F., Fournet, A., Hocquemiller, R., 2000. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (Annonaceae). *Phytochemistry* 54, 709 - 716.
- Markham, K.P., 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London.
- McClure, J.W., 1975. Physiology and functions of flavonoids, in: Harborne, J.B., Mabry, T.J.; Mabry, H. (Eds.), *The flavonoids*, v. 1. Academic Press, London, pp. 970 - 1055.
- Miyaki, C.Y., Russo, C.A.M., Pereira, S.L., 2001. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia, in: Matiolli, S.R. (Ed.), *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto, pp. 97 - 107.
- Mimura, M.R.M., Salatino, M.L.F., Salatino, A., Baumgratz, J.F.A., 1998. Alkanes from foliar epicuticular waxes of *Huberia* species: taxonomic implications. *Biochem. Syst. Ecol.* 26, 581 - 588.
- Mols, J.B., Gravendeel, B., Chatrou, L., Pirie, M.D., Bygrave, P.C., Chase, M.W., Keßler, P.J.A., 2004. Identifying clades in Asian Annonaceae: monophyletic genera in the polyphyletic Miliuseae. *Am. J. Bot.* 91 (4), 590 - 600.

- Moreira, I.C., Lago, J.H.G., Young, M.C.M., Roque, N.F., 2003. Antifungal aromadendrane sesquiterpenoids from the leaves of *Xylopia brasiliensis*. J. Braz. Chem. Soc. 14, 828 - 831.
- Nandi, O.I., Chase, M.W., Endress, P.K., 1998. A combined cladistic analysis of angiosperms using *rbcL* and non-molecular data sets. Ann. Missouri Bot. Gard. 85, 137 - 212.
- Nishiyama, Y., Moriyasu, M., Ichimaru, M., Iwasa, K., Kato, A., Mathenge, S.G., Mutiso, P.B.C., Juma, F.D., 2004. Quaternary isoquinoline alkaloids from *Xylopia parviflora*. Phytochemistry 65, 939 - 944.
- Oliveira, M.C., Menck, C.F.M., 2001. O mundo de RNA e a origem da complexidade da vida, in: Mاتيoli, S.R. (Ed.), Biologia Molecular e Evolução. Holos Editora, Ribeirão Preto, pp. 15 - 26.
- Oxelman, B., Bremer, B., 2000. Discovery of paralogous nuclear gene sequences coding for the second-largest subunit RNA Polymerase II (*RPB2*) and their phylogenetic utility in Gentianales of the Asterids. Mol. Biol. Evol. 17 (8), 1131 – 1145.
- Pereira, S.L., Miyaki, C.Y., Russo, C.A.M., 2001. Reconstrução filogenética: Métodos probabilísticos, in: Mاتيoli, S.R. (Ed.), Biologia Molecular e Evolução. Holos Editora, Ribeirão Preto, pp. 117 - 129.
- Pirie, M.D., Chatrou, L.W., Mols, J.B., Erkens R.H.J., Oosterhof, J., 2006. ‘Andean-centred’ genera in the short-branch clade of Annonaceae: testing biogeographical hypotheses using phylogeny reconstruction and molecular dating. J. Biogeogr. 33, 31 - 36.

- Popp, M., Oxelman, B., 2001. Inferring the history of the polyploid *Silene aegaea* (Caryophyllaceae) using plastid and homoeologous nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 20 (3), 474 - 481.
- Posada, D., Crandall, K.A., 2005. ModelTest. Version 3.7.win.
- Prince, L.M., Kress, W.J., 2006. Phylogenetic relationships and classification in Marantaceae: insights from plastid DNA sequence data. *Taxon* 55 (2), 281 - 296.
- Richardson, P.M., 1983. Flavonoids and phylogenetic systematics, in: Platnick, N.I., Funk, V.A. (Eds.), *Advances in cladistics*, v. 2. Columbia University Press, New York, pp. 115 - 123.
- Rodrigues, C.D.N., Salatino, A., 2006. Hydrocarbons from epicuticular waxes of *Allagoptera* (Arecaceae). *Bioch. Syst. Ecol.* 34, 265 - 266.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2005. MrBayes. Bayesian Analysis of Phylogeny. Version 3.1.2.
- Salatino, M.L.F., Salatino, A., 1983. Constituents of the unsaponifiable fraction of the foliar epicuticular wax and the systematics of the Annonaceae. *Revta. Brasil. Bot.* 6, 23 - 28.
- Santos, D.Y.A.C., Salatino, M.L.F., Salatino, A., 1995. Flavonoids of species of *Cuphea* (Lythraceae) from Brazil. *Biochem. Syst. Ecol.* 23 (1), 99 - 103.
- Santos, D.Y.A.C., Salatino, A., 1998. Fatty acids of seed oils of species of *Diplusodon* Pohl (Lythraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 26, 109 - 115.
- Santos, D.Y.A.C., Salatino, M.L.F., 2000. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry* 55, 567 - 573.
- Sauquet, H., Doyle, J.A., Scharaschkin, T., Borsch, T., Hilu, K.W., Chatrou, L.W., Le Thomas, A., 2003. Phylogenetic analysis of Magnoliales and Myristicaceae based

- on multiple data sets: implications for character evolution. Bot. J. Linn. Soc. 142, 125 - 186.
- Scharaschkin, T., Doyle, J.A., 2005. Phylogeny and historical biogeography of *Anaxagorea* (Annonaceae) using morphology and non-coding chloroplast sequence data. Syst. Bot. 30 (4), 712 - 735.
- Seaman, F.C., Funk, V.A., 1983. Cladistic analysis of complex natural products: developing transformation series from sesquiterpene lactone data. Taxon 32 (1), 1 - 27.
- Shepherd, T., Griffiths, D.W., 2006. The effects of stress on plant cuticular waxes. New Phytologist 171, 469 - 499.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis, in: Soltis D.E., Soltis, P.S. (Eds.), Molecular Systematics of Plants II - DNA Sequencing. Kluwer Academic Publishers, Boston/ Dordrecht/ London, pp.1 - 42.
- Stafford, H.A., 1990. Flavone and flavonol pathways, in: Stafford, H.A. (Ed.), Flavonoid Metabolism. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 47 - 62.
- Stevens, P.F., 2008. Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June, <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Su, Y.C.F., Smith, G.J.D., Saunders, R.M.K., 2008. Phylogeny of the basal angiosperm genus *Pseuduvaria* (Annonaceae) inferred from five DNA chloroplast regions, with interpretation of morphological character evolution. Mol. Phylogenet. and Evol. 48, 188 - 206.
- Suau, R., Cabezudo, B., Rico, R., Nájera, F., López-Romero, J.M., 2002. Direct determination of alkaloid contents in *Fumaria* species by GC-MS. Phyto. Anal. 13, 363 - 367.

- Swofford, D.L., 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet, P., Ludovic, G., Pautou, G., Bouvet, J., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17, 1105 - 1109.
- Taylor, D.W., Li, H., Dahl, J., Fago, F.J., Zinniker, D., Moldowan, J.M., 2006. Biogeochemical evidence for the presence of the angiosperm molecular fossil oleanane in Paleozoic and Mesozoic non-angiospermous fossils. *Paleobiol.* 32 (2), 179 - 190.
- Thorne, R.F., 1968. Synopsis of a putatively phylogenetic classification of the flowering plants. *Aliso* 6, 57 - 66.
- van Wyk, B.E., 2003. The value of chemosystematics in clarifying relationships in the genistoid tribes of papilionoid legumes. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 875 - 884.
- van Zuilen, C.M., Maas, J.W., van Brederone, J., Koek-Noorman, J., Maas, P.J.M., 1996. Phylogenetic relationships in Annonaceae, deduced from molecular and morphological data. *Studies in Annonaceae XXV*, in: Van Zuilen, C.M., Patterns and affinities in *Duguetia* alliance (Annonaceae). Molecular and Morphological Studies. Tese de Doutorado, Universidade de Utrech.
- Waterman, P.G., 1999. The chemical systematics of alkaloids: a review emphasizing the contribution of Robert Hegnauer. *Biochem. Syst. Ecol.* 27, 395 - 406.
- Wink, M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64, 3 - 19.

Wollenweber, E., Stevens, J., Dörr, M., Rozefelds, A.C., 2003. Taxonomic significance of flavonoid variation in temperate species of *Nothofagus*. *Phytochemistry* 62, 1125 - 1131.

Capítulo 2

Relações na tribo Bocageae Endlicher (Annonaceae) baseadas em sequências de DNA

(formatado para submissão a Botanical Journal of the Linnean Society)

ABSTRACT

RPB2, *coxI* and *matK* genes (moreover *trnK* intron that encloses *matK*), *trnL-trnF* intergenic spacer and *trnL* intron were sequenced from species of tribe Bocageae Endlicher. The sequences were analysed separately by Maximum Parsimony and Bayesian methods. The results from sequencing analyses were compared with the information from morphological study in order to investigate the relationships within the tribe. Although the two datasets support two clades in Bocageae: (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) and (*Trigynaea*, *Bocagea*, *Hornschuchia*), no congruence between morphological and sequencing data about relationships among *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum* and *Porcelia* were observed. On the other hand, the datasets were in agreement with the closer relationships between *Bocagea* and *Hornschuchia* than to *Trigynaea*.

ADDITIONAL KEYWORDS: Annonaceae - Bocageae - nucleotide sequences - phylogeny

RESUMO

Os genes *RPB2*, *coxI* e *matK* (além do intron *trnK* que inclui o *matK*), o espaçador intergênico *trnL-trnF* e o intron *trnL* foram sequenciados para espécies da tribo Bocageae Endlicher e analisados isoladamente pelos métodos de Máxima Parcimônia e Bayesiano. Os resultados das análises de sequenciamento foram comparados com as informações do estudo morfológico a fim de investigar as relações dentro da tribo. A comparação dos dois conjuntos de dados mostrou concordância quanto à proximidade entre os gêneros *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum* e *Porcelia*, assim como entre os gêneros *Trigynaea*, *Bocagea* e *Hornschuchia*. Não houve congruência entre os dados morfológicos e de sequenciamento quanto às relações entre *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum* e *Porcelia*. Por outro lado, os dados foram consoantes ao mostrar a maior proximidade entre *Bocagea* e *Hornschuchia* na relação estabelecida com *Trigynaea*.

PALAVRAS-CHAVE: Annonaceae - Bocageae - sequenciamento - filogenia

INTRODUÇÃO

Bocageae Endlicher (Annonaceae) compreende 61 espécies distribuídas em 7 gêneros: *Bocagea*, *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Froesiodendron*, *Hornschuchia*, *Porcelia* e *Trigynaea*. A tribo é neotropical e extremamente confinada às áreas de florestas úmidas da América do Sul.

As características diagnósticas da tribo são pólenes abrigados em políades de 8 grãos (óctades) ou mais e presença de pedicelo internodal, solitário, articulado na base e sem brácteas. Características adicionais são anteras septadas, exina polínica fortemente

columelada, presença de acessórios na semente e número cromossômico básico de $x = 9$ (Johnson & Murray, 1995).

Existem vários sistemas de classificação em Annonaceae que dividem os gêneros em tribos e/ou grupos. Uma forma de racionalizar esses sistemas é construir uma classificação formal das tribos baseada em estudos modernos. Dentre os inúmeros sistemas de classificação, o sistema elaborado por Fries (1959), baseado em características vegetativas, florais e dos frutos, é o que apresenta maior número de grupos apoiados por análises recentes. Um deles é o “Grupo Trigynaea”. Baseados em seu estudo morfológico, Johnson & Murray (1995) formalizaram a circunscrição desse grupo e adotaram o nome mais antigo disponível para a categoria: tribo Bocageae Endlicher.

Nos últimos anos, alguns trabalhos de sequenciamento de DNA de Annonaceae foram publicados (van Zuijlen *et al.*, 1996; Doyle, Bygrave & Le Thomas, 2000; Sauquet *et al.*, 2003; Mols *et al.*, 2004; Scharaschkin & Doyle, 2005; Pirie *et al.*, 2006; Su, Smith & Saunders, 2008). Nenhum deles analisou membros da tribo Bocageae. O objetivo desse trabalho é verificar se os dados de sequenciamento do DNA apoiam relações sugeridas na tribo pelo estudo morfológico de Johnson & Murray (1995).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material botânico

As espécies estudadas estão na Tabela 1. Exsicatas foram depositadas no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (SP), no Herbário do INPA em Manaus (AM), no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (MG) e no Herbário da Reserva Natural da Companhia Vale do Rio Doce em Linhares (ES). A

identificação do material foi confirmada pelo Dr. Renato de Mello-Silva, do Instituto de Biociências da USP em São Paulo.

No ato da coleta, as folhas foram fragmentadas e armazenadas em tubos plásticos contendo sílica com indicador de umidade.

2. Obtenção da sequências

O DNA genômico total foi extraído de 50 mg de folhas secas pelo método CTAB (Doyle & Doyle, 1987), com modificações (CTAB 2%; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl pH 8 100 mM; polivinilpolipirrolidona 1%; 2-mercaptoetanol 2%).

Os iniciadores utilizados nas reações de amplificação dos fragmentos e de amplificação para sequenciamento foram descritos em: Taberlet *et al.* (1991) [*c* e *f*, espaçador intergênico *trnL-trnF* e intron *trnL* do cloroplasto], Sauquet *et al.* (2003) [*trnK*-HSF2 e *trnK*-2R, gene *matK* e intron *trnK* do cloroplasto], Prince & Kress (2006) [445F e 1951R, gene *coxI* da mitocôndria], Popp & Oxelman (2001) [f7327 e r7586, gene *RPB2* do núcleo].

Para facilitar a apresentação e a posterior discussão dos resultados, a região *trnK*, incluindo o gene *matK*, foi mencionada como *trnK-matK* e a região do intron *trnL* e espaçador intergênico *trnL-trnF* foi mencionada como *trnL-trnL-F*.

Nas reações de amplificação dos fragmentos foram utilizados: 2 µL de DNA concentrado ou 10 µL diluído (1:100, 1:500 e 1:1000); 0,20 µL de Taq DNA polimerase (GoTaq DNA Polymerase - Promega); 10 µL de tampão; 3 µL de uma mistura de quatro dNTPs (2 mM cada); 0,5 µL de cada iniciador (a 10 µM); 2-10 µL de PVP 1% (polivinilpolipirrolidona) e água MiliQ até completar o volume para 50 µL. O programa para amplificação em termociclador foi: 1 ciclo de 94°C por 2 minutos; 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 47°C - 56°C por 2 minutos, 72°C por 3 minutos e 1 ciclo de 72°C por

10 minutos. Os produtos amplificados foram purificados de acordo com a orientação do fornecedor (GFX PCR and Gel Band Purification Kit - Armesham Biosciences).

Após a purificação, os fragmentos de DNA foram submetidos à outra reação de amplificação para o posterior sequenciamento (sequenciador automático ABIPrism 3100 - Perkin Elmer).

As reações de amplificação para sequenciamento foram realizadas em placas. Foi feita uma reação para o iniciador direto e outra reação para o iniciador reverso. Em cada reação foram utilizados: 7 µL de produto amplificado; 0,30 µL de iniciador (a 10 µM) e 2 µL de BigDye Terminator (versão 3.1, Applied Biosystems). O programa para amplificação em termociclador foi: 40 ciclos de 10 segundos a 96°C, 20 segundos a 53°C, 4 minutos a 60°C.

Os produtos das reações de amplificação para sequenciamento foram precipitados com 50 µL de isopropanol 70% (20 minutos a temperatura ambiente) e centrifugados a 4000 rpm por 40 minutos. Após o descarte dos sobrenadantes, foram adicionados 200 µL de etanol 70%. A placa foi à centrífuga e submetida a 4000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados. Os pellets secaram em Speed Vac após 5 minutos.

Na placa, os pellets foram dissolvidos em HI-DI e mantidos a 94°C por 2 minutos. Em seguida, a placa foi transferida para o gelo, a fim de desnaturar o DNA, e levada para o sequenciador automático (ABIPrism 3100 - Perkin Elmer).

As sequências foram editadas no programa BioEdit versão 7.0.0 (Hall, 2004) e alinhadas automaticamente no ClustalW, incluído no programa BioEdit. Foram feitos ajustes manuais nos alinhamentos. Trechos iniciais e finais das sequências foram excluídos a fim de evitar alinhamentos ambíguos e excesso de falta de dados (missing data): 93 bases no início da sequência do gene *coxI*, 49 bases iniciais e 34 bases finais

da sequência do gene *RPB2*, 151 bases no início e 53 bases no final da sequência da região *trnK-matK*, as primeiras 96 bases e as últimas 48 bases da sequência da região *trnL-trnL-F*.

3. Análise filogenética

A análise de Máxima Parcimônia foi realizada no programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002). Cada região foi submetida à busca heurística com 1 árvore retida a cada passo do simple stepwise sequence addition, opção tree-bisection-reconnection (TBR) para branch-swapping e peso igual para todos os caracteres. *Annona coriacea* e *Annona crassiflora* foram tratadas como grupo externo. As árvores de consenso estrito e de consenso de maioria foram calculadas quando duas ou mais árvores igualmente parcimoniosas foram obtidas. A confiabilidade dos clados foi avaliada pelo método Bootstrap com 1000 réplicas e estratégia de busca igual àquela usada na análise de Máxima Parcimônia. O apoio foi considerado forte para o intervalo 85-100% (Pirie *et al.*, 2006).

Os modelos de substituição do DNA usados na análise Bayesiana foram determinados com o programa ModelTest 3.7.win (Posada & Crandall, 2005), pelo método hLRTs [Hierarchical Likelihood Ratio Tests]. A análise Bayesiana foi realizada no programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2005). Quatro cadeias foram utilizadas em 2 réplicas independentes para $5,0 \times 10^6$ de gerações, com 1 árvore salva a cada 100 gerações. O ponto de corte para as árvores (burnin) correspondeu ao número de gerações a partir do qual as probabilidades ($-\ln L$) tornaram-se estáveis. A confiabilidade dos clados foi avaliada pelo método Bayesiano de Probabilidades Posteriores, calculada a partir do consenso de maioria das árvores que não foram

descartadas. O apoio foi considerado forte para valores iguais ou superiores a 95 (Su *et al.*, 2008).

RESULTADOS

Das quatro regiões estudadas, apenas *coxI* e *RPB2* foram amplificadas para *Bocagea* sp. nov., apesar das várias tentativas com os outros dois marcadores. Para as demais espécies, todas as regiões foram amplificadas.

Os resultados das análises de Máxima Parcimônia para cada região estão na Tabela 2. As análises definiram o clado *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum* e *Porcelia* com forte apoio dos valores de confiabilidade (superiores a 85%), no caso das regiões *coxI*, *RPB2* e *trnK-matK* (Fig. 1A, B, D). Porém as relações dentro do clado foram conflitantes entre esses marcadores. Para *coxI* (Fig. 1A) *Cardiopetalum* é grupo irmão de *Porcelia*, mas para *RPB2* (Fig. 1B) e *trnK-matK* (Fig. 1D) é *Cymbopetalum* o grupo irmão de *Porcelia*. No caso da região do *trnL-trnL-F* (Fig. 1C), *Cardiopetalum* ficou em politomia com os demais gêneros da tribo, e *Porcelia* surgiu como grupo irmão de *Cymbopetalum*. Os gêneros *Bocagea*, *Trigynaea* e as espécies de *Hornschuchia* ocuparam posições diferentes nos cladogramas de cada marcador analisado (Fig. 1A, B, D). As topologias das árvores de consenso estrito (não apresentadas) e de maioria foram idênticas para cada marcador. Desse modo, a discussão dos resultados foi realizada com base no consenso de maioria para viabilizar a comparação com os resultados das análises Bayesianas.

Na Tabela 3 estão os modelos de substituição do DNA e os parâmetros selecionados para cada região analisada pelo método Bayesiano. Os resultados das análises Bayesianas das regiões *coxI*, *trnL-trnL-F* e *trnK-matK* (Fig. 2A, C, D) quanto à relação de *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum* e *Porcelia* apresentaram forte apoio dos

valores de confiabilidade (superiores a 95) e foram semelhantes àqueles obtidos com o método de Máxima Parcimônia (Fig. 1A, C, D). Diferente da análise de Máxima Parcimônia da região *trnL-trnL-F* (Fig. 1C), a análise Bayesiana definiu um posicionamento para *Cardiopetalum* como grupo irmão de *Porcelia* e *Cymbopetalum* (Fig. 2C). A análise Bayesiana do *RPB2* (Fig. 2B) definiu relação entre *Trigyneae*, *Bocagea* e *Hornschuchia* com alta confiabilidade (valor 100). A maior proximidade entre *Trigyneae* e *Hornschuchia*, dentro da tribo, também foi sugerida pelas análises de Máxima Parcimônia (Fig. 1C) e Bayesiana (Fig. 2C) do *trnL-trnL-F*, sem o apoio dos respectivos índices de confiabilidade (Bootstrap < 50% e Probabilidade Posterior de 87).

DISCUSSÃO

Os altos valores de confiabilidade do clado (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) calculados nas análises das regiões *coxI*, *RPB2*, *trnL-trnL-F* e *trnK-matK* com dois métodos distintos de inferência filogenética, Máxima Parcimônia (Fig. 1A, B, D) e Bayesiana (Fig. 2A, C, D), apoiaram de maneira consistente a grande proximidade entre esses gêneros dentro da tribo Bocageae. A existência dessa relação já havia sido sugerida por Johnson & Murray (1995) que utilizaram características vegetativas, florais, dos frutos e das sementes em uma análise filogenética da tribo.

Pela análise de Máxima Parcimônia dos caracteres morfológicos, *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum* e *Porcelia* foram unidos pela perda da carúncula, um acessório da semente. Dentro desse clado, *Porcelia* foi posicionado como grupo irmão de *Cardiopetalum* e *Cymbopetalum* (Johnson & Murray, 1995). Os dados de sequenciamento, no entanto discordaram da relação (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*).

As análises do gene *coxI* com os métodos de Máxima Parcimônia (Fig. 1A) e Bayesiano (Fig. 2A) sugeriram maior relação de *Cardiopetalum* com *Porcelia*. Na análise morfológica, a relação entre *Cardiopetalum* e *Cymbopetalum* foi justificada pela ocorrência de deiscência abaxial dos monocarpós e um tipo de arilo bilobado nas sementes que, segundo Johnson & Murray (1995), não é encontrado nos demais gêneros de Annonaceae. Essa característica do fruto, exclusiva de *Cardiopetalum* e *Cymbopetalum*, forneceu um apoio consistente para sua mútua proximidade dentro da tribo.

Um fato que enfraqueceu a evidência fornecida pelo sequenciamento do gene *coxI* sobre a maior proximidade entre *Cardiopetalum* e *Porcelia* foi os valores de confiabilidade obtidos pelos métodos Bootstrap (Fig. 1A) e das Probabilidades Posteriores (Fig. 2A) que ficaram abaixo daqueles considerados fortes para apoiar relações filogenéticas. Outro fato que enfraqueceu a relação foi a ausência de outras evidências a seu favor, uma vez que o clado (*Cardiopetalum*, *Porcelia*) não apareceu nas análises dos outros três marcadores (*RPB2*, *trnL-trnL-F* e *trnK-matK*).

Por sua vez, as análises de Máxima Parcimônia das regiões *RPB2* (Fig. 1B), *trnL-trnL-F* (Fig. 1C), *trnK-matK* (Fig. 1D) e as análises Bayesianas das regiões *trnL-trnL-F* (Fig. 2C) e *trnK-matK* (Fig. 2D) sugeriram maior proximidade entre *Porcelia* e *Cymbopetalum*. A semelhança entre esses gêneros foi observada também quanto às características morfológicas. As flores de várias espécies de *Cymbopetalum* e *Porcelia* são extremamente parecidas. Sépalas reduzidas, pétalas grandes e livres, “tecido alimentador de besouros” e morfologia dos estames reforçam a semelhança entre os dois gêneros. No entanto, esses estados de caráter são compartilhados com outros gêneros de Annonaceae (Johnson & Murray, 1995).

Os valores dos índices de confiabilidade, calculados para as análises das sequências de DNA, não apoiaram consistentemente a relação entre *Cymbopetalum* e *Porcelia* (Fig. 1B, C, D e Fig. 2C, D). Porém, deve-se considerar que ela foi evidenciada com três marcadores distintos por dois métodos de inferência filogenética. Segundo Chen, Bonillo & Leointre (2003), é preferível aceitar um clado inferido repetidas vezes a partir de diferentes conjuntos de dados, mesmo com baixos valores de confiabilidade, do que aceitar um clado fortemente apoiado, mas inferido a partir de um único conjunto de dados. Por outro lado, os atributos dos frutos compartilhados por *Cardiopetalum* e *Cymbopetalum* são exclusivos desses dois gêneros (Johnson & Murray, 1995) o que se opõe às evidências a favor da relação *Cymbopetalum* e *Porcelia*.

Os demais gêneros estudados, *Trigynaea*, *Bocagea* e *Hornschuchia*, apareceram unidos na análise Bayesiana do gene *RPB2* com alto valor de Probabilidade Posterior (Fig. 2B). Esse mesmo clado apareceu na análise de Máxima Parcimônia de Johnson & Murray (1995), apoiado por um conjunto de oito características florais e dos frutos: sépalas persistentes nos frutos, ápice interno da sépala trigonoso, pequeno diâmetro do tórus, pequeno número de estames, conectivos da antera alongados, ápice do conectivo da antera não se estende sobre os lóculos, exina do pólen tectado variável e estigmas não articulados.

A análise do *RPB2* sugeriu que *Bocagea* e *Hornschuchia* estão mais próximos entre si do que de *Trigynaea* (Fig. 2B). Essa mesma relação foi sugerida pelo estudo morfológico em que a redução no número de estames no clado (*Bocagea*, *Hornschuchia*) apoiou sua separação de *Trigynaea* (Johnson & Murray, 1995).

É interessante observar a relação entre *Trigynaea* e *Hornschuchia* sugerida pelas análises de Máxima Parcimônia (Fig. 1C) e Bayesiana (Fig. 2C) da região *trnL-trnL-F*. Mesmo que não tenha sido possível obter a sequência para *Bocagea*, o isolamento de

Trigynaea e *Hornschuchia* foi preservado, uma vez que esses dois gêneros divergiram juntos do restante dos gêneros da tribo.

Deve-se ressaltar que as análises das sequências das regiões *coxI*, *RPB2*, *trnL-trnL-F* e *trnK-matK*, com suas distintas contribuições, forneceram evidências para apoiar dois clados inferidos na análise dos dados morfológicos da tribo Bocageae Endlicher realizada por Johnson & Murray (1995). O sequenciamento das regiões *coxI*, *RPB2*, *trnL-trnL-F* e *trnK-matK* apoiaram o clado (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) [Figs 1A, B, D e 2A, C, D] e as sequências de *RPB2* apoiaram o clado (*Trigynaea*, *Bocagea*, *Hornschuchia*) [Fig. 2B]. Além disso, o sequenciamento da região *trnL-trnL-F*, sem a análise de *Bocagea*, apoiou a divergência de *Trigynaea* e *Hornschuchia* do restante dos gêneros da tribo (Figs 1C e 2C). As relações dentro de cada clado não concordaram em todas as análises de sequenciamento, mas acrescentaram informações ao estudo morfológico.

Dentro do clado (*Trigynaea*, *Bocagea*, *Hornschuchia*), a proximidade de *Bocagea* e *Hornschuchia*, sugerida por características florais, foi apoiada pelo sequenciamento da região *RPB2* (Fig. 2B).

Os dados de sequenciamento trouxeram novas evidências quanto às relações no clado (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) distintas daquelas inferidas pela análise morfológica. *Cymbopetalum* e *Porcelia* foram considerados muito semelhantes quanto à morfologia floral. Essa semelhança, porém, foi tratada como homoplasia por ter sido identificada em outros gêneros de Annonaceae. Por outro lado, características da morfologia dos frutos de *Cymbopetalum* e *Cardiopetalum*, consideradas únicas dentro da família, uniram esses dois gêneros. No entanto, os marcadores *RPB2*, *trnL-trnL-F* e *trnK-matK* sugeriram uma relação muito estreita entre *Cymbopetalum* e *Porcelia* (Figs 1B, C, D e 2C, D). Além disso, nenhum dado de sequenciamento

ofereceu evidências a favor da estreita relação entre *Cymbopetalum* e *Cardiopetalum* dentro da tribo.

Tabela 1. Espécies estudadas, locais de coleta e voucher.

Espécie	Local de coleta	Voucher
Grupo externo		
<i>Annona coriacea</i> Mart.	Reserva Biológica Experimental de Mogi-Guaçu, Mogi-Guaçu (SP)	sem voucher
<i>Annona crassiflora</i> Mart.	Reserva Biológica Experimental de Mogi-Guaçu, Mogi-Guaçu (SP)	SPF 179.338 (SPF)
Bocageae Endlicher		
<i>Bocagea</i> sp. nov. Morawetz	Cubatão (SP)	Benko-Iseppon 1 (SPF)
<i>Cardiopetalum calophyllum</i> Schlechtendal	Parque do Sabiá, Uberlândia (MG)	R. Romero <i>et al.</i> 7721 (HUFU)
<i>Cymbopetalum brasiliense</i> (Vellozo) Benth. ex Baillon	Reserva Natural CVRD, Linhares (ES)	C. Rocini 19 (SPF, CVRD)
<i>Cymbopetalum euneurum</i> N. A. Murray, sp. nov.	Reserva Florestal Ducke, Manaus (AM)	C. Rocini s.n. (SPF, INPA)
<i>Hornschuchia bryothrophe</i> Nees	Reserva Natural CVRD, Linhares (ES)	C. Rocini 7 (SPF, CVRD)
<i>Hornschuchia</i> af. <i>cauliflora</i> Maas & Setten	Almadina (BA)	P. Fiaschi 2784 (SPF)
<i>Hornschuchia citriodora</i> D. M. Johnson	Reserva Natural CVRD, Linhares (ES)	C. Rocini 5 (CVRD)
<i>Hornschuchia myrtillus</i> Nees	Reserva Natural CVRD, Linhares (ES)	P. Fiaschi 2743 (SPF)
<i>Porcelia macrocarpa</i> (Warming) R. E. Fries	Parque Estadual as Fontes do Ipiranga, São Paulo (SP)	W. Hoehne s.n. SPF 123558 (SPF)
<i>Trigynaea oblongifolia</i> Sechlehtendal	Ilha da Cotia, Parati (RJ)	Mello-Silva 2876 (SPF)

SPF, Herbário da Universidade de São Paulo.

HUFU, Herbário da Universidade Federal de Uberlândia.

CVRD, Herbário da Companhia Vale do Rio Doce.

INPA, Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Tabela 2. Resultados da análise de Máxima Parcimônia.

Região	Número de caracteres original	Número de caracteres final *	Caracteres variáveis	Caracteres informativos	Árvores mais parcimoniosas	Tamanho das árvores	Índice de consistência (IC)	Índice de retenção (IR)
<i>coxI</i>	897	804	2	263	1	268	1	1
<i>RPB2</i>	916	833	253	190	1	642	0, 8738	0, 7712
<i>trnL-trnL-F</i>	1154	1010	287	155	4	573	0, 9058	0, 7061
<i>trnK-matK</i>	1088	884	494	99	4	753	0, 9283	0, 6376

* após a exclusão de trechos das sequências.

Tabela 3. Modelos de substituição e parâmetros usados na análise Bayesiana.

Região	Modelo selecionado por hLRT	Frequências de bases				Ti/ Tv	G
		A	C	G	T		
<i>coxI</i>	HKY + G	0,2558	0,2296	0,1915	0,3231	2, 6012	0, 1190
<i>RPB2</i>	HKY	0,2970	0,1847	0,1938	0,3245	0, 9133	<u>Equal</u>
<i>trnL-trnL-F</i>	HKY + G	0,3076	0,1999	0,1999	0,2926	0, 7788	2, 4728
<i>trnK-matK</i>	HKY + G	0,2779	0,2244	0,2227	0,2750	0, 8346	2, 4956

HKY (Hasegawa, Kishino & Yano, 1985); Ti/ Tv, taxa de transição/ transversão; G, distribuição gama.

Figura 1A-D. Análise de Máxima Parcimônia. Árvores de consenso de maioria: A. gene mitocondrial *coxI* (1 árvore; 268 passos; I.C. = 1; I.R. = 1); B. gene nuclear *RPB2* (1 árvore; 642 passos; I.C. = 0,8738; I.R. = 0,7712); C. região *trnL-trnL-F* do cloroplasto (4 árvores; 573 passos; I.C. = 0,9058; I.R. = 0,7796); D. região *trnK-matK* do cloroplasto (4 árvores; 753 passos; I.C. = 0,9283; I.R. = 0,6376). Os números nos ramos são os valores de confiabilidade (Bootstrap; apoio forte entre 85 e 100%).

Figura 2A-D. Análise Bayesiana. Árvores de consenso de maioria: A. gene mitocondrial *coxI* (95780 árvores); B. gene nuclear *RPB2* (121 árvores); C. região *trnL-trnL-F* do cloroplasto (119 árvores); D. região *trnK-matK* do cloroplasto (120 árvores). Os números nos ramos são os valores de confiabilidade (Probabilidades Posteriores; apoio forte para valores iguais ou superiores a 95).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chen WJ, Bonillo C, Leointre G. 2003.** Repeatability of clades as a criterion of reliability: a case study for molecular phylogeny of Acanathomorpha (Teleostei) with larger number of taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**: 262 - 288.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **19**: 11 - 15.
- Doyle JA, Bygrave P, Le Thomas A. 2000.** Implications of molecular data for pollen evolution in Annonaceae. In: Harley MM, Morton CM, Blackmore S, eds. *Pollen and spores: morphology and biology*. Royal Botanical Gardens, Kew, pp. 259 - 284.
- Fries RE. 1959.** Annonaceae. In: Engler A, Prantl K, eds. *Die natürlichen Pflanzenfamilien end. 2nd* 17A. Berlin: Duncker and Humblot.
- Hall T. 2004.** BioEdit. Version 7.0.0, Ibis Therapeutics, a division of Isis Pharmaceuticals, Inc.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T. 1985.** Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **21**: 160 – 174.
- Johnson DM, Murray NA. 1995.** Synopsis of the tribe Bocageae (Annonaceae), with revisions of *Cardiopetalum*, *Froesiodendron*, *Trigynaea*, *Bocagea* and *Hornschuchia*. *Brittonia* **47**: 248 - 319.
- Mols JB, Gravendeel B, Chatrou L, Pirie MD, Bygrave PC, Chase MW, Keßler PJA. 2004.** Identifying clades in Asian Annonaceae: monophyletic genera in the polyphyletic Miliuseae. *American Journal of Botany* **91** (4): 590 - 600.

- Pirie MD, Chatrou LW, Mols JB, Erkens RHJ, Oosterhof J. 2006.** ‘Andean-centred’ genera in the short-branch clade of Annonaceae: testing biogeographical hypotheses using phylogeny reconstruction and molecular dating. *Journal of Biogeography* **33**: 31 - 36.
- Popp M, Oxelman B. 2001.** Inferring the history of the polyploid *Silene aegaea* (Caryophyllaceae) using plastid and homoeologous nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **20 (3)**: 474 - 481.
- Posada D, Crandall KA. 2005.** ModelTest. Version 3.7.win.
- Prince LM, Kress WJ. 2006.** Phylogenetic relationships and classification in Marantaceae: insights from plastid DNA sequence data. *Taxon* **55 (2)**: 281 - 296.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2005.** MrBayes. Bayesian Analysis of Phylogeny. Version 3.1.2.
- Sauquet H, Doyle JA, Scharaschkin T, Borsch T, Hilu KW, Chatrou LW, Le Thomas A. 2003.** Phylogenetic analysis of Magnoliales and Myristicaceae based on multiple data sets: implications for character evolution. *Botanical Journal of the Linnean Society* **142**: 125 - 186.
- Scharaschkin T, Doyle JA, 2005.** Phylogeny and historical biogeography of *Anaxagorea* (Annonaceae) using morphology and non-coding chloroplast sequence data. *Systematic Botany* **30 (4)**: 712 - 735.
- Su YCF, Smith GJD, Saunders RMK. 2008.** Phylogeny of the basal angiosperm genus *Pseuduvaria* (Annonaceae) inferred from five DNA chloroplast regions, with interpretation of morphological character evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **48**: 188 - 206.
- Swofford DL. 2002.** PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4, 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.

van Zuilen CM, Maas JW, van Brederone J, Koek-Noorman J, Maas PJM. 1996. Phylogenetic relationships in Annonaceae, deduced from molecular and morphological data. Studies in Annonaceae XXV. In: Van Zuilen CM. *Patterns and affinities in Duguetia alliance (Annonaceae). Molecular and Morphological Studies*. Tese de Doutorado não publicada, Universidade de Utrech.

Capítulo 3

Relações químicas na tribo Bocageae Endlicher (Annonaceae)

(formatado para submissão a Biochemical Systematics and Ecology)

Abstract

Relationships within the tribe Bocageae Endlicher (Annonaceae) were investigated using the distribution of alkaloids, cuticular waxes components and flavonoids. Bocageae and *Annona* stood out from the rest of Annonaceae because of the presence of pyrrolizidine alkaloids. No other report about these alkaloids is known in Annonaceae. The distribution of waxes components suggested that decarbonylation and acyl reduction pathways synthesized the same components in ((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)) and ((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)). However, within each clade, the pathways activity changed among the genera and delimited chemical groups did not agree with the relationships found with the morphological data. The flavonoid distribution distinguished two clades proposed by morphological phylogeny of Bocageae. (*Bocagea*, *Hornschuchia*, *Trigynaea*) presented apigenin and synthesizes quercetin through dihydrokaempferol. (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) was notable because of the luteolin and the synthesis of quercetin through dihydrokaempferol and eriodictyol.

Keywords: Bocageae; Annonaceae; Alkaloids; Cuticular Waxes; Flavonoids; Chemotaxonomy.

Resumo

As relações na tribo Bocageae Endlicher (Annonaceae) foram investigadas com base na distribuição dos alcaloides, componentes das ceras cuticulares e flavonoides. A presença de alcaloides pirrolizidínicos destacou Bocageae e *Annona* dentro de Annonaceae, que até agora não possuía relatos da ocorrência desse tipo de alcaloide entre seus membros. A distribuição dos componentes das ceras sugeriu que as vias da descarboxilação e da redução acil produziram os mesmos componentes em (*Bocagea*, *Hornschuchia*, *Trigynaea*) e (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*). No entanto, dentro de cada clado, a atividade das vias variou entre os gêneros e delimitou grupos químicos que não foram congruentes com as relações estabelecidas pelos dados morfológicos. Por sua vez, a distribuição dos flavonoides diferenciou dois cladogramas postulados na filogenia morfológica de Bocageae. (*Bocagea*, *Hornschuchia*, *Trigynaea*) apresentou apigenina e síntese de quercetina via di-hidrocampferol. (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) destacou-se pela presença de luteolina e síntese de quercetina pelas vias di-hidrocampferol e eriodictiol.

Palavras-chave: Bocageae; Annonaceae; Alcaloides; Ceras Cuticulares; Flavonoides; Quimiotaxonomia.

1. Introdução

A tribo Bocageae Endlicher (Annonaceae) é neotropical e restrita às áreas de florestas úmidas da América do Sul. A tribo é composta pelos gêneros *Bocagea*, *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Froesiodendron*, *Hornschuchia*, *Porcelia* e *Trigynaea*. Foi definida dessa maneira com base na morfologia da inflorescência; todos os

integrantes da tribo possuem pedicelo internodal solitário, articulado na base e sem brácteas (Johnson e Murray, 1995).

As relações entre as plantas têm sido estudadas com o uso de diversos tipos de caracteres, entre eles os morfológicos e os químicos.

No caso de Bocageae, uma hipótese filogenética de relação entre os sete gêneros foi estabelecida com base em atributos vegetativos, florais, dos frutos e das sementes (Johnson e Murray, 1995). Essa hipótese propôs que ((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)) é o clado irmão de (((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)) (*Froesiodendron*)).

Há dois trabalhos fitoquímicos com enfoque taxonômico que envolveram espécies da tribo Bocageae. O estudo dos flavonoides de Annonaceae realizado por Santos e Salatino (2000) incluiu onze espécies da tribo Bocageae que se destacaram por acumular flavonas e flavonóis 6-oxigenados, além de flavonóis-7-*O*-metilados. Em seu trabalho sobre a composição das ceras cuticulares, Salatino e Salatino (1983) estudaram uma espécie de Bocageae (*Porcelia macrocarpa*) que apresentou características distintas daquelas observadas na maioria dos outros gêneros de Annonaceae.

Nos dois estudos fitoquímicos, os integrantes da tribo Bocageae apresentaram características químicas peculiares que os diferenciaram dos demais membros de Annonaceae. Esses trabalhos sugerem que houve uma evolução da biossíntese de substâncias em Bocageae e, por isso, os dados fitoquímicos seriam potencialmente úteis para investigar as relações dentro da tribo. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é verificar se os dados fitoquímicos apoiam as relações na tribo sugeridas pelo estudo morfológico de Johnson e Murray (1995).

2. Materiais e métodos

2.1. Material botânico

Alcaloides, componentes das ceras cuticulares e flavonoides foram isolados de espécies pertencentes a *Annona* (grupo externo) e à tribo Bocageae Endlicher (Tabela 1). Os dados fitoquímicos de *Annona* foram comparados com os dados de Bocageae com o propósito de investigar a evolução química dentro da tribo.

Exsicatas foram depositadas no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (SP), no Herbário do INPA em Manaus (AM), no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (MG) e no Herbário da Reserva Natural da Companhia Vale do Rio Doce em Linhares (ES). A identificação do material foi confirmada pelo Dr. Renato de Mello-Silva, do Instituto de Biociências da USP em São Paulo.

2.2. Isolamento e identificação dos alcaloides

Foi utilizada a metodologia proposta por Suau et al. (2002), com modificações.

Cinquenta gramas de folhas secas e pulverizadas foram macerados em etanol : ácido acético (90 : 10) à temperatura ambiente por 17 horas, protegidos da luz. O extrato foi centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi filtrado para um erlenmeier e alcalinizado com hidróxido de amônio até pH 8 a 9. A indicação do pH foi obtida com papel tornasol.

O extrato alcalinizado foi particionado com clorofórmio em funil de separação. Essa etapa foi realizada três vezes. As frações clorofórmicas foram reunidas; a fração resultante foi filtrada em sulfato de sódio e concentrada sob pressão reduzida em rotaevaporador. A fração aquosa alcalinizada foi descartada. A fração clorofórmica foi impregnada em gel de sílica 60 (Mesh 230-400) e particionada por cromatografia em

coluna de gel de sílica eluída com clorofórmio-metanol sucessivamente nas proporções 30 : 1, 30 : 2, 30 : 3 e 30 : 4.

As frações foram secas em banho-maria e solubilizadas em diclorometano para a identificação dos alcaloides. A identificação foi realizada por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas com impacto de elétrons (GC-EIMS, Shimadzu 14B/QP5050A) e comparação dos espectros de massas obtidos com os espectros de massas disponíveis na literatura.

As condições da análise GC-EIMS foram: gás de arraste hélio, com fluxo de 1mL/min; temperatura do injetor e do detector 300°C; temperatura da coluna (DB5 5Polar) variou de 150°C a 300°C, com acréscimos de 10°C/min; temperatura final da coluna (300°C) mantida por 15 min.

2.3. Isolamento e identificação dos componentes das ceras cuticulares

Foi utilizada a metodologia descrita em Juniper e Jeffree (1983), com modificações.

As ceras cuticulares foram extraídas de folhas secas e íntegras por 3 imersões de 30 segundos em clorofórmio. O extrato foi filtrado para um balão de destilação e concentrado sob pressão reduzida em rotaevaporador. A cera foi impregnada em gel de sílica 60 (Mesh 230-400) e particionada por cromatografia em coluna de gel de sílica eluída com clorofórmio. Para impregnar a sílica, a cera foi solubilizada em clorofórmio, misturada à sílica e mantida em banho-maria até a evaporação total do solvente.

As classes dos componentes da fração clorofórmio foram isoladas e identificadas por cromatografia em camada delgada de sílica (G Typ 60) com fluoresceína sódica 0,02% (Salatino e Salatino, 1983) e desenvolvida com a fase móvel hexano-clorofórmio (73: 27). A identificação dos constituintes da cera foi realizada por cromatografia com

amostras padronizadas. A detecção dos componentes na placa cromatográfica foi realizada sob luz UV.

2.4. Isolamento e identificação dos flavonoides

Foram utilizadas as metodologias propostas por Mabry et al. (1970), Markham (1982) e Harborne (1998), com modificações.

Folhas secas e pulverizadas foram submetidas a 3 extrações de 1 hora em metanol 80% sob refluxo. Os extratos foram fracionados por cromatografia em coluna e/ou por cromatografia em papel. Na cromatografia em coluna foi utilizada polivinilpolipirrolidona como adsorvente e metanol/metanol 80% como fases móveis. Na cromatografia em papel foi utilizado papel cromatográfico Whatman 1Chr/ou 3 MM Chr com os sistemas butanol-ácido acético-água (6: 1: 2) ou ácido acético 15%.

A identificação foi realizada por espectrofotometria de UV-Visível (espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC) com adição de reagentes ionizantes (hidróxido de potássio e acetato de sódio) e complexantes (ácido bórico, cloreto de alumínio e ácido clorídrico) à solução metanólica de flavonoide. A identificação dos flavonoides foi confirmada por cromatografia em camada delgada de celulose com padrões das agliconas (desenvolvida em clorofórmio-ácido acético-água, 30: 15: 2) após a realização da hidrólise ácida (ácido clorídrico 1 N).

Os dados de Santos e Salatino (2000) foram utilizados nesse estudo (Tabela 2). *Annona crassiflora*, *Cardiopetalum calophyllum*, *Porcelia macrocarpa* e *Trigynaea oblongifolia*, que foram previamente estudadas, tiveram outros exemplares analisados a fim de verificar a variabilidade dos perfis flavonoídicos (Tabela 2).

3. Resultados e discussão

Nas espécies de *Bocageae* e *Annona* (Tabela 2), foram detectados alcaloides cujos espectros de massa sugeriram estruturas pertencentes às classes dos pirrolizidínicos e dos isoquinolínicos (Fig. 1). Os alcaloides pirrolizidínicos tiveram a maior distribuição, foram detectados em todas as espécies analisadas (Tabela 2); os isoquinolínicos foram detectados apenas em *Annona crassiflora* (Egydio, comunicação pessoal).

Os alcaloides pirrolizidínicos são derivados da L-ornitina; são estruturalmente diversificados, mas possuem um núcleo fundamental denominado necina [Fig. 1] (Goodwin e Mercer, 1983). Os espectros das espécies analisadas apresentaram fragmentos com massas 168, 151, 110, 96 e 43 (íon base), que são característicos das necinas do tipo otonecina (Trigo et al., 2003) [Fig. 1B].

A maioria dos alcaloides pirrolizidínicos conhecida foi encontrada em *Asteraceae*, particularmente em *Senecio* (Asterales, asteride II), *Boraginaceae* (asteride I) e *Fabaceae* (Fabales, rosíde I), mas alcaloides pirrolizidínicos também foram detectados em *Apocynaceae* (Gentianales, asteride I), *Casuarinaceae* (Fagales, rosíde I), *Convolvulaceae* (Solanales, asteride I), *Liliaceae* (Liliales, monocotiledôneas), *Linaceae* (Malpighiales, rosíde I), *Orchidaceae* (Asparagales, monocotiledôneas), *Poaceae* (Poales, monocotiledôneas), *Ranunculaceae* (Ranunculales, eudicoteledôneas), *Santalaceae* (Santalales, eudicoteledôneas core) e *Scrophulariaceae* (Lamiales, asteride I) (Bah e Pereda-Miranda, 1999; Stevens, 2008).

Grande parte dos alcaloides encontrada em *Annonaceae* pertence ao grupo dos isoquinolínicos, derivados da L-tirosina (Herbert, 1985), mas também foram relatadas as ocorrências de vários alcaloides das classes dos isoprenilindóis e sesquiterpenilindóis, além de alcaloides dos grupos das xantinas (cafeína), quinolinas

(quinidina e hidroquinidina), naftiridinas (canangina), onichinas (1-aza-4-metilfluorenona) e pirimidina- β -carbolinas (annomontina e metoxiannomontina) (Leboeuf et al., 1982).

Não foram encontrados relatos da ocorrência de alcaloides pirrolizidínicos em Annonaceae até o momento. Os trabalhos mais recentes sobre alcaloides que envolvem membros da tribo Bocageae relataram a presença de alcaloides das classes dos azaantracenos e dos azafluorenos, em *Porcelia macrocarpa* (Chaves et al., 2001), e de alcaloides isoquinolínicos do grupo das aporfinas, em *Hornschuchia obliqua* (Fechine et al., 2003).

Dentre as espécies de *Annona* incluídas neste trabalho, apenas em *Annona crassiflora* foi detectada a presença de alcaloides isoquinolínicos (aporfina, benzilisoquinolina e fenantreno) (Egydio, comunicação pessoal), mas além deles, foram encontradas substâncias cujos espectros de massa apresentaram o padrão de fragmentação 168, 151, 110, 96 e íon base 43 característico dos alcaloides pirrolizidínicos com estrutura de otonecina (Fig. 1B). A presença de alcaloides com estruturas diferentes daquelas encontradas na classe dos isoquinolínicos já foi relatada em espécies de *Annona*. A cafeína (uma xantina) foi relatada como um dos principais constituintes das sementes de *Annona cherimolia* (Leboeuf et al., 1982).

A presença dos alcaloides pirrolizidínicos nas plantas pode estar relacionada à defesa química (os pirrolizidínicos são altamente tóxicos com efeitos citotóxicos, mutagênicos e principalmente hepatotóxicos) e, desse modo, sujeitos a pressões seletivas. Como foram encontrados em grupos taxonômicos filogeneticamente distantes entre si e de Annonaceae (Magnoliales, magnoliideas), é possível que os alcaloides pirrolizidínicos tenham surgido independentemente em *Annona* e Bocageae e se perpetuado como uma estratégia adaptativa. No entanto, ainda não se pode descartar a

hipótese de que a ocorrência esparsa dos alcaloides pirrolizidínicos seja consequência do bloqueio da expressão gênica na maioria dos grupos de Angiospermas e desbloqueio em alguns outros grupos, conforme as necessidades ecológicas.

Em conjunto, os componentes isolados das ceras de *Annona* e *Bocageae* foram alcanos, álcoois primários, cetonas e ésteres (Tabela 2), considerados algumas das classes de substâncias alifáticas mais comuns encontradas nas ceras cuticulares das plantas (Juniper e Jeffree, 1983). A síntese dos principais componentes da cera (Fig. 2) ocorre a partir de ácidos graxos de cadeias longas (VLCFA), acima de 16 e 18 átomos de carbono. Os VLCFA são sintetizados pela atividade das enzimas do complexo ácido graxo sintase (FAS) e posteriormente as cadeias são estendidas para 30 ou mais átomos de carbono pela atividade de complexos multienzimáticos denominados ácido graxo elongases (FAE). Por fim, os produtos das elongases são modificados na via da redução acil, onde se transformam em álcoois primários e ésteres, ou seguem para a via da descarbonilação, onde se convertem em aldeídos, alcanos, álcoois secundários e cetonas (Kunst e Samuels, 2003).

Alcanos e álcoois primários foram detectados em todos os representantes de *Annona* e *Bocageae* analisados (Tabela 2). Ésteres e, principalmente, cetonas tiveram distribuição mais restrita; os ésteres foram isolados das espécies de *Hornschuchia*, *Cardiopetalum calophyllum*, *Cymbopetalum brasiliense* e *Porcelia macrocropa* e as cetonas foram detectadas em *Annona crassiflora*, *Hornschuchia myrtillus*, *Cymbopetalum brasiliense* e *Porcelia macrocropa* (Tabela 2). As presenças de alcanos e álcoois primários em todas as espécies sugerem que as vias da redução acil (produção de álcoois primários) e da descarbonilação (produção de alcanos) estão ativas (Fig. 2). Além disso, a presença de ésteres e/ou cetonas sugere que ambas as vias se expressaram de maneira diferenciada em várias espécies que seguiram passos adiante nas vias da

redução acil (até a produção de ésteres) e/ou da descarbonilação (até a produção de cetonas) [Fig. 2].

Embora numerosas formas de estresse (temperatura, luminosidade, estresse hídrico, salinidade, estresse mecânico e poluição) influenciem as ceras cuticulares, elas geralmente induzem alterações na quantidade e composição da cera, efeitos que estão relacionados com o controle da biossíntese. A distribuição das diferentes classes de componentes dentro das principais vias biossintéticas (extensão, redução acil e descarbonilação; Fig. 2) pode variar, isso sugere que passos individuais e transformações nas vias podem ser diferentemente sensíveis ao ambiente. No entanto, nem sempre isso acontece. A maioria dos estudos mostra que as quantidades dos componentes das ceras é que são alteradas, assim como o comprimento das cadeias carbônicas (tipo de homólogo) e sua quantidade [para revisão, ver Shepherd e Griffiths (2006)]. A distribuição das classes de componentes das ceras parece ser menos suscetível às variações ambientais que a distribuição dos homólogos dentro de cada classe.

A distribuição dos componentes das ceras foi comparada com a filogenia baseada em dados morfológicos (Johnson e Murray, 1995). Nessa filogenia, ((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)) é o clado irmão de (((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)) (*Froesiodendron*)).

No clado ((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)), *Bocagea* e *Trigynaea* apresentaram alcanos e álcoois primários nas ceras e as espécies de *Hornschuchia*, além de alcanos e álcoois primários, apresentaram ésteres. Dentre as três espécies de *Hornschuchia* analisadas, *H. myrtillus* se destacou pela presença de cetonas (Tabela 2).

Nesses gêneros, a distribuição dos componentes das ceras não foi congruente com a relação baseada nos dados morfológicos. Os dados químicos sugerem que as vias

da descarboxilação e da redução acil (Fig. 2) estão ativas nos três gêneros, produzindo alcanos e álcoois primários, respectivamente, e em *Hornschuchia*, essas vias apresentam atividade diferenciada, seguindo passos adiante e acumulando mais duas classes de componentes, cetonas (descarboxilação) e ésteres (redução acil) [Fig. 2]. Essa atividade diferenciada das vias nas espécies de *Hornschuchia* destaca esse gênero dos outros dois. Desse modo, os dados morfológicos sugerem que uma redução no número de estames em *Bocagea* e *Hornschuchia* separa esses gêneros de *Trigynaea* (Johnson e Murray, 1995) e os dados químicos sugerem que passos adicionais nas vias da redução acil e da descarboxilação em *Hornschuchia* diferenciam esse gênero de *Bocagea* e *Trigynaea*.

No clado (((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)) (*Froesiodendron*)), *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum* e *Porcelia* apresentaram alcanos, álcoois primários e ésteres (Tabela 2); além dessas classes, *Cymbopetalum* e *Porcelia* apresentaram cetonas (Tabela 2). As duas espécies de *Cymbopetalum* puderam ser diferenciadas pela ausência de cetonas e ésteres em *Cymbopetalum euneurum* (Tabela 2). Nenhum exemplar de *Froesiodendron* foi analisado.

Nesses gêneros, a distribuição dos componentes das ceras também não foi congruente com a relação baseada nos dados morfológicos. As duas vias estão presentes nos três gêneros. A via da redução acil se expressa da mesma forma em *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum* e *Porcelia*. No entanto, a maneira como a via da descarboxilação se expressa em *Cymbopetalum* e *Porcelia* é diferente da maneira como ela se expressa em *Cardiopetalum*.

Em *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum* e *Porcelia*, a via da redução acil (Fig. 2) apresenta todos os passos enzimáticos até a produção e acúmulo de ésteres, incluindo o acúmulo de álcoois primários (Tabela 2). Por outro lado, a via da descarboxilação (Fig. 2) segue os passos enzimáticos até a produção e acúmulo de alcanos em *Cardiopetalum*

(Tabela 2) e segue os passos adiante em *Cymbopetalum* e *Porcelia* até a síntese e acúmulo de cetonas, incluindo o acúmulo de alcanos (Tabela 2).

Desse modo, os dados morfológicos sugerem que a ocorrência de deiscência abaxial dos monocarpas e um tipo de arilo bilobado nas sementes unem *Cardiopetalum* e *Cymbopetalum*; *Porcelia* possui monocarpas indeiscentes e ausência de acessórios nas sementes (Johnson e Murray, 1995). Os dados químicos, por sua vez, sugerem que passos adicionais na via da descarboxilação em *Cymbopetalum* e *Porcelia* diferenciam esses gêneros de *Cardiopetalum*.

A distribuição dos componentes das ceras foi analisada no contexto da filogenia baseada nos dados morfológicos (Johnson e Murray, 1995).

A ocorrência esporádica das cetonas dentro de Bocageae, caracterizada pela presença da classe em *Hornschuchia*, *Cymbopetalum* e *Porcelia* (Tabela 2), pertencentes aos dois grandes clados ((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)) e (((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)) (*Froesiodendron*)) e a ausência da classe nos demais gêneros (Tabela 2), aparentemente é consequência da inibição de um ou mais genes das etapas posteriores à síntese de alcanos na via da descarboxilação (Fig. 2). A hipótese da origem independente das cetonas dentro de Bocageae parece menos provável, uma vez que a classe foi detectada em *Annona* (*A. crassiflora*, Tabela 2) e em outros gêneros de Annonaceae externos a Bocageae (Salatino e Salatino, 1983).

A presença dos ésteres em gêneros pertencentes aos dois grandes clados (*Hornschuchia* de um, e *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum* e *Porcelia* do outro, Tabela 2) parece consequência do desbloqueio do gene da etapa posterior à síntese dos álcoois primários na via de redução acil (Fig. 2). No caso dos ésteres, essa hipótese parece mais provável que a hipótese da origem independente do gene, uma vez que foram detectados em gêneros de Bocageae filogeneticamente próximos entre si.

A ocorrência de alcanos e álcoois primários em todos os representantes de Bocageae e *Annona* analisados (Tabela 2) e em outros gêneros de Annonaceae externos à Bocageae (Salatino e Salatino, 1983) sugere que as vias da descarboxilação e da redução acil (Fig. 2) já estavam ativas em Annonaceae antes do aparecimento de Bocageae.

A ocorrência esparsa de cetonas e ésteres parece uma consequência da inibição dos genes na maioria dos gêneros da tribo e expressão em alguns poucos. A falta de congruência entre as relações químicas e as relações postuladas com os dados morfológicos impede que cetonas e ésteres sejam usados como caracteres taxonômicos em Bocageae. A presença de alcanos e álcoois primários em todos os representantes dos gêneros analisados, isto é, internos e externos à tribo, não permitiu a distinção de grupos taxonômicos.

Flavonas e flavonóis (Fig. 3A) foram isolados de *Annona* e Bocageae. Entre as flavonas foram detectadas apigeninas C-glicosídeo, O-glicosídeo (posições 6 ou 7) e O-metilada (posição 6), além de um derivado de luteolina com uma hidroxila adicional na posição 6 (Tabela 2). Os flavonóis isolados foram derivados 3-O-glicosilados de quercetinas e campferóis, incluídas O-glicosilação ou O-metilação da posição 7, além de um derivado 3-O-glicosil 7-O-metil campferol com uma hidroxila adicional na posição 6 (Tabela 2).

A via biossintética das flavonas e dos flavonóis (Fig. 3B) é uma rede onde os flavonóis quercetina e miricetina são sintetizados por três rotas distintas, duas delas comuns à síntese das flavonas luteolina e tricetina (Stafford, 1990). Desse modo, quercetina e miricetina podem ser sintetizadas via di-hidrocampferol (Fig. 3B), além disso, quercetina pode ser produzida via eriodictiol, usada para a síntese de luteolina (Fig. 3B), e miricetina pode ser produzida via 5'-hidroxieriodictiol, usada para a síntese

de tricetina (Fig. 3B). No final da biossíntese, flavonas e flavonóis são modificados por enzimas como aciltransferases, glicosiltransferases, hidroxilases, metiltransferases e preniltransferases (Heller e Forkmann, 1988).

Flavonas foram encontradas em quatro espécies de Bocageae. Apigenina foi detectada em *Hornschuchia bryothrophe*, *Hornschuchia citriodora* e *Trigynaea oblongifolia* e luteolina foi isolada de *Cymbopetalum brasiliense* (Tabela 2). Nessas espécies, também foram encontrados flavonóis, exceto em *Hornschuchia bryothrophe* (Tabela 2).

Flavonóis foram detectados na maioria das espécies estudadas. Nelas, as presenças de campferol e quercetina estiveram associadas, exceto em *Cymbopetalum brasiliense*, *Cymbopetalum euneurum*, *Hornschuchia citriodora* e *Hornschuchia myrtillus* (Tabela 2). Nas espécies em que houve ocorrência conjunta de campferol e quercetina, a presença de campferol sugere que a produção de quercetina pode ter recebido contribuição da via di-hidrocampferol, que é a responsável pela síntese de campferol (Fig. 3B).

Ao comparar a distribuição dos flavonoides com a filogenia baseada em dados morfológicos (Johnson e Murray, 1995), observa-se que no clado ((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)), *Bocagea* e *Trigynaea* apresentaram ocorrência conjunta de campferol e quercetina (Tabela 2); além de quercetina, *Trigynaea* produziu apigenina (Tabela 2). *Hornschuchia* apresentou campferol, quercetina e apigenina, porém campferol e quercetina não ocorreram juntos em nenhuma das três espécies (Tabela 3). Dentre as espécies de *Hornschuchia*, *H. myrtillus* apresentou campferol e se destacou de *H. bryothrophe* e *H. citriodora* pela ausência de apigenina (Tabela 2). Além de apigenina, *H. citriodora* apresentou quercetina (Tabela 2). Nesses gêneros, a

distribuição dos flavonoides não concordou com a relação estabelecida pelos dados morfológicos (Johnson e Murray, 1995).

A presença de campferol associada à presença de quercetina em *Bocagea* e *Trigynaea* (Tabela 2) sugere que a quercetina pode ter sido produzida na via responsável pela síntese de campferol, a via di-hidrocampferol (Fig. 3B). Por sua vez, a presença de quercetina e ausência de campferol em *H. citriodora* (Tabela 2) sugerem o bloqueio da enzima FLS no nível do di-hidrocampferol e a síntese de quercetina pela atividade da F3'H no nível do di-hidrocampferol (Fig. 3B). A presença da via di-hidrocampferol em *Hornschuchia* é apoiada pela presença de campferol em *H. myrtillus* (Tabela 2, Fig. 3B).

Embora a distribuição dos flavonoides não tenha concordado com as relações morfológicas entre os gêneros, ela sugeriu duas características químicas para (*Bocagea*, *Hornschuchia*, *Trigynaea*): a presença de apigenina (exceto em *Bocagea*; Tabela 2) e a síntese de quercetina via di-hidrocampferol (Fig. 3B). Essas características químicas reforçam o apoio oferecido pelo conjunto de características florais e dos frutos ao clado (*Bocagea*, *Hornschuchia*, *Trigynaea*): sépalas persistentes nos frutos, ápice interno da sépala trigonoso, pequeno diâmetro do tórus, número de estames reduzido (exceto em *Trigynaea*), conectivos da antera alongados, ápice do conectivo da antera não se estende sobre os lóculos, exina do pólen tectado variável e estigmas não articulados (Johnson e Murray, 1995).

No clado (((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)) (*Froesiodendron*)), *Cardiopetalum* e *Porcelia* apresentaram ocorrência de campferol associada à quercetina (Tabela 2). As duas espécies de *Cymbopetalum* produziram campferol e puderam ser diferenciadas entre si pela presença de luteolina em *Cymbopetalum brasiliense* (Tabela 2). Nesses gêneros, a distribuição dos flavonoides também não concordou com as

relações baseadas nos dados morfológicos (Johnson e Murray, 1995). Nenhum exemplar de *Froesiodendron* foi analisado.

Os dados químicos sugerem que a quercetina presente em *Cardiopetalum* e *Porcelia* (Tabela 2) parece ter origem biossintética na via di-hidrocampferol (Fig. 3B), como sugere a ocorrência conjunta de campferol e quercetina (Tabela 2). No caso de (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) não é possível descartar a hipótese de que a quercetina tenha sido produzida também via eriodictiol (Fig. 3B), porque a atividade dessa via foi detectada no clado pela presença de luteolina em *Cymbopetalum brasiliense* (Tabela 2).

A distribuição dos flavonoides não foi congruente com as relações morfológicas entre os gêneros (Johnson e Murray, 1995), mas sugeriu duas características químicas para (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*): presença de luteolina (exceto em *Cardiopetalum* e *Porcelia*; Tabela 2) e síntese de quercetina pelas vias di-hidrocampferol e eriodictiol (Fig. 3B) (exceto em *Cymbopetalum* que produziu luteolina; Tabela 2). Essas características químicas reforçam o apoio oferecido pela perda da carúncula da semente (Johnson e Murray, 1995).

A distribuição dos flavonoides foi analisada no contexto da filogenia baseada em dados morfológicos (Johnson e Murray, 1995).

A ocorrência de campferol em todos os gêneros de Bocageae e *Annona* analisados (Tabela 2) e em outros gêneros de Annonaceae externos a Bocageae (Santos e Salatino, 2000) sugere que a via di-hidrocampferol (Fig. 3B) já estava ativa em Annonaceae antes do aparecimento de Bocageae.

Quercetina foi detectada nos dois grandes clados que dividem Bocageae. No entanto, a origem biossintética da quercetina em cada um deles é aparentemente distinta.

No caso de ((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)) a ocorrência associada com

campferol em *Bocagea* e *Trigynaea* (Tabela 2) sugere que a origem biossintética da quercetina é via di-hidrocampferol (Fig. 3B). Em *Hornschuchia*, a presença de campferol em *H. myrtillus* (Tabela 2) sugere que a via di-hidrocampferol (Fig. 3B) está ativa no gênero e acena a possibilidade da quercetina em *H. citriodora* (Tabela 2) ser produzida via di-hidrocampferol. Não há evidências de atividade da via eriodictiol nesse clado.

Quanto a ((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)) a ocorrência conjunta com campferol em *Cardiopetalum* e *Porcelia* (Tabela 2) sugere que a origem biossintética da quercetina é via di-hidrocampferol (Fig. 3B). No entanto, a presença de luteolina em *Cymbopetalum* (Tabela 2) sugere que a via eriodictiol está ativa e traz a possibilidade da quercetina ter origem nessa via também (Fig. 3B). A ausência de quercetina em *Cymbopetalum* (Tabela 2) pode ser explicada pelo bloqueio em até três níveis enzimáticos (FHT em eriodictiol, F3'H em di-hidrocampferol, FLS em di-hidroquercetina; Fig. 3B) ou pela perda dos respectivos genes.

A presença de luteolina em *Cymbopetalum* (Tabela 2) e na espécie externa à Bocageae, *Annona tomentosa* (Santos e Salatino, 2000) sugere que a via eriodictiol (Fig. 3B) já estava ativa em Annonaceae antes do aparecimento de Bocageae. A ausência de luteolina em outros membros de Bocageae sugere bloqueio da via (F3'H no nível da naringenina; Fig. 3B), ou parte da via (FNS em eriodictiol; Fig. 3B), ou perda dos respectivos genes.

A ocorrência de apigenina restrita a *Hornschuchia* e *Trigynaea* (Tabela 2) sugere que a FSN no nível da naringenina (Fig. 3B) pode estar bloqueada em *Annona* e nos demais gêneros de Bocageae. A hipótese de ganhos independentes do gene por *Hornschuchia* e *Trigynaea* é menos provável porque apigenina foi detectada em outros membros de Annonaceae externos a Bocageae e *Annona* (Santos e Salatino, 2000).

Tendo em vista a distribuição de campferol, quercetina e luteolina em *Bocagea* e em vários membros de *Annonaceae* (Santos e Salatino, 2000) é possível sugerir que no clado ((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)) a via eriodictiol foi bloqueada em F3'H no nível da naringenina (Fig. 3B) ou o respectivo gene foi perdido, e continuou ativa no clado ((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)), produzindo luteolina (Fig. 3B) em *Cymbopetalum* (Tabela 2) e possivelmente contribuindo para a produção de quercetina (Fig. 3B) em *Cardiopetalum* e *Porcelia* (Tabela 2). A ausência de luteolina em *Cardiopetalum* e *Porcelia* (Tabela 2) sugere que parte da via (FNS em eriodictiol; Fig. 3B) foi bloqueada ou o respectivo gene foi perdido. A via di-hidrocampferol (Fig. 3B) está ativa em ((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)) e em ((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)) produzindo campferol e quercetina (Tabela 2).

A distribuição dos flavonoides em *Bocageae* diferenciou dois clados postulados na filogenia com dados morfológicos (Johnson e Murray, 1995). A presença de apigenia e síntese de quercetina via di-hidrocampferol em (*Bocagea*, *Hornschuchia*, *Trigynaea*) diferencia esse grupo de (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) que apresenta luteolina e síntese de quercetina pela via di-hidrocampferol e via eriodictiol. Com relação à distribuição dos alcaloides, a presença peculiar de alcaloides pirrolizidínicos em *Bocageae* e *Annona* destacou esses grupos dentro de *Annonaceae*, que até agora não possuía relatos da ocorrência desse tipo de alcaloide entre seus membros. Por sua vez, a distribuição dos componentes das ceras sugeriu que a atividade das vias da descarboxilação e da redução acil foi igual ao produzir os mesmos componentes nos dois clados de *Bocageae*, mas, dentro de cada clado, a expressão das vias variou entre os gêneros e delimitou grupos químicos que não foram congruentes com as relações estabelecidas pelos dados morfológicos.

Tabela 1

Espécies estudadas, locais de coleta e voucher.

Espécie	Local de coleta	Voucher
Grupo externo		
<i>Annona coriacea</i> Mart.	Reserva Biológica Experimental de Mogi-Guaçu, Mogi-Guaçu (SP)	sem voucher
<i>Annona crassiflora</i> Mart.	Reserva Biológica Experimental de Mogi-Guaçu, Mogi-Guaçu (SP)	SPF 179.338 (SPF)
Tribo Bocageae Endlicher		
<i>Bocagea</i> sp. nov. Morawetz	Cubatão (SP)	Benko-Iseppon 1 (SPF)
<i>Cardiopetalum calophyllum</i> Schlechtendal	Parque do Sabiá, Uberlândia (MG)	R. Romero <i>et al.</i> 7721 (HUFU)
<i>Cymbopetalum brasiliense</i> (Vellozo) Benth. ex Baillon	Reserva Natural CVRD, Linhares (ES)	C. Rocini 19 (SPF, CVRD)
<i>Cymbopetalum euneurum</i> N. A. Murray, sp. nov.	Reserva Florestal Ducke, Manaus (AM)	C. Rocini s.n. (SPF, INPA)
<i>Hornschuchia bryothrophe</i> Nees	Reserva Natural CVRD, Linhares (ES)	C. Rocini 7 (SPF, CVRD)
<i>Hornschuchia citriodora</i> D. M. Johnson	Reserva Natural CVRD, Linhares (ES)	C. Rocini 5 (CVRD)
<i>Hornschuchia myrtillus</i> Nees	Reserva Natural CVRD, Linhares (ES)	P. Fiaschi 2743 (SPF)
<i>Porcelia macrocarpa</i> (Warming) R. E. Fries	Parque Estadual as Fontes do Ipiranga, São Paulo (SP)	W. Hoehne s.n. SPF 123558 (SPF)
<i>Trigynaea oblongifolia</i> Sechlehtendal	Ilha da Cotia, Parati (RJ)	Mello-Silva 2876 (SPF)

SPF, Herbário da Universidade de São Paulo.

HUFU, Herbário da Universidade Federal de Uberlândia.

CVRD, Herbário da Companhia Vale do Rio Doce.

INPA, Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Tabela 2

Dados fitoquímicos de espécies de *Annona* e da tribo Bocageae Endlicher.

G = glicosilação; M = metilação; OH = função hidroxila.

Espécies	Classe de substâncias		
	Alcaloides	Componentes das ceras	Flavonoides
<i>Annona coriacea</i>	pirrolizidínico	alcano álcool primário	campferol-3- <i>O</i> -G quercetina-3- <i>O</i> -G
<i>Annona crassiflora</i>	isoquinolínico ^a pirrolizidínico	alcano cetona álcool primário	campferol-3- <i>O</i> -G ^b quercetina-3- <i>O</i> -G ^b
Tribo Bocageae			
<i>Bocagea</i> sp. nov.	pirrolizidínico	alcano álcool primário	campferol-3- <i>O</i> -G ^b quercetina-3- <i>O</i> -G ^b
<i>Hornschuchia bryothrophe</i>	pirrolizidínico	alcano éster álcool primário	apigenina-6- <i>O</i> -G ^b
<i>Hornschuchia citriodora</i>	pirrolizidínico	Alcano éster álcool primário	apigenina-7- <i>O</i> -G ^b apigenina- <i>C</i> -G ^b quercetina-3- <i>O</i> -G ^b
<i>Hornschuchia myrtillus</i>	pirrolizidínico	alcano éster cetona álcool primário	campferol-3- <i>O</i> -G ^b
<i>Trigynaea oblongifolia</i>	pirrolizidínico	alcano álcool primário	apigenina-6- <i>O</i> -M ^b campferol-3- <i>O</i> -G ^b quercetina-3- <i>O</i> -G
<i>Cardiopetalum calophyllum</i>	pirrolizidínico	alcano éster álcool primário	campferol-3- <i>O</i> -G ^b campferol-3- <i>O</i> -G, 7- <i>O</i> -M ^b quercetina-3- <i>O</i> -G ^b quercetina-3- <i>O</i> -G, 7- <i>O</i> -M ^b
<i>Cymbopetalum brasiliense</i>	pirrolizidínico	alcano éster cetona álcool primário	luteolina-6-OH ^b campferol-3- <i>O</i> -G ^b campferol-3- <i>O</i> -G, 7- <i>O</i> -G ^b campferol-3- <i>O</i> -G, 7- <i>O</i> -M ^b campferol-3- <i>O</i> -G, 7- <i>O</i> -M, 6-OH ^b

Continua na próxima página

Tabela 2

Continuação.

Espécies	Classe de substâncias		
	Alcaloides	Componentes das ceras	Flavonoides
Tribo Bocageae			
<i>Cymbopetalum euneurum</i>	pirrolizidínico	alcano álcool primário	campferol-3- <i>O</i> -G ^b campferol-3- <i>O</i> -G, 7- <i>O</i> -G ^b campferol-3- <i>O</i> -G, 7- <i>O</i> -M ^b campferol-3- <i>O</i> -G, 7- <i>O</i> -M, 6-OH ^b
<i>Porcelia macrocarpa</i>	pirrolizidínico	alcano éster cetona álcool primário	campferol-3- <i>O</i> -G ^b quercetina-3- <i>O</i> -G, 7- <i>O</i> -G ^b quercetina-3- <i>O</i> -G, 7- <i>O</i> -M ^b

^a Egydio (comunicação pessoal)^b Santos e Salatino (2000)

Fig. 1. Estrutura geral dos alcaloides pirrolizidínicos e isoquinolínicos. (A) necina, o núcleo básico dos alcaloides pirrolizidínicos. (B) otonecina, um tipo de alcaloide pirrolizidínico. (C) tetra-hidroisoquinolina, um exemplo de estrutura geral dos alcaloides isoquinolínicos.

Fig. 2. Principais vias biossintéticas dos componentes alifáticos das ceras vegetais (FAE, complexo ácido graxo elongase; FAR, acil-CoA graxo redutase; FAS, complexo ácido graxo sintase; VLCFA, ácido graxo de cadeia longa; WS, cera sintase; [?], enzimas não caracterizadas).

Fig. 3. Flavonas e flavonóis. (A) Estruturas. (B) Via biossintética. (--->) Síntese de quercetina e miricetina por di-hidrocampferol; (.....>) Síntese de quercetina e luteolina por eriodictiol; (—>); Síntese de miricetina e tricetina por 5'-hidroxieriodictiol. Enzimas: FNS = flavona sintase; FHT = flavanona-3-hidroxilase; F3'H = flavanona-3'-hidroxilase; F3', 5'H = flavanona-3', 5'-hidroxilase.

Referências Bibliográficas

- Bah, M., Pereda-Miranda, R., 1999. Alcaloides pirrolizidínicos, in: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Eds.), Farmacognosia, da planta ao medicamento. Editora da UFSC, Florianópolis, Editora da UFRGS, Porto Alegre, pp. 847 - 868.
- Chaves, M.H., Santos, L.A., Lago, J.H.G., Roque, N.F., 2001. Alkaloids from *Porcelia macrocarpa*. J. Nat. Prod. 64, 240 - 242.
- Fechine, I.M., Tavares, J.F., Silva, M.S., Barbosa-Filho, J.M., Agra, M.F., Cunha, E.V. L., 2003. Two new alkaloids of *Hornschuchia obliqua*. Fitoterapia 74, 29 - 33.
- Goodwin, T.W., Mercer, E.I., 1983. The alkaloids, in: Goodwin, T.W., Mercer, E.I. (Eds.), Introduction to plant biochemistry, second ed. Pergamon Press, Oxford, New York, pp. 480 - 527.
- Harborne, J.B., 1998. Phytochemical methods – a guide to modern techniques of plant analysis, third ed. Chapman and Hall, London.
- Heller, W., Forkmann, G., 1988. Biosynthesis, in: Harborne, J.B. (Ed.), The flavonoids. Advances in research since 1980. Chapman and Hall, London, pp. 399 - 449.
- Herbert, R.B., 1985. The biosynthesis of isoquinoline alkaloids, in: Phillipson, J.D., Roberts, M.F., Zenk, M.H. (Eds.), The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 213 - 228.
- Johnson, D.M., Murray, N.A., 1995. Synopsis of the tribe Bocageae (Annonaceae), with revisions of *Cardiopetalum*, *Froesiodendron*, *Trigynaea*, *Bocagea* and *Hornschuchia*. Brittonia 47, 248 - 319.
- Juniper, B.E., Jeffree, C.E., 1983. Plant surfaces. Edward Arnold, London.
- Kunst, L., Samuels, A.L., 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. Prog. Lipid Res. 42, 51 - 80.

- Leboeuf, M., Cavé, A., Bhaumik, P.K., Mukherjee, B., Mukherjee, R., 1982. The Phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* 21 (12), 2783 - 2813.
- Mabry, T.J., Markham, K.P., Thomas, M.B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin.
- Markham, K.P., 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London.
- Salatino, M.L.F., Salatino, A., 1983. Constituents of the unsaponifiable fraction of the foliar epicuticular wax and the systematics of the Annonaceae. *Revta. Brasil. Bot.* 6, 23 - 28.
- Santos, D.Y.A.C., Salatino, M.L.F., 2000. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry* 55, 567 - 573.
- Shepherd, T., Griffiths, D.W., 2006. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist* 171, 469 - 499.
- Stafford, H.A., 1990. Flavone and flavonol pathways, in: Stafford, H.A. (Ed.), *Flavonoid Metabolism*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 47 - 62.
- Stevens, P.F., 2008. Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June, <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Suau, R., Cabezudo, B., Rico, R., Nájera, F., López-Romero, J.M., 2002. Direct determination of alkaloid contents in *Fumaria* species by GC-MS. *Phyto. Anal.* 13, 363 - 367.
- Trigo, J.R., Leal, I.R., Matzenbacher, N.I., Lewinsohn T.M., 2003. Chemotaxonomic value of pyrrolizidine alkaloids in southern Brazil *Senecio* (Senecioneae: Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 1011 - 1022.

Capítulo 4

Discussão geral e conclusões

Há vários sistemas de classificação para Annonaceae; neles, os gêneros estão organizados em pequenos agrupamentos (tribos e grupos), de acordo com os atributos morfológicos. No entanto, esse grande número de classificações pode ser reduzido a um, como tem sugerido os estudos recentes. O sistema elaborado por Fries (1959), por exemplo, apresenta vários grupos apoiados por revisões modernas. Um deles é o “Grupo Trigynaea”, sinonimizado como tribo Bocageae Endlicher (Johnson e Murray, 1995).

Johnson e Murray (1995) fizeram uma análise cladística com caracteres vegetativos, florais, dos frutos e das sementes e sugeriram uma hipótese sobre as relações intergenéricas na tribo: (((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)) (((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)) (*Froesiodendron*))) [Fig. 1, página 85]. A confiabilidade dessas relações foi verificada com o uso de dados fitoquímicos e de sequências de DNA.

Nos últimos anos, as sequências de DNA forneceram informações apoiadas por vários dados, inclusive os fitoquímicos. Quanto aos dados fitoquímicos, o uso da via biossintética tem se mostrado indispensável para interpretar a distribuição dos metabólitos, principalmente quando as substâncias possuem mais de uma origem biossintética, como é o caso dos flavonóis quercetina e miricetina (Fig. 3B, página 73).

Não há trabalhos de sequenciamento na tribo Bocageae. Os estudos publicados para outros grupos de Annonaceae concentraram-se em regiões do cloroplasto e ofereceram pouca resolução para as relações (van Zuijlen *et al.*, 1996; Doyle *et al.*, 2000; Sauquet *et al.*, 2003; Mols *et al.*, 2004; Scharaschkin e Doyle, 2005; Pirie *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2008).

Para avaliar as relações em Bocageae com base em sequências de DNA, foram selecionados marcadores pertencentes aos três genomas da célula vegetal: cloroplasto - intron *trnK* que inclui o gene *matK*, intron *trnL* e espaçador intergênico *trnL-trnF*; mitocôndria - gene *coxI*; núcleo - gene *RPB2*.

Os critérios de seleção dos marcadores foram: existência de trabalhos prévios em Annonaceae, no caso das regiões do cloroplasto (van Zuijlen *et al.*, 1996; Sauquet *et al.*, 2003; Mols *et al.*, 2004); facilidade para amplificar e alinhar as sequências; o fato de possuírem uma única cópia na maioria das plantas já investigadas.

As análises filogenéticas foram realizadas com os métodos de parcimônia (Máxima Parcimônia) e de probabilidades (Análise Bayesiana). Variações na topologia entre os dois métodos ocorreram em *coxI* (Figs 1A e 2A, páginas 46 e 47), *trnL-trnL-F* (Figs 1C e 2C, páginas 46 e 47) e, de maneira mais acentuada, em *RPB2* (Figs 1B e 2B, páginas 46 e 47).

As sequências de cada marcador foram analisadas de maneira independente e forneceram hipóteses parcialmente congruentes entre si. Desse modo, nas análises de parcimônia, o clado (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) foi detectado em *coxI*, *RPB2* e *trnK-matK* (Fig. 1A, B, D, página 46) mas não em *trnL-trnL-F* (Fig. 1C, página 46). Já nas análises de probabilidades, o clado (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) foi encontrado em *coxI*, *trnL-trnL-F* e *trnK-matK* (Fig. 2A, C, D, página 47) mas não em *RPB2* (Fig. 2B, página 47). Ainda nas análises de probabilidades, o clado (*Bocagea*, *Hornschuchia*, *Trigynaea*) foi detectado apenas em *RPB2* (Fig. 2B, página 47).

É comum realizar uma análise combinada dos dados. Nesse trabalho, optou-se por não fazê-lo, pois a análise combinada de hipóteses parcialmente congruentes entre si poderia esconder as relações estabelecidas nas análises independentes. Por sua vez, as

análises independentes, com suas distintas contribuições, forneceram evidências para apoiar dois clados inferidos na análise dos dados morfológicos de Bocageae (Johnson e Murray, 1995): o clado (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) e o clado (*Bocagea*, *Hornschuchia*, *Trigynaea*) [Fig. 1, página 85].

Trabalhos de quimiotaxonomia com espécies da tribo Bocageae são escassos (Salatino e Salatino, 1983; Santos e Salatino, 2000). Neles, os integrantes da tribo apresentaram características químicas peculiares que os diferenciaram dos demais membros de Annonaceae. Esses trabalhos sugerem uma evolução bioquímica em Bocageae e, por isso, os dados fitoquímicos seriam potencialmente úteis para investigar as relações dentro da tribo.

As relações químicas em Bocageae foram estudadas com base nas distribuições dos alcaloides, componentes das ceras cuticulares e flavonoides.

Grande parte dos alcaloides encontrada em Annonaceae pertence ao grupo dos isoquinolínicos (Cavé, 1985). Nesse trabalho, todas as espécies analisadas apresentaram alcaloides pirrolizidínicos (Tabela 2, página 70); a presença dos isoquinolínicos foi relatada apenas em *Annona crassiflora* (Egydio, comunicação pessoal). As análises GC-EIMS forneceram espectros com fragmentos de massas 168, 151, 110, 96 e 43 (íon base), que são característicos de alcaloides pirrolizidínicos do tipo otonecina (Trigo *et al.*, 2003) [Fig. 1B, página 71].

Os registros de alcaloides pirrolizidínicos referem-se a grupos taxonômicos filogeneticamente distantes de Annonaceae (Bah e Pereda-Miranda, 1999; Stevens, 2008). Até o momento, não havia relatos da ocorrência de alcaloides pirrolizidínicos na família. A presença peculiar desse tipo de alcaloide em Bocageae e *Annona* destacou esses grupos dentro de Annonaceae.

No geral, os componentes isolados das ceras de *Annona* e *Bocageae* foram alcanos, álcoois primários, cetonas e ésteres (Tabela 2, página 70). As presenças de alcanos e álcoois primários em todas as espécies (Tabela 2, página 70) sugerem que as vias da redução acil (produção de álcoois primários) e da descarbonilação (produção de alcanos) estão ativas (Fig. 2, página 72). Além disso, a presença esparsa de ésteres e/ou cetonas (Tabela 2, página 70) sugere que ambas as vias se expressaram de maneira diferenciada em várias espécies que seguiram passos adiante nas vias da redução acil (até a produção de ésteres) e/ou da descarbonilação (até a produção de cetonas) [Fig. 2, página 72].

Em ((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)) as vias da descarbonilação e da redução acil (Fig. 2, página 72) estão ativas nos três gêneros, produzindo alcanos e álcoois primários, respectivamente (Fig. 1, página 85), e em *Hornschuchia*, essas vias apresentam atividade diferenciada, seguindo passos adiante e acumulando mais duas classes de componentes, cetonas (descarbonilação) e ésteres (redução acil) [Fig. 1, página 85]. No contexto químico, essa atividade diferenciada das vias nas espécies de *Hornschuchia* destacou esse gênero dos outros dois.

No clado ((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)) as duas vias estão presentes nos três gêneros. A via da redução acil (Fig. 2, página 72) se expressa da mesma forma em *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum* e *Porcelia*, produzindo ésteres e álcoois primários (Fig. 1, página 85). Por sua vez, a via da descarbonilação (Fig. 2, página 72) se expressa em *Cymbopetalum* e *Porcelia*, produzindo alcanos e cetonas (Fig. 1, página 85) e, em *Cardiopetalum*, produzindo apenas alcanos (Fig. 1, página 85). Sob o ponto de vista químico, a atividade diferenciada da via da descarbonilação destacou *Cardiopetalum* de *Cymbopetalum* e *Porcelia*.

A distribuição dos componentes das ceras sugeriu que a atividade das vias da descarbonilação (alcanos e cetonas) e da redução acil (álcoois primários e ésteres) [Fig. 2, página 72] foi igual ao produzir os mesmos componentes nos dois clados de Bocageae, mas, dentro de cada clado, a expressão das vias variou entre os gêneros e delimitou grupos químicos que não foram congruentes com as relações estabelecidas pelos dados morfológicos (Fig. 1, página 85).

Em conjunto, flavonas (derivados de apigenina e luteolina) e flavonóis (derivados de campferol e quercetina) foram isolados de *Annona* e Bocageae (Tabela 2, página 70).

No clado ((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)), os três gêneros apresentaram campferol e quercetina. Além dos flavonóis, *Hornschuchia* e *Trigynaea* apresentaram apigenina (Fig. 1, página 85).

Quando essa distribuição é interpretada no contexto da via biossintética, verifica-se que a presença de campferol associada à presença de quercetina em *Bocagea* e *Trigynaea* (Tabela 2, página 70) sugere que nesses gêneros a quercetina pode ter sido produzida na via responsável pela síntese de campferol, a via di-hidrocampferol (Fig. 3B, página 73). A presença da via di-hidrocampferol em *Hornschuchia* é apoiada pela presença de campferol em *H. myrtillus* (Tabela 2, página 70; Fig. 3B, página 73). Desse modo, a presença de quercetina e ausência de campferol em *H. citriodora* (Tabela 2, página 70) sugerem o bloqueio da enzima FLS no nível do di-hidrocampferol e a síntese de quercetina pela atividade da F3'H no nível do di-hidrocampferol (Fig. 3B, página 73). A distribuição dos flavonoides não concordou com as relações morfológicas entre os gêneros mas sugeriu duas características químicas para (*Bocagea*, *Hornschuchia*, *Trigynaea*) [Fig. 1, página 85]: presença de apigenina (exceto em *Bocagea*) e síntese de quercetina via di-hidrocampferol (Fig. 3B, página 73).

Em (((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)) (*Froesiodendron*)), *Cardiopetalum*, *Cymbopetalum* e *Porcelia* apresentaram campferol e quercetina (Fig. 1, página 85). Além dos flavonóis, *Cymbopetalum* apresentou luteolina (Fig. 1, página 85). Nenhum exemplar de *Froesiodendron* foi analisado.

Do ponto de vista da biossíntese a distribuição dos flavonoides nesse clado sugere que a presença de quercetina em *Cardiopetalum* e *Porcelia* (Fig. 1, página 85) parece ter origem biossintética na via di-hidrocampferol (Fig. 3B, página 73), como sugere a ocorrência associada de campferol e quercetina (Tabela 2, página 70). No caso de (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) não é possível descartar a hipótese de que a quercetina tenha sido produzida também via eriodictiol (Fig. 3B, página 73), porque a atividade dessa via foi detectada no clado pela presença de luteolina em *Cymbopetalum brasiliense* (Tabela 2, página 70).

Mais uma vez a distribuição dos flavonoides não concordou com as relações morfológicas entre os gêneros, porém, sugeriu duas características químicas para (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) [Fig. 1, página 85]: presença de luteolina (exceto em *Cardiopetalum* e *Porcelia*) e síntese de quercetina pelas vias di-hidrocampferol e eriodictiol [Fig. 3B, página 73] (exceto em *Cymbopetalum* que produziu luteolina).

As análises das sequências de DNA e as distribuições dos flavonoides, alcaloides e componentes das ceras foram comparadas com a filogenia baseada em dados morfológicos (Fig. 1, página 85) para verificar a confiabilidade das relações.

Em ((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)) o clado (*Bocagea*, *Hornschuchia*, *Trigynaea*) foi encontrado na análise Bayesiana do *RPB2* (Fig. 2B, página 47) e apoiado pela presença de apigenina (exceto em *Bocagea*) e síntese de quercetina via di-hidrocampferol (Fig. 1, página 85). A relação entre esses gêneros foi previamente

diagnosticada por um conjunto de atributos florais e dos frutos: sépalas persistentes nos frutos, ápice interno da sépala trigonoso, pequeno diâmetro do tórus, número de estames reduzido (exceto em *Trigynaea*), conectivos da antera alongados, ápice do conectivo da antera não se estende sobre os lóculos, exina do pólen tectado variável e estigmas não articulados (Johnson e Murray, 1995).

No clado (((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)) (*Froesiodendron*)) a relação (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) foi encontrada nas análises de Máxima Parcimônia das regiões *coxI*, *RPB2* e *trnK-matK* (Fig. 1A, B, D, página 46) e nas análises Bayesianas das regiões *coxI*, *trnL-trnL-F* e *trnK-matK* (Fig. 2A, C, D, página 47). Esse clado foi apoiado pela presença de luteolina (exceto em *Cardiopetalum* e *Porcelia*) e síntese de quercetina pelas vias di-hidrocampferol e eriodictiol (exceto em *Cymbopetalum* que produziu luteolina) [Fig. 1, página 85]. Na abordagem morfológica, (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) é apoiado pela perda da carúncula da semente (Johnson e Murray, 1995).

No caso dos flavonoides, é interessante registrar que, antes da abordagem das vias biossintéticas, as substituições das moléculas foram úteis para caracterizar grupos em Bocageae. Em seu trabalho de doutorado, Santos (1998) caracterizou o clado (*Bocagea*, *Hornschuchia*, *Trigynaea*) pela tendência a presença de flavonas e derivados 6-substituídos (Tabela 2, página 70) e o clado (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) pela tendência a metilações (Tabela 2, página 70).

A distribuição dos componentes das ceras delimitou grupos químicos em Bocageae, mas eles não foram congruentes com os dados morfológicos (Fig. 1, página 85).

Segundo Johnson e Murray (1995) os estudos de palinologia e morfologia desenvolvidos ao longo de 30 anos ofereceram evidências sobre a estreita relação de

Annona com *Bocageae*. A distribuição dos alcaloides pirrolizidínicos foi congruente com os dados sobre essa relação. As análises GC-EIMS sugeriram a presença de alcaloides pirrolizidínicos nos dois grupos. A vasta literatura fitoquímica de *Annonaceae* (Leboeuf *et al.*, 1982; Cavé, 1985; e como exemplo mais recente, Moreira *et al.*, 2005) não relata a ocorrência desse tipo de alcaloide em outros membros da família.

Os dados fitoquímicos e, no geral, as análises de sequências de DNA não concordaram com as relações dentro de cada clado estabelecidas pela análise morfológica. Apenas a análise Bayesiana do *RPB2* sugeriu que *Bocagea* e *Hornschuchia* estão mais próximos entre si do que de *Trigynaea* (Fig. 2B, página 47). Essa proximidade foi previamente sugerida pelo estudo morfológico (Fig. 1, página 85) em que a redução no número de estames no clado (*Bocagea*, *Hornschuchia*) apoiou sua separação de *Trigynaea* (Johnson e Murray, 1995).

Existem duas teorias que explicam a distribuição esparsa de certos metabólitos nas plantas. Uma delas explica que a presença dos metabólitos em grupos taxonômicos filogeneticamente distantes entre si é consequência dos processos de evolução paralela e convergente (Waterman, 1999).

A outra argumenta que a ampla distribuição dos metabólitos nos grupos basais acompanhada de alguns casos de distribuição esporádica nos grupos mais distantes é consequência da evolução monofilética da via biossintética, porém, com expressão gênica diferenciada, o que ocasiona o bloqueio da via biossintética. Nesse caso, a evolução do aparato genético para a biossíntese do metabólito é monofilética, mas mutações nos genes reguladores ou nos genes que codificam para proteínas transportadoras causam o bloqueio da via em alguns grupos (Wink, 2003). Além disso,

pressões seletivas ambientais podem contribuir para a manutenção ou reativação da via em certos grupos taxonômicos (Wink e Mohamed, 2003; Liscombe *et al.*, 2005).

Em Bocageae, a distribuição dos alcaloides, componentes das ceras e flavonoides pode ser explicada pela ocorrência de bloqueios e desbloqueios das vias biossintéticas, ou parte delas. A hipótese de origem independente dos genes é menos provável, principalmente nos casos dos componentes das ceras e dos flavonoides, uma vez que essas substâncias foram encontradas em gêneros filogeneticamente próximos entre si e de Bocageae, no caso *Annona* e outros representantes de Annonaceae; portanto, devido a essa proximidade, é mais provável que os genes tenham aparecido uma única vez.

Fig. 1. Relações intergenéricas na tribo Bocageae Endlicher baseadas em caracteres morfológicos de acordo com o método de Máxima Parcimônia [1 árvore; 43 passos; I.C. = 0,79; I.R. = 0,78] (Jonhson e Murray, 1995) e distribuições dos flavonoides e componentes das ceras. Flavonoides: Ap = apigenina, L = luteolina, ET = eriodictiol, K = campferol, Q = quercetina, DK = di-hidrocampferol.

Componentes das cera: H = alcanos, A = álcoois primários, C = cetonas, E = ésteres.

Referências bibliográficas

- Cavé, A., 1985. Annonaceae alkaloids, in: Phillipson, J.D., Roberts, M.F., Zenk, M.H. (Eds.), The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 79 - 101.
- Bah, M., Pereda-Miranda, R., 1999. Alcaloides pirrolizidínicos, in: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Eds.), Farmacognosia, da planta ao medicamento. Editora da UFSC, Florianópolis, Editora da UFRGS, Porto Alegre, pp. 847 - 868.
- Doyle, J.A., Bygrave, P., Le Thomas A., 2000. Implications of molecular data for pollen evolution in Annonaceae, in: Harley, M.M., Morton, C.M., Blackmore, S. (Eds.), Pollen and spores: morphology and biology. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 259 - 284.
- Fries, R.E., 1959. Annonaceae, in: Engler, A., Prantl, K. (Eds.), Die natürlichen Pflanzenfamilien end, 2nd 17A. Dunckher and Humblot, Berlin.
- Johnson, D.M., Murray, N.A., 1995. Synopsis of the tribe Bocageae (Annonaceae), with revisions of *Cardiopetalum*, *Froesiodendron*, *Trigynaea*, *Bocagae* and *Hornschuchia*. Brittonia 47, 248 - 319.
- Leboeuf, M., Cavé, A., Bhaumik, P. K., Mukherjee, B., Mukherjee, R., 1982. The Phytochemistry of the Annonaceae. Phytochemistry 21 (12), 2783 - 2813.
- Liscombe, D.K., MacLeod, B.P., Loukanina, N., Nandi, O.I., Facchini, P.J., 2005. Evidence for the monophyletic evolution of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. Phytochemistry 66, 2500 - 2520.

- Mols, J.B., Gravendeel, B., Chatrou, L., Pirie, M.D., Bygrave, P.C., Chase, M.W., Keßler, P.J.A., 2004. Identifying clades in Asian Annonaceae: monophyletic genera in the polyphyletic Miliuseae. *Am. J. Bot.* 91 (4), 590 - 600.
- Moreira, I.C., Lago, J.H.G., Roque, N.F., 2005. Sesquiterpenes, diterpenes, steroids and alkaloid from branches of *Xylopia brasiliensis* Spreng (Annonaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 948 - 951.
- Pirie, M.D., Chatrou, L.W., Mols, J.B., Erkens R.H.J., Oosterhof, J., 2006. 'Andean-centred' genera in the short-branch clade of Annonaceae: testing biogeographical hypotheses using phylogeny reconstruction and molecular dating. *J. Biogeogr.* 33, 31 - 36.
- Salatino, M.L.F., Salatino, A., 1983. Constituents of the unsaponifiable fraction of the foliar epicuticular wax and the systematics of the Annonaceae. *Revta. Brasil. Bot.* 6, 23 - 28.
- Santos, D.Y.A.C., 1998. Implicações taxonômicas dos flavonoides de Annonaceae. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- Santos, D.Y.A.C., Salatino, M.L.F., 2000. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry* 55, 567 - 573.
- Sauquet, H., Doyle, J.A., Scharaschkin, T., Borsch, T., Hilu, K.W., Chatrou, L.W., Le Thomas, A., 2003. Phylogenetic analysis of Magnoliales and Myristicaceae based on multiple data sets: implications for character evolution. *Bot. J. Linn. Soc.* 142, 125 - 186.
- Scharaschkin, T., Doyle, J.A., 2005. Phylogeny and historical biogeography of *Anaxagorea* (Annonaceae) using morphology and non-coding chloroplast sequence data. *Syst. Bot.* 30 (4), 712 - 735.

- Stevens, P.F., 2008. Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June, <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Su, Y.C.F., Smith, G.J.D., Saunders, R.M.K., 2008. Phylogeny of the basal angiosperm genus *Pseuduvaria* (Annonaceae) inferred from five DNA chloroplast regions, with interpretation of morphological character evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 48, 188 - 206.
- Trigo, J.R., Leal, I.R., Matzenbacher, N.I., Lewinsohn T.M., 2003. Chemotaxonomic value of pyrrolizidine alkaloids in southern Brazil *Senecio* (Senecioneae: Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 1011 - 1022.
- van Zuilen, C.M., Maas, J.W., van Brederone, J., Koek-Noorman, J., Maas, P.J.M., 1996. Phylogenetic relationships in Annonaceae, deduced from molecular and morphological data. Studies in Annonaceae XXV, in: Van Zuilen, C.M., Patterns and affinities in *Duguetia* alliance (Annonaceae). Molecular and Morphological Studies. Tese de Doutorado, Universidade de Utrech.
- Waterman, P.G., 1999. The chemical systematics of alkaloids: a review emphasizing the contribution of Robert Hegnauer. *Biochem. Syst. Ecol.* 27, 395 - 406.
- Wink, M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64, 3 - 19.
- Wink, M., Mohamed, G.I.A., 2003. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 897 - 917.

Resumo

Existem vários sistemas de classificação para Annonaceae. No entanto, estudos recentes sugerem que esse grande número de classificações pode ser reduzido a um. O sistema elaborado por Fries (1959), por exemplo, apresenta vários grupos apoiados por revisões modernas. Um deles é o “Grupo Trigynaea”, sinonimizado como tribo Bocageae Endlicher (Johnson e Murray, 1995). A análise cladística com dados morfológicos sugeriu uma hipótese sobre as relações intergenéricas na tribo (Johnson e Murray, 1995). A confiabilidade dessas relações foi verificada com o uso de dados fitoquímicos e sequências de DNA. Em ((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)), o clado (*Bocagea*, *Hornschuchia*, *Trigynaea*) foi detectado na análise Bayesiana do *RPB2* e apoiado pela presença de apigenina (exceto em *Bocagea*) e síntese de quercetina via di-hidrocampferol. No clado (((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)) (*Froesiodendron*)) a relação (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) foi detectado nas análises de Máxima Parcimônia das regiões *coxI*, *RPB2* e *trnK-matK* e nas análises Bayesianas das regiões *coxI*, *trnL-trnL-F* e *trnK-matK*. Esse clado foi apoiado pela presença de luteolina (exceto em *Cardiopetalum* e *Porcelia*) e síntese de quercetina pelas vias di-hidrocampferol e eriodictiol (exceto em *Cymbopetalum* que produziu luteolina). A presença, até o momento exclusiva em Annonaceae, de alcaloides pirrolizidínicos em Bocageae e *Annona* foi congruente com as informações sobre a estreita relação desses grupos. A distribuição dos componentes das ceras delimitou grupos químicos em Bocageae que não foram congruentes com as relações estabelecidas com os dados morfológicos.

Abstract

There are several classification systems for Annonaceae. However, recent studies have suggested this high number of classifications can be reduced to one. The system of Fries (1959), for example, presents many groups supported by modern revisions. One of them is “*Trigynaea*-Gruppe”, synonym of tribe Bocageae Endlicher (Johnson and Murray, 1995). The morphological cladistic analysis suggested one hypothesis of intergeneric relationships among the Bocageae (Johnson and Murray, 1995). The consistency of these relationships was evaluated by the use of phytochemical data and DNA sequences. Within ((*Bocagea*, *Hornschuchia*) (*Trigynaea*)), the (*Bocagea*, *Hornschuchia*, *Trigynaea*) was detected in the Bayesian analysis of *RPB2* and supported by presence of apigenin (except in *Bocagea*) and synthesis of quercetin via dihydrokaempferol. In the clade (((*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*) (*Porcelia*)) (*Froesiodendron*)), the relationship (*Cardiopetalum*, *Cymbopetalum*, *Porcelia*) was detected in the Maximum Parsimony analyses of *coxI*, *RPB2* and *trnK-matK* regions, and Bayesian analyses of *coxI*, *trnL-trnL-F* e *trnK-matK* regions. This clade was supported by occurrence of luteolin (except in *Cardiopetalum* and *Porcelia*) and synthesis of quercetin via both dihydrokaempferol and eriodictyol (except in *Cymbopetalum* that produced luteolin). The presence of pyrrolizidine alkaloids in Bocageae and *Annona*, unique in Annonaceae until now, was in agreement with information about the closest relationship of these two groups. The distribution of cuticular waxes components circumscribed chemical groups in Bocageae that were not congruent with the relationships based in morphological data.